UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES
Departamento de Biología Molecular
Área de Genética

TESIS DOCTORAL

# Análisis de variación somaclonal en plantas regeneradas de *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* y *Secale cereale*

Carlos Javier Coronel Ramones

León, 2015

Este estudio ha sido realizado gracias a la financiación del proyecto AGL2006-14249-C02-02 por la Dirección General de Investigación Ciencia y Tecnología del Ministerio de Educación, Política Social y Deporte.

*A Domingo Alberto Coronel Ramones*

# ÍNDICE

# ÍNDICE

**1. INTRODUCCIÓN ..... 3**

1.1 Aspectos generales del cultivo de tejidos ..... 5

1.1.1 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales ..... 5

1.1.2 Transformación genética de plantas ..... 8

1.1.3 Variación somaclonal ..... 10

1.2 Técnicas empleadas en el estudio de la variación somaclonal ..... 16

1.2.1 Marcadores morfológicos ..... 16

1.2.2 Marcadores citológicos ..... 16

1.2.3 Marcadores isoenzimáticos ..... 17

1.2.4 Marcadores de ADN ..... 18

1.2.4.1 Marcadores AFLP ..... 19

1.2.4.2 Marcadores MSAP y metAFLP ..... 20

1.3 "Transposon Display" sensible a metilación (TMD ..... 22

1.4 Metilación del ADN en plantas ..... 23

1.5 Elementos transponibles ..... 27

1.5.1 Elementos transponibles de clase I (retrotransposones) ..... 29

1.5.2 Elementos transponibles de clase II (Transposones de ADN) ..... 30

1.6 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ..... 32

1.6.1 Variación somaclonal en *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh ..... 34

1.7 Arroz (*Oryza sativa* L.) ..... 36

1.7.1 Variación somaclonal en *Oryza sativa* L ..... 38

1.8 Centeno (*Secale cereale* L ..... 40

1.8.1 Variación somaclonal en *Secale cereale* L ..... 42

**2. OBJETIVOS…… ..... 47**

**3. MATERIALES Y MÉTODOS ..... 51**

3.1 Material vegetal ..... 51

3.1.1 *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh ..... 51

3.1.1.1 Obtención de plantas control de *Arabidopsis thaliana* a través de germinación de semillas *in vitro* ..... 52

3.1.1.2 Obtención de plantas regeneradas de *Arabidopsis thaliana* ..... 53

3.1.1.3 Obtención de plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana* ..... 53

3.1.2 Arroz (*Oryza sativa* spp. *japonica* ..... 55

3.1.2.1 Obtención de plantas control de arroz a través de germinación de semillas ..... 56

3.1.2.2 Obtención de plantas regeneradas de arroz ..... 56

3.1.2.3 Obtención de plántulas transformadas de arroz ..... 58

3.1.3 Centeno (*Secale cereale* L. cv. Ailés) ..... 60

3.1.3.1 Obtención de plantas control de centeno ..... 61

3.1.3.2 Obtención de plantas regeneradas de centeno ..... 61

3.2 Extracción de ADN ..... 62

3.2.1 Extracción de ADN de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh ..... 62

3.2.2 Extracción de ADN de arroz y centeno ..... 62

3.3 Electroforesis en geles de agarosa ..... 63

3.4 Obtención de marcadores metAFLP ..... 64

3.5 "Transposon display" sensible a metilación (TMD) ..... 68

3.5.1 Obtención de marcadores TMD en *A. thaliana* ..... 69

3.5.2 Obtención de marcadores TMD en *O. sativa* ..... 73

3.6 Electroforesis capilar para la detección de los marcadores metAFLP y TMD ..... 74

3.7 Análisis de marcadores metAFLP y TMD ..... 76

3.7.1 Interpretación de variación en marcadores metAFLP de plantas regeneradas ..... 77

**4. RESULTADOS ..... 84**

4.1 Detección de marcadores moleculares metAFLP en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ..... 84

4.1.1 Polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ..... 91

4. 2 Detección de marcadores moleculares metAFLP en *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variedad Nipponbare ..... 101

4.2.1 Polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP en arroz *Oryza sativa* L. spp. Japónica variedad Nipponbare ..... 108

4.3 Detección de marcadores moleculares metAFLP en *Secale cereale* L. cv. Ailés .. 116

4.3.1 Polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP en *Secale *cereale* L. cv. Ailés ..... 123

4.4 Detección de marcadores moleculares TMD en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh 132

4.4.1 Polimorfismo de marcadores moleculares TMD en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ..... 136

4.5 Detección de marcadores moleculares TMD en arroz *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variedad Nipponbare ..... 140

4.5.1 Polimorfismo de marcadores moleculares TMD en *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variedad Nipponbare ..... 144

**5. DISCUSIÓN ..... 150**

5.1 Endonucleasas de restricción utilizadas para el estudio de la inestabilidad genética y epigenética ..... 152

5.2 Detección y polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP ..... 156

5.3 Detección y polimorfismo de marcadores moleculares TMD ..... 164

**6. CONCLUSIONES ..... 171**

**7. BIBLIOGRAFÍA ..... 175**

## ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

AFLP: polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados.

AIA: ácido indolacético.

ANA: ácido naftalenacético.

ARN: ácido ribonucléico.

ARNm: ARN mensajero.

BSA: albúmina de suero bovino.

CAPS: secuencias de restricción amplificadas y polimórficas.

CMT3: cromometilasa 3.

DMT1: metiltransferasa de ADN 1.

DRM2: metiltransferasa reorganizadora de dominios 2.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

FAOSTAT: Series estadísticas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.

IRAP: polimorfismo amplificado entre retrotransposones.

ISSR: inter-microsatélite.

kb: kilo pares de bases.

kV: kilovoltios.

LB: medio de cultivo Luria Bertani..

LTR: “Long Terminal Repeat”.

MAS: selección asistida por marcadores.

MetAFLP: polimorfismo en longitud de fragmentos amplificados sensible a metilación.

mM: milimolar.

MSAP: polimorfismo amplificado sensible a metilación.

ORF: marco abierto de lectura.

p/v: peso/volumen.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

PEG: polietilenglicol.

pH: potencial de hidrógeno.

QTL: loci de carácter cuantitativo.

RAPD: ADN polimórfico amplificado al azar.

RBIP: polimorfismo de inserción basada en retrotransposones.

REMAP: polimorfismos de microsatélites en retrotransposones amplificados.

RFLP: polimorfismos en longitud de fragmentos de restricción.

rpm: revoluciones por minuto.

SAM: S-adenosilmetionina.

SCAR: región amplificada de secuencia caracterizada.

SDS: dodecilsulfato sódico.

SDS-PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

SNP: polimorfismo de un único nucleótido.

SRAP: polimorfismo amplificado relacionado con secuencias.

SSAP: polimorfismo de amplificación de secuencia específica

SSR: microsatélite ó repetición de secuencia corta.

TAE: tampón de Tris-acetato y EDTA.

TBE: tampón de Tris-borato y EDTA.

TD: “Transposon Display”.

TSDs: secuencias cortas duplicadas.

TE: elementos transponibles.

TMD: “Transposon Display” sensible a metilación.

TILLING: identificación de lesiones locales inducidas en los genomas.

U: unidades.

UE: Unión Europea.

v/v: volumen / volumen.

V: voltios.

SSR: microsatélite ó repetición de secuencia corta.

U: unidades.

UE: Unión Europea.

v/v: volumen / volumen.

## RELACIÓN DE TABLAS

**Tabla 3.1.** Material analizado de *Arabidopsis thaliana* ..... 51

**Tabla 3.2.** Composición de los medios de cultivo utilizados para *Arabidopsis thaliana* ..... 52

**Tabla 3.3.** Composición de los medios básicos MS y B5 ..... 52

**Tabla 3.4.** Material analizado de arroz ..... 55

**Tabla 3.5.** Medios de cultivo utilizados para la transformación genética del arroz... ..... 57

**Tabla 3.6.** Material analizado de centeno ..... 60

**Tabla 3.7.** Secuencias correspondientes a los cebadores selectivos de metAFLP ..... 67

**Tabla 3.8.** Secuencias correspondientes a los cebadores selectivos empleados para obtener marcadores TMD en *Arabidopsis* ..... 73

**Tabla 3.9.** Secuencias correspondientes a los cebadores selectivos empleados para obtener marcadores TMD en arroz ..... 74

**Tabla 3.10.** Fórmulas usadas para el cálculo de los diferentes tipos de eventos a partir de marcadores metAFLP en plantas regeneradas ..... 79

**Tabla 3.11.** Fórmulas usadas para calcular, como porcentajes, características de la variación en marcadores metFLP de plantas regeneradas ..... 79

**Tabla 3.12.** Fórmulas de los coeficientes de corrección y valores corregidos de Machczynska y col. (2014b ..... 80

**Tabla 3.13.** Características que describen la variación de marcadores metAFLP en plantas regeneradas ..... 80

**Tabla 4.1.** Marcadores metAFLP detectados con cada combinación de cebadores selectivos en *Arabidopsis thaliana* ..... 85

**Tabla 4.2.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas en *Arabidopsis thaliana* ..... 91

**Tabla 4.3.** Polimorfismo de marcadores metAFLP en cada grupo de plantas de *Arabidopsis thaliana* ..... 92

**Tabla 4.4.** Polimorfismo de los marcadores metAFLP detectados con los grupos de cebadores CCGN y CCWG en *Arabidopsis thaliana* ..... 94

**Tabla 4.5.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular en *Arabidopsis thaliana* ..... 97

**Tabla 4.6.** Frecuencias absolutas de patrones metAFLP conservados y variables entre las plantas regeneradas obtenidas en cada línea celular de *Arabidopsis thaliana* ..... 99

**Tabla 4.7.** Porcentaje medio de cambios inducidos durante el cultivo *in vitro* en las plantas regeneradas en cada una de las líneas celulares de *Arabidopsis thaliana* ..... 100

**Tabla 4.8.** Marcadores metAFLP detectados con cada combinación de cebadores selectivos en arroz ..... 102

**Tabla 4.9.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas de arroz ..... 107

**Tabla 4.10.** Polimorfismo de marcadores metAFLP en cada grupo de plantas de arroz.....108

**Tabla 4.11.** Resumen de los marcadores metAFLP detectados con los grupos de cebadores CCGN y CCWG en arroz .....109

**Tabla 4.12.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular en arroz.....112

**Tabla 4.13.** Frecuencias absolutas de patrones metAFLP conservados y variables entre las plantas regeneradas obtenidas en cada línea celular de arroz .....114

**Tabla 4.14.** Porcentaje medio de cambios inducidos durante el cultivo *in vitro* en las plantas regeneradas en cada una de las líneas celulares de arroz ..... 115

**Tabla 4.15.** Marcadores metAFLP detectados con cada combinación de cebadores selectivos en centeno .....117

**Tabla 4.16.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas de centeno .....123

**Tabla 4.17.** Polimorfismo de marcadores metAFLP en cada grupo de plantas de centeno 124

**Tabla 4.18.** Resumen de los marcadores metAFLP detectados con los grupos de cebadores CCGN y CCWG en centeno.....126

**Tabla 4.19.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular de centeno .....128

**Tabla 4.20.** Frecuencias absolutas de patrones metAFLP conservados y variables entre las plantas regeneradas obtenidas en cada línea celular de centeno.....129

**Tabla 4.21.** Porcentaje medio de cambios inducidos durante el cultivo *in vitro* en las plantas regeneradas en cada una de las líneas celulares de centeno .....131

**Tabla 4.22.** Marcadores TMD detectados en *Arabidopsis thaliana* para cada tipo de retrotransposones.....133

**Tabla 4.23.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas en *Arabidopsis thaliana*.....135

**Tabla 4.24.** Polimorfismo de marcadores TMD en cada grupo de plantas de *Arabidopsis thaliana*.....137

**Tabla 4.25.** Número y tipo de marcadores TMD polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular de *Arabidopsis thaliana* .....139

**Tabla 4.26.** Marcadores TMD detectados en arroz asociados a cada tipo de elemento transponible .....141

**Tabla 4.27.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas en arroz .....142

**Tabla 4.28.** Polimorfismo de marcadores TMD en cada grupo de plantas de arroz.....145

**Tabla 4.29.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular de arroz.....147

## RELACIÓN DE FIGURAS

**Figura 1.1.** Algunas condiciones del cultivo *in vitro* que afectan al estrés genómico y producen variación somaclonal ..... 12

**Figura 1.2.** Representación esquemática de las diferencias entre variación genética y epigenética ..... 13

**Figura 1.3.** Reacción de metilación catalizada por las ADN-metiltransferasas ..... 24

**Figura 1.4.** Clasificación de los elementos transponibles ..... 28

**Figura 1.5.** *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ..... 32

**Figura 1.6.** *Oryza sativa* L ..... 36

**Figura 1.7.** *Secale cereale* L ..... 40

**Figura 3.1:** Mapa del plásmido pBin19 ..... 54

**Figura 3.2:** Mapa del vector binario pCAMBIA1301 ..... 59

**Figura 3.3.** Proceso de obtención de marcadores metAFLP ..... 65

**Figura 3.4.** Proceso de obtención de marcadores TMD ..... 70

**Figura 3.5.** Analizador de fragmentos de ADN, ABI Prism 310, basado en electroforesis capilar en polímero específico POP-4 y en la detección de ADN marcado con fluorocromos mediante excitación por luz láser ..... 74

**Figura 3.6.** Marcador de pesos moleculares ROX-500 (Applied Biosystems ..... 75

**Figura 3.7.** Imagen del programa informático GeneMapper 4.0 empleado para el análisis de marcadores metAFLP y TMD ..... 76

**Figura 3.8.** Representación esquemática de la interpretación de todos los cambios posibles en los patrones de marcadores metAFLP de plantas regeneradas ..... 78

**Figura 4.1.** Número de marcadores metAFLP detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana* ..... 87

**Figura 4.2.** Número de marcadores metAFLP, totales y de distintos tipos, detectados en cada planta y grupo analizado con los grupos de cebadores CCGN y CCWG en *Arabidopsis thaliana* ..... 89

**Figura 4.3.** Fenograma obtenido usando el índice de identidad IRM y agrupamiento mediante UPGMA para *Arabidopsis thaliana* ..... 95

**Figura 4.4.** Origen de los marcadores metAFLP de tipo 10 por presencia de dos dianas para *Acc65*I/*Kpn*I con distinto estado de metilación (Met+ y Met-) en su citosina 3' terminal ..... 97

**Figura 4.5.** Número de marcadores metAFLP detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en arroz ..... 104

**Figura 4.6.** Número de marcadores metAFLP, totales y de distintos tipos, detectados en cada planta y grupo analizado en arroz con los grupos de cebadores CCGN y CCWG ..... 106

**Figura 4.7.** Fenograma obtenido usando el índice de identidad IRM y agrupamiento por el método UPGMA para arroz ..... 111

**Figura 4.8.** Número de marcadores metAFLP detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en centeno ..... 120

**Figura 4.9.** Número de marcadores metAFLP, totales y de distintos tipos, detectados en cada planta y grupo analizado en centeno con los grupos de cebadores CCGN y CCWG ..... 122

**Figura 4.10.** Fenograma obtenido usando el índice de identidad IRM y agrupamiento por el método UPGMA para centeno ..... 127

**Figura 4.11.** Número de marcadores TMD detectados, totales y de distintos tipos, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana* ..... 134

**Figura 4.12.** Número de marcadores TMD detectados asociados a elementos *copia*, totales y de distintos tipos, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana* ..... 135

**Figura 4.13.** Número de marcadores TMD detectados asociados a elementos *TRIM*, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana* ..... 136

**Figura 4.14.** Número de marcadores TMD detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en arroz ..... 141

**Figura 4.15.** Número de marcadores TMD detectados asociados a cada uno de los elementos *Tos17, Karma, nDart y mPing*, en cada planta y grupo analizado en arroz ..... 143

# INTRODUCCIÓN

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas regeneradas por multiplicación clonal, a través del cultivo de tejidos, deberían ser homogéneas desde el punto de vista genético; sin embargo, existe una tasa de variación que depende tanto de la especie como de la técnica de cultivo *per se*. En este sentido, considerando que el cultivo *in vitro* puede resultar muy estresante para las células vegetales, es posible observar la ocurrencia de una serie de cambios genéticos provocados durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, la formación de órganos/embriones somáticos y la regeneración de plantas (Cardone y col., 2010).Este fenómeno denominado variación somaclonal, involucra cambios en las plantas regeneradas *in vitro* que se transmiten a la descendencia (Larkin y Scowcroft, 1981). Aunque esta variación se ha usado en programas de mejora de plantas para ampliar la base genética de cultivos de interés agronómico, la variación somaclonal es un fenómeno indeseable cuando el objetivo es la propagación clonal de una variedad (Gao y col., 2009).

Los mecanismos responsables de la variación somaclonal incluyen mutaciones puntuales, perdidas de segmentos cromosómicos, reordenamiento cromosómico, cambios en el nivel de ploidía y cambios nucleotídicos, así como también cambios en los patrones de metilación y activación de elementos móviles, entre otros (Azman y col., 2014). Esta variación ha sido caracterizada en numerosas especies vegetales mediante marcadores morfológicos, citológicos, bioquímicos y moleculares.

Además de la tasa normal de variación de las células vegetales, existen factores externos propios del cultivo *in vitro* que pueden inducir la aparición de variaciones genéticas que, a veces, se manifiestan en el fenotipo de las plantas regeneradas (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009). Entre los factores externos se pueden mencionar el método de cultivo *in vitro*, el medio de cultivo y las condiciones ambientales en que se mantienen los cultivos.

También es probable que la ocurrencia *in vitro* de interacciones no específicas, generen variaciones que pueden conducir a cambios en la expresión génica, dichos cambios son llamados epigenéticos (Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009). La epigenética estudia los cambios heredables en el ADN e histonas que no implican alteraciones en la secuencia de nucleótidos y modifican la estructura y condensación de la cromatina.

La variación epigenética es considerada por algunos autores como un componente de la variación somaclonal, mientras que otros solo incluyen en la misma los cambios genéticos (Cardone y col., 2010). Actualmente se entiende que las mutaciones pueden tener su origen en los cambios epigenéticos. Dentro del campo de la epigenética, uno de los mecanismos que está mejor caracterizado es el de la metilación del ADN, cuyos resultados han sido de gran importancia para la comprensión de los cambios en los patrones de expresión génica, que no dependen de alteraciones en la secuencia normal de los nucleótidos que componen el genoma.

Se han empleado distintas técnicas citológicas, bioquímicas y moleculares para obtener estimaciones de los cambios que surgen durante el cultivo de tejidos. Así, el polimorfismo basado en proteínas fue de gran utilidad en las investigaciones iniciales, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en el ADN y los avances en esta área, las técnicas moleculares se han visto favorecidas por la disponibilidad de una mayor cantidad y tipos de marcadores. Con el estudio de los polimorfismos de ADN, se ha logrado obtener aproximaciones más precisas en la determinación de diferencias genéticas entre individuos.

Es por ello que resulta interesante el estudio molecular de la variación somaclonal en especies con genomas muy diferentes que faciliten la comprensión de algunos mecanismos genéticos implicados en los cambios inducidos por el cultivo *in vitro.* En este contexto se entiende que en el constante avance de los estudios realizados se hayan utilizado especies de diferentes tipologías, unas consideradas modelos biológicos como *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh y otras consideradas especies de interés agronómico como el arroz (*Oryza sativa* L.), el maíz (*Zea mays* L.), el trigo (*Triticum aestivum* L.) y el centeno (*Secale cereale* L.). La elección de una especie determinada suele obedecer a una serie de criterios establecidos según los objetivos del estudio, desarrollándose protocolos adaptados a las características intrínsecas de cada una (tamaño del genoma y el nivel de ploidía), entre otras.

Para la realización de este trabajo se han utilizado tres especies vegetales con características genómicas diferentes: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, arroz (*Oryza sativa* L.) y centeno (*Secale cereale* L.). Con ellas, se pretende caracterizar algunos de los procesos por los cuales ocurre la variación somaclonal, tanto cambios en la secuencia como modificaciones en los patrones de metilación del ADN. A continuación se tratarán aspectos generales del cultivo *in vitro* de plantas, incluyendo la transformación genética, algunos aspectos de la variación somaclonal y de las técnicas utilizadas para su detección y, por último, se describirán los rasgos más relevantes de cada una de las especies utilizadas.

## 1.1 Aspectos generales del cultivo de tejidos

### 1.1.1 Cultivo *in vitro* de tejidos vegetales

El concepto original de cultivo de tejidos vegetales, se ha extendido para abarcar tanto el cultivo aséptico de tejidos, como de células y órganos (explantes), dentro de un grupo de técnicas que se fundamentan en varios principios. Entre éstos, sin duda los más importantes son la totipotencia celular propuesta por Haberlandt (1902), demostrada simultáneamente años más tarde por Reinert (1958) y Steward y col. (1958) y la dependencia del balance hormonal sugerida por Skoog y Miller (1957). Las células de las plantas que se encuentran diferenciadas normalmente no se dividen, pero se puede inducir la desdiferenciación/rediferenciación y la división celular colocando los explantes en un medio de cultivo adecuado. Los reguladores de crecimiento pueden estimular la respuesta de los explantes y manipulando la proporción de estos reguladores de crecimiento, se pueden desarrollar plantas completas o bien formar callos (proliferación de células desdiferenciadas) que posteriormente pueden rediferenciar brotes, raíces o embriones somáticos (Alonso, 2002). El cultivo de tejidos vegetales utiliza el potencial genético y la totipotencia de las células para regenerar a una planta entera y se espera que las plantas regeneradas a través del cultivo *in vitro* conserven el material genético idéntico al de sus padres (Azman y col., 2014).

La capacidad de los explantes de remodelar sus programas genéticos y epigenéticos, determinará la adaptabilidad de los mismos a las condiciones del cultivo *in vitro* y ayudará a los procesos de morfogénesis posteriores. Una consecuencia a nivel molecular de estos procesos dinámicos son las variantes genéticas y epigenéticas, frecuentemente detectadas en las plantas regeneradas (Neelakandan y Wang 2012). Los factores que influyen en la adaptabilidad y regeneración *in vitro* son variados, y van desde el genotipo del explante, el tipo de explante, las condiciones de cultivo y el efecto de las hormonas.

Las técnicas de cultivos asépticos de tejidos y células vegetales han contribuido tanto al entendimiento de los eventos de diferenciación celular, como al mejor aprovechamiento de estos eventos para una más eficiente explotación de las plantas. Así, la micropropagación es la técnica que ha trascendido con más éxito desde los ámbitos experimentales a la aplicación práctica. Us-camas y col. (2014) mencionan que dichas técnicas de cultivo son la base de muchos programas de mejora genética y micropropagación de plantas y el resultado depende de las diferentes condiciones a las que se expone el tejido. En tal sentido, en los métodos de

cultivo que implican organogénesis y embriogénesis, las plantas son sometidas a condiciones muy estresantes (humedad relativa, baja tasa de ventilación, concentraciones altas de los reguladores del crecimiento vegetal, diferentes condiciones de luz, entre otras) y tienen que cambiar su regulación molecular con el fin de responder rápida y eficientemente durante la división celular y el crecimiento.

La propagación *in vitro* de plantas se puede conseguir directamente del explante, mediante el cultivo de microesquejes, meristemos, yemas terminales/laterales, células, órganos o embriones cigóticos o bien indirectamente a partir de callo y posterior desarrollo de órganos adventicios y/o embriones somáticos (Rout y col., 2006; Butt y col., 2015). Es importante destacar que, en el caso de la embriogénesis somática, las células somáticas se desarrollan dando lugar a plantas completas pasando por los estados embriogénicos sin que ocurra la fusión de gametos. La embriogénesis somática desempeña un papel importante en la multiplicación de la planta y requiere, para el desarrollo y la formación del embrión, de procesos complejos desde el punto de vista bioquímico y molecular. Las investigaciones recientes han confirmado la relación entre la morfogénesis y la epigenética las cuales desempeñan un papel fundamental en el fenotipo resultante (Us-Camas y col., 2014).

En la década de los 70, Murashige propuso los siguientes pasos para micropropagar eficientemente una especie vegetal: el establecimiento aséptico del cultivo, la inducción y multiplicación de plántulas y el enraizamiento y aclimatación de las plantas a las condiciones *ex vitro*. Actualmente siguen considerándose como la base para el establecimiento de diferentes técnicas de cultivo de tejido. Durante el cultivo *in vitro*, las plantas tienen que hacer frente a las diferentes condiciones de estrés a las que son sometidas y a las condiciones en el microambiente propias de cada metodología, dentro de los que se pueden mencionar, la desinfección del explante, los diferentes medios de cultivo, los reguladores del crecimiento vegetal, número y duración de los subcultivos, entre otros (Bairu y col., 2011; Us-Camas y col., 2014).

La desinfección del explante es el paso primordial en el establecimiento de un cultivo *in vitro*. Para la desinfección del explante se han utilizado diferentes compuestos siendo los más comunes las soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, peróxido de hidrógeno, nitrato de plata, cloro comercial y alcohol a diferentes concentraciones. La selección y concentración de los desinfectantes y el tiempo de desinfección se determinan en gran medida por las

características del explante. Sin olvidar que el explante debe responder eficientemente a las condiciones *in vitro*.

La fase de inducción y multiplicación de plantas va a depender, entre otros factores, de las condiciones del cultivo, del genotipo del explante y de la formación o no de callo. Con fines de micropropagación, se trata de evitar la fase intermedia de formación de callo ya que esta induce frecuentemente diferentes grados de variación que pueden ser de tipo epigenético o genético y modificar el fenotipo de las plantas regeneradas.

El proceso de enraizamiento de las plántulas generalmente requiere del trasplante a un medio de cultivo con menor concentración de sales. Asimismo, se requiere a veces, una relación diferente entre los reguladores de crecimiento, esto es, disminuir las citoquininas y aumentar las auxinas exógenas. Las plantas con raíces se trasplantan, para su aclimatación a las condiciones *ex vitro*, a contenedores con sustratos del tipo vermiculita/perlita regada con una solución salina o agua y se cubren con plástico para mantener la tasa de humedad alta. Progresivamente se irá reduciendo la humedad y estableciendo las condiciones ambientales.

La proporción entre citoquininas y auxinas es determinante en los patrones de diferenciación, de tal forma que cuando las proporciones de citoquininas respecto a las auxinas son bajas existe una diferenciación de células hacia primordios de raíz, mientras que una alta concentración de citoquininas con respecto a las auxinas induce la formación de brotes. Por lo tanto, si se provocan pequeños cambios en la proporción entre citoquininas y auxinas puede obtenerse el inicio de meristemos tanto radiculares como apicales, pudiéndose controlar, en parte, la morfogénesis *in vitro* (Fratini y Ruiz, 2002; Gaj, 2004; Bairu y col., 2011; Quiao y col., 2012).

Existen diferentes factores que pueden determinar el éxito del cultivo *in vitro*, entre los que se encuentran el estado fisiológico de la planta madre el cual influye significativamente en la capacidad morfogenéticas de los explantes. Los requerimientos nutricionales y hormonales, que difieren según el tipo de explante y la edad fisiológica de la planta madre, cuanto más joven y menos diferenciado sea el explante, mejor será la respuesta *in vitro*. A este respecto, los meristemos apicales y axilares han sido empleados con éxito en una amplia gama de especies.

El cultivo *in vitro* tiene numerosas aplicaciones además de la micropropagación y la producción de plantas libres de virus, como son la producción de plantas haploides, obtención

de híbridos somáticos, producción de metabolitos secundarios, inducción de variación somaclonal, selección *in vitro* de mutantes genéticos y obtención de plantas transgénicas (Targonska y col., 2013). Aunque se espera que las plantas regeneradas sean homogéneas genéticamente, se sabe que debido a factores intrínsecos y extrínsecos relacionados con el desarrollo en condiciones artificiales, existe una alta probabilidad de cambios genéticos y epigenéticos; es por ello que se deben considerar cuidadosamente las distintas aplicaciones del cultivo *in vitro* para diseñar estrategias que permitan minimizar/incrementar los efectos del fenómeno de variación somaclonal y adaptarlas a las condiciones particulares de cada aplicación (Neelakandan y Wang, 2012).

### 1.1.2 Transformación genética de plantas

Los avances en biotecnología vegetal han permitido superar las barreras naturales de cruzamiento entre especies y hacen posible transferir genes específicos de cualquier organismo a las plantas. La posibilidad de introducción e integración estable de genes foráneos en el genoma vegetal es una herramienta muy útil en la mejora genética. Así, en la actualidad, se cuenta con protocolos bien diseñados cuya eficacia permite el uso rutinario en la transformación de especie vegetales de interés comercial. La transformación genética consiste en la incorporación de uno o varios genes provenientes de una especie, en plantas de la misma o diferente especie, estando basado este proceso en la aplicación de técnicas de ADN recombinante, transformación de células vegetales y cultivo de tejidos.

La tecnología del ADN recombinante se desarrolló principalmente en la década de los 80, pero tuvo su origen en la década de los 70 con el conocimiento de los plásmidos bacterianos y de las enzimas de restricción. Estas últimas reconocen secuencias específicas de ADN y realizan cortes en las cadenas de azúcar-fosfato en la zona de reconocimiento o en una secuencia muy cercana a ella, de tal forma que los segmentos generados pueden ser unidos de nuevo en distintas combinaciones. Por su parte, algunos plásmidos bacterianos tienen la capacidad de poder ser transferidos de uno a otro organismo por lo que pueden emplearse como vectores para la movilidad de fragmentos de ADN (de Jaramillo, 2005).

Respecto a las estrategias de transformación genética de células vegetales, existen varios métodos que se podrían clasificar en métodos biológicos, como la utilización de *Agrobacterium tumefaciens*, y en métodos físicos como biolística, electroporación, abrasión con fibras, tratamiento con polietilenglicol (PEG), utilización de láser y microinyección. Entre

los métodos más utilizados y efectivos se encuentra la transformación por medio de *A. tumefaciens* ó *A. rhizogenes* que son bacterias naturales del suelo que utilizan un complejo y evolucionado sistema de transferencia e integración de genes. Parte del mecanismo de transferencia e integración del ADN foráneo a la planta se efectúa mediante un complejo de proteína y ADN de cadena sencilla, el cual se introduce en un número reducido de copias por célula vegetal (Birch, 1997). Probablemente, la mayor ventaja de la transformación por medio de *Agrobacterium* es que ofrece el potencial de generar células transgénicas a altas frecuencias relativas sin que presenten una reducción significativa en su capacidad de regeneración (Zupan y col., 2000).

En condiciones naturales, *Agrobacterium* es una bacteria patógena para algunas especies de plantas, causándoles inducción de tumores. El estudio de este fenómeno permitió el descubrimiento de la transferencia de genes bacterianos a las plantas. Cuando la bacteria infecta el tejido vegetal, le transfiere parte del genoma de un plásmido que posee. Los genes transferidos ocasionan una proliferación de células no diferenciadas que constituyen el tumor o agalla de corona.

El cultivo de tejidos de especies vegetales es una técnica básica para la obtención de plantas transformadas. Las células inicialmente transformadas se someten a un proceso de selección y regeneración de plantas mediante la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro*, obteniendo una planta completa donde todas o parte de las células contendrán el transgén. Es este paso, precisamente, uno de los factores limitantes en la obtención de plantas transgénicas de determinadas especies.

La transformación genética se presenta como una alternativa para la mejora genética de especies vegetales y se programa en varias etapas que se inician a partir de la definición de un problema o de un factor limitante de producción. Posteriormente, se requiere ubicar y aislar el gen de interés a partir de un organismo determinado, para realizar la transferencia e integración estable de ese gen en el genoma de las células vegetales. Esto se logra a través de la utilización de un vector y un sistema de transferencia adecuado. Para la transferencia exitosa de genes, uno de los factores más importantes es el de tener disponible un gran número de células competentes para la transferencia de genes con capacidad de regeneración *in vitro* de plantas (Birch, 1997). En el proceso, se seleccionan las células transformadas y se realiza la regeneración de plantas completas en las cuales se evalúa tanto la presencia del transgén, como la expresión del fenotipo deseado en el momento requerido. El desarrollo de

brotes en un medio que contenga el agente selectivo generalmente es indicativo de transformación exitosa, y finalmente se debe verificar que el transgén se transfiera a la descendencia de forma mendeliana.

A partir de 1994 tras la aprobación de la utilización de organismos transgénicos a nivel comercial, el uso de los mismos se ha expandido en forma acelerada en todo el mundo. Barros (2014) menciona que la investigación y generación de cultivos modificados genéticamente ha estado orientada básicamente hacia los siguientes objetivos: i) aumentar la productividad de los cultivos mediante resistencia a plagas, enfermedades, herbicidas, sequía y suelos con elevada salinidad; ii) incrementar la calidad del producto mediante la mejora de su aspecto, de su contenido nutricional o retrasando la maduración de los frutos para conseguir dilatar el tiempo de almacenamiento; iii) regeneración de suelos contaminados por metales pesados con plantas transgénicas tolerantes a concentraciones elevadas de estos elementos; producción de medicamentos, tales como anticuerpos monoclonales, vacunas y otras proteínas terapéuticas en plantas transgénicas.

### 1.1.3 Variación somaclonal

Las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* de células, tejidos y órganos tienen un tremendo potencial en investigaciones básicas y aplicadas, de ahí el interés por entender los cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares asociados con las respuestas obtenidas en cultivo *in vitro*. Como ya se ha indicado, la variación originada por el cultivo de tejidos y células se denomina variación somaclonal (Larkin y Scowcroft, 1981). Desde el primer caso de variación somaclonal descrito (Braun, 1959) este fenómeno ha sido problemático, debido a que los investigadores inicialmente esperaban que estas plantas propagadas clonalmente fueran idénticas a la planta parental. Posteriormente, frente a este efecto negativo, su utilidad práctica al inducir nuevas variantes genéticas, ha sido ampliamente descrita.

Bairu y col. (2011) mencionan que el término variación somaclonal es aceptado universalmente para referirse a las variaciones que ocurren en el cultivo *in vitro* y que esta variación podría resultar por la ocurrencia de mutaciones, de cambios epigenéticos, o una combinación de ambos mecanismos. La distinción entre los dos mecanismos es muy importante teniendo en cuenta que las mutaciones genéticas son esencialmente irreversibles y es probable que persistan en la progenie de las plantas regeneradas, mientras que los cambios

epigenéticos no siempre se transmiten mediante reproducción sexual. También se han originado diferencias de criterio en el uso del término cuando se utilizan plantas polisomáticas y quiméricas, consideradas ambas características como fuentes preexistentes de variación. En este sentido, estos autores indican que algunas de las causas por las cuales ocurre la variación somaclonal podrían considerarse resultado de diferencias genéticas preexistentes en células somáticas, por lo cual sugieren que el uso del término debe ser restringido a las variaciones que no se detectan durante los estadios iniciales del cultivo.

Paralelamente, otros nombres, como variación protoclonal, gametoclonal y mericlonal también se han utilizado para describir variantes surgidas en los cultivos de protoplastos, anteras y meristemos, respectivamente (Chen y col., 1998) Cuando la variación somaclonal es heredable se asocia con mutaciones puntuales, reordenamientos cromosómicos, deleciones y la activación de elementos móviles (Noro y col., 2007). Estas modificaciones pueden actuar sobre caracteres cualitativos controlados por uno o pocos loci (alteraciones monogénicas) y también sobre caracteres cuantitativos controlados por varios loci (alteraciones poligénicas).

En la figura 1.1 se muestra una cascada de sucesos que se inician con el cultivo *in vitro* de células, tejidos u órganos vegetales y terminan produciendo variación somaclonal. Durante el cultivo *in vitro* pueden ocurrir cambios moleculares permanentes o temporales, relacionados o no con un programa de desarrollo particular en respuesta al cultivo *in vitro* (Neelakandan y Wang, 2012).

Los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal son múltiples y entre ellos se encuentran los relacionados con errores en los procesos de división mitótica y meiótica, sobrecruzamiento somático, desequilibrio en el *pool* de nucleótidos que podría alterar tanto la replicación como la reparación del ADN, la replicación anormalmente retrasada de la heterocromatina, el efecto de los reguladores de crecimiento, la activación de transposones y cambios en el ADN de los orgánulos citoplásmicos (Lee y Phillips, 1988; Linacero y Vázquez, 1992a y 1992b; Kaeppler y Phillips, 1993; Cardone y col., 2010). Es por ello que, aunque algunos pueden originar cambios en los caracteres morfológicos fáciles de evaluar, muchos tipos de variación pueden suceder sin un cambio morfológico evidente dado que una diferencia estructural en un producto génico puede no alterar su actividad biológica lo suficiente como para producir un fenotipo modificado. Por tanto, la falta de variación fenotípica de las plantas regeneradas, no necesariamente implica que no exista un cambio

genético (o epigenético), por lo que es de suma importancia analizar la descendencia de las plantas regeneradas del cultivo *in vitro* a nivel molecular (Bednarek y col., 2007).

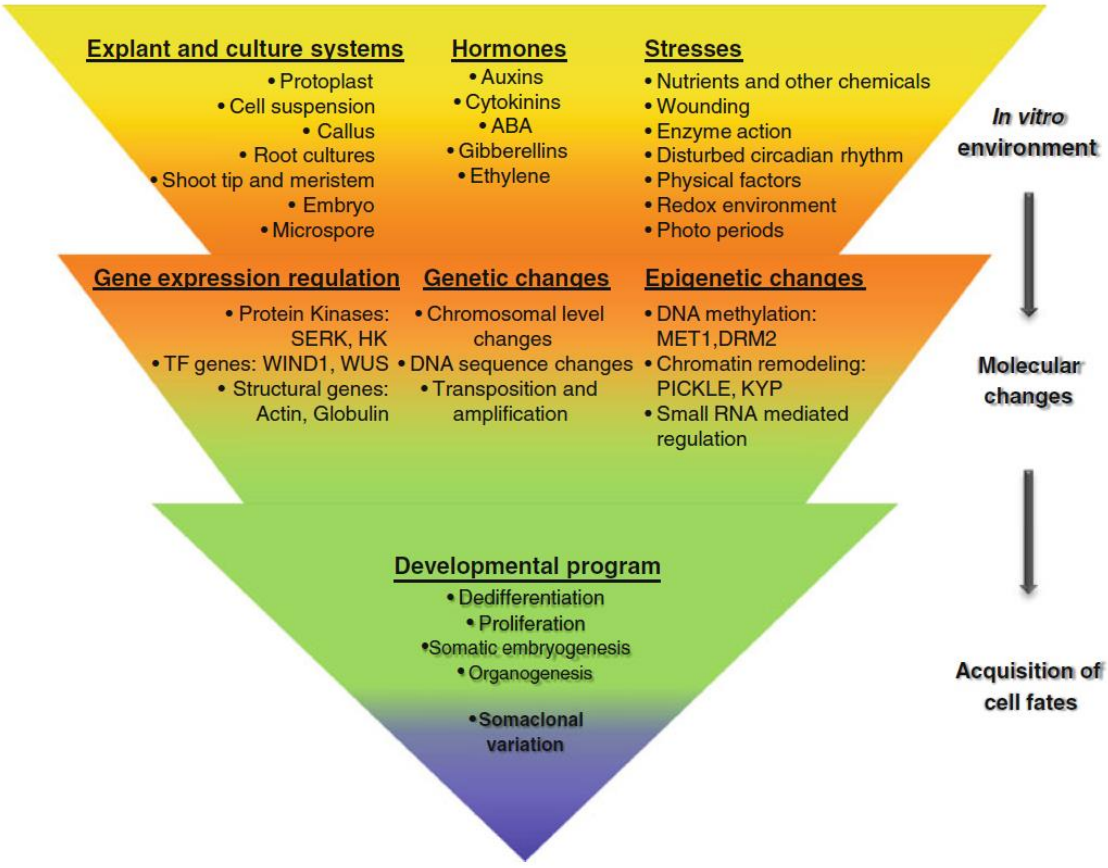


**Figura 1.1.** Algunas condiciones del cultivo *in vitro* que afectan al estrés genómico y producen variación somaclonal (tomado de Neelakandan y Wang, 2012).

Cuando la variación somaclonal es epigenética, puede ser resultado de un cambio en la expresión de los genes, reversible y no heredable, que puede estar asociado a alteraciones en los patrones de metilación del ADN cambios en las histonas, remodelación de la cromatina y en los niveles de RNAs pequeños (Kubis y col., 2003; Noro y col., 2007; Sánchez-Chiang y Jiménez, 2009; Miguel y Marum, 2011; Neelakandan y Wang, 2012). Por ello, las alteraciones epigenéticas pueden distinguirse de las genéticas propiamente dichas, analizando los individuos obtenidos por regeneración y sus descendientes durante varias generaciones para comprobar que mantienen el fenotipo mutante. Aunque los cambios epigenéticos son a menudo temporales y las plantas pueden volver al fenotipo normal, algunos pueden ser de larga duración, e incluso pueden ser transferidos durante la propagación sexual y se consideran epimutaciones (epialelos) heredables (Jullien y Berger, 2010; Smulders y Klerk,

2011). Datos experimentales obtenidos por Johannes y col. (2009) indican que en especies como *A. thaliana* se han identificado cambios epigenéticos que fueron estables durante al menos ocho generaciones.

Los avances en el campo de la epigenética han revelado mecanismos dinámicos de remodelación de la cromatina ocurridos durante los procesos de desdiferenciación y rediferenciación celular en los que se basan los sistemas de regeneración *in vitro* de plantas y se ha sugerido que puede estar causada por una incompleta reposición de marcas epigenéticas durante la regeneración adventicia, aunque también es probable que tenga otros orígenes (Miguel y Marum, 2011). En la figura 1.2 se muestra un esquema de la estabilidad de la variación genética y epigenética en diferentes situaciones de propagación (Smulders y Klerk, 2011).

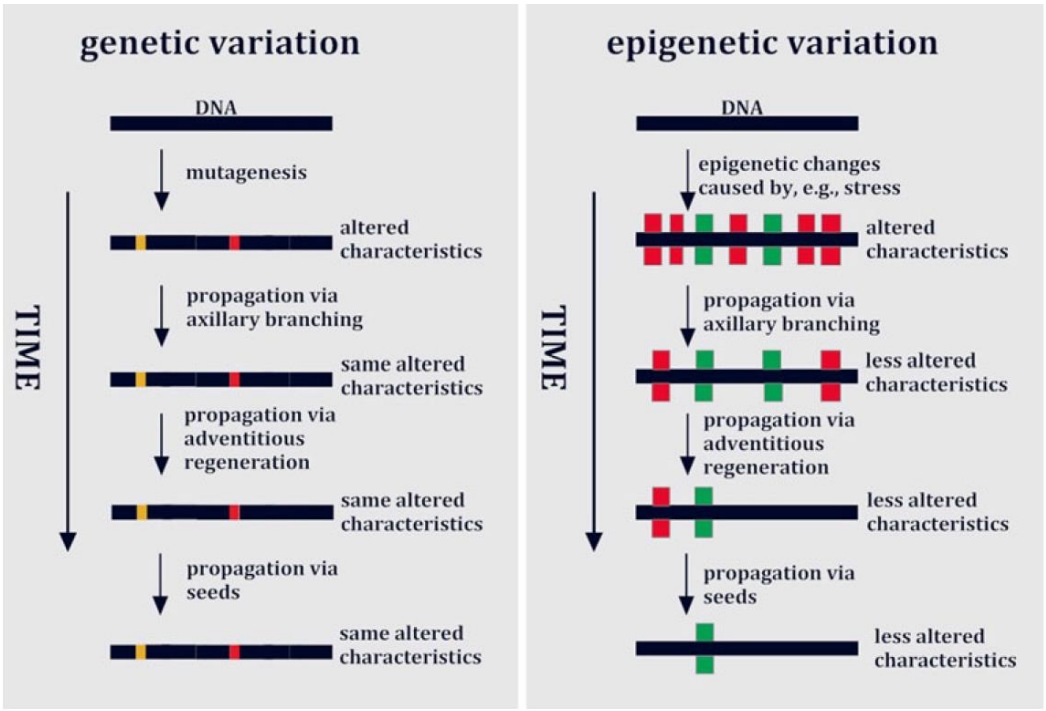


**Figura 1.2.** Representación esquemática de las diferencias entre variación genética y epigenética (tomado de Smulders y Klerk, 2011).

Cuando las plantas sufren estrés, muestran una multitud de respuestas, que pueden incluir variaciones epigenéticas (Molinier y col., 2006). En este sentido, el cultivo *in vitro* se considera una fuente de estrés: los explante se separan de la planta mediante cortes que producen heridas, se cultivan estériles en un medio artificial y se mantienen en condiciones ambientales poco naturales. Los componentes del medio aportan a los explantes hidratos de

carbono como un reemplazo de la fotosíntesis en las hojas, además de altas dosis de auxinas y citoquininas. Así mismo, su balance hídrico se ve perturbado por la alta humedad que se alcanza en los contenedores donde se mantienen en cultivo. Por tanto, el estrés provocado por el cultivo *in vitro* puede afectar la expresión génica y la estructura de la cromatina, involucrando un posible mecanismo de alteración de los patrones de metilación del ADN (Smulders y Klerk, 2011).

La frecuencia de la variación generada por el cultivo *in vitro* es variable y puede depender, entre otros factores, del medio de cultivo, del tipo de explante y de su genotipo y del proceso de regeneración ya sea organogénesis o embriogénesis somática. Altas tasas de variación somaclonal durante la micropropagación de determinadas especies son consideradas como un problema importante, especialmente en operaciones comerciales a gran escala. La detección temprana y eliminación de las variantes es esencial para reducir pérdidas a los productores.

Los diferentes estudios realizados sobre variación somaclonal ha puesto en evidencia algunas características particulares de este fenómeno, como son: alta frecuencia de mutación, individuos con un elevado número de mutaciones, puntos calientes de mutación en el genoma, mutaciones diferentes a las inducidas con mutágenos, alta frecuencia de mutaciones dominantes y mutantes homocigotos (Gavazzi y col., 1987; Linacero y Vázquez, 1993; Polanco y Ruiz, 2002; Yang y col., 2010).

La variación somaclonal se puede detectar utilizando una amplia gama de técnicas, citológicas, bioquímicas y moleculares, con sus ventajas y limitaciones. La elección del método de detección dependerá, por lo tanto, de la finalidad del estudio. La detección es posible al comparar el fenotipo parental y el fenotipo de las plantas regeneradas permitiendo estimar la tasa de variación. Los cambios en la expresión génica están cada vez más documentados y tanto las metilaciones del ADN como las alteraciones en las histonas son fenómenos que se ha demostrado que están involucrados en los cambios observados en plantas regeneradas con respecto al material parental utilizado en el establecimiento del cultivo *in vitro* y estos cambios pueden ocurrir en cualquier tipo de cultivo desde los más estables genéticamente como son el cultivo de yemas o brotes, hasta los más inestables como son el cultivo de protoplastos (Smulders y Klerk, 2011).

Desde el punto de vista práctico, se sabe que la variación somaclonal no resulta un fenómeno aprovechable en todos los casos, puesto que no es posible predecir si esta ocurrirá efectivamente y si el tipo de variación obtenido será aprovechable. Por lo tanto, entender la base molecular de los cambios que la originan ayudaría a desarrollar estrategias para producir plantas idénticas a la planta parental como se requiere en la conservación de germoplasma y en la transformación genética. Al mismo tiempo, se podría ampliar el rango de variación genética en especies con una base genética estrecha, como por ejemplo en el caso de especies apomícticas, donde la variabilidad dentro de las poblaciones naturales o cultivadas es limitada (Cardone y col., 2010).

Aunque la variación somaclonal se puede generar en todos los sistemas comúnmente empleados de cultivo *in vitro* de plantas, la proporción de variantes somaclonales aumenta en cultivos de larga duración y según aumenta el número de subcultivos. Esto probablemente se deba a la acumulación de alteraciones genéticas y cambios epigenéticos. El cultivo *in vitro* combinado con el uso de agentes mutagénicos pueden utilizarse para generar variabilidad genética como una fuente potencial de nuevos cultivares. Es importante destacar que el cultivo de tejido puede potenciar la eficiencia de los tratamientos mutagénicos, ya que permite el manejo de grandes poblaciones celulares y una rápida clonación de variantes seleccionados *in vitro* bajo condiciones selectivas (Orbovic y col., 2008; Bairu y col., 2011).

Como ya se mencionó, la composición del medio de cultivo puede inducir variación somaclonal. Se ha encontrado que los reguladores de crecimiento, principalmente aquellos con naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN, causando así cambios epigenéticos (Sahijram y col., 2003; Neelakandan y Wang 2012; Us-camas y col., 2014). El 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), el AIA (ácido indolacético) y el ANA (ácido naftalenacético) han sido señalados como los responsables de los incrementos en la metilación de la citosina que tiene lugar durante el cultivo in vitro. Los sectores del ADN, donde la citosina se encuentra metilada en posición 5 son considerados puntos calientes de mutación, ya que la desaminación de una 5-metil citosina origina el cambio de citosina a timina. Las auxinas naturales y sintéticas tienen una elevada correlación con el porcentaje de 5-metil citosina, las citoquininas parece no tienen efecto en este sentido (Cardone y col., 2010).

## 1.2 Técnicas empleadas en el estudio de la variación somaclonal

La variación somaclonal se puede detectar utilizando distintos tipos de marcadores (Bairu y col., 2011): i) morfológicos, como el color de las flores, la forma de la hoja o hábito de crecimiento, entre otros; ii) citológicos, relacionados con el número y estructura de los cromosomas; iii) bioquímicos, basados principalmente en el polimorfismo de proteínas de reserva o de isoenzimas (isoformas de enzimas específicas, con actividad por el mismo sustrato pero con diferente estructura molecular); y iv) moleculares, basados en el análisis de cambios genéticos o epigenéticos del ADN.

### 1.2.1 Marcadores morfológicos

En el estudio de la variación genética inducida por el cultivo de tejidos, los caracteres morfológicos fueron la primera evidencia en la detección de variación somaclonal. Sin embargo, debido a la poca variabilidad de estos marcadores y a las interacciones entre genes y genes/ambiente como, dominancia, pleiotropía y epistasia, el uso de los mismos ha sido muy limitado. Además, un fenotipo normal no garantiza la ausencia de variaciones genéticas y/o epigenéticas, ni la de uno anormal la existencia de mutaciones. Se sabe que muchas de las mutaciones son recesivas y están en heterocigosis, por lo que sólo se identifican estudiando la descendencia de las plantas regeneradas.

No obstante, la utilización de marcadores morfológicos para detectar variación somaclonal ha sido exitosa y citada en diversos trabajos de investigación. Así por ejemplo, el análisis visual y la utilización de un analizador de imágenes posibilitaron la diferenciación en la morfología de las hojas de plantas de patata obtenidas por micropropagación (Cassells y col., 1999) y en el cultivo *in vitro* de yemas de ananás se obtuvieron plantas que exhibían cambios estables en el tamaño del fruto, tasa de proliferación de vástagos y color y textura de las hojas (Feuser y col., 2003).

### 1.2.2 Marcadores citológicos

El estudio del cariotipo permite detectar cambios en el número y estructura de los cromosomas. De esta manera pueden detectarse translocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones originadas por el cultivo de tejidos (Lee y Philips, 1988). El análisis cariológico y la observación de alteraciones cromosómicas usando microscopía, han sido empleados con éxito para identificar variación somaclonal en plantas regeneradas (Al-Zahim y col., 1999;

Mujib y col., 2007). Esta técnica presenta importantes limitaciones como puede ser el número y tamaño de los cromosomas en determinadas especies.

Los cambios citológicos constituyen una fuente importante de variación que muchas veces es subestimada cuando únicamente se realizan recuentos cromosómicos. Por ello existen otras técnicas que estiman cambios cariotípicos con mayor eficiencia, como por ejemplo el bandeo cromosómico (Gould, 1982). Esta técnica se aplicó, porejemplo, en suspensiones celulares de *Brachycome dichromosomatica* (2n = 4) y permitió detectar reorganizaciones importantes en individuos donde el número cromosómico permaneció estable. Otras técnicas empleadas son la hibridación *in situ*, muy utilizada para identificar cambios estructurales (Rout y col., 1998), y la citometría de flujo que mide el contenido de ADN de núcleos en interfase (Nakano y col., 2006).

La mayoría de los cambios citológicos detectados en plantas regeneradas se relacionan con errores en la mitosis, en la meiosis y en la citocinesis (Linacero y Vázquez, 1992a; Yu-Jin y col., 2004;). En concreto, las alteraciones en la estructura de los cromosomas se atribuyen a roturas cromosómicas en regiones heterocromáticas seguidas, o no, de intercambios y reordenamientos cromosómicos (Lee y Phillips, 1988).

### 1.2.3 Marcadores isoenzimáticos

El uso de marcadores bioquímicos irrumpió en los años 70 como un método eficiente para estudios de variabilidad genética en plantas y han sido utilizados en análisis de filogenias, identificación de cultivares y como herramienta para determinar la variabilidad genética presente en poblaciones vegetales. La aplicación de técnicas electroforéticas para el análisis de proteínas totales e isoenzimas también ha permitido detectar cambios bioquímicos en plantas regeneradas de diferentes especies.

Las isoenzimas son formas moleculares diferentes de la misma enzima, con idéntica o similar especificidad por el sustrato (Market y Moller, 1959), las cuales representan el producto de diferentes alelos de un mismo locus o loci diferentes. Cada sistema isoenzimático tiene un comportamiento específico que depende del número de loci que lo codifica, nivel de ploidía de la especie, estructura cuaternaria de la enzima, polimerización intergenética, cambios postranscripcionales, genes modificadores y la ausencia de sustratos *in vivo* para su visualización (Gottlieb, 1981).

Aunque el análisis de los patrones isoenzimáticos proporciona un método alternativo para la detección de cambios genéticos, esta técnica se utiliza muy poco en la actualidad debido a que el número de marcadores disponible es pequeño, a la dificultad de interpretar correctamente determinados patrones isoenzimáticos y al hecho de que los patrones isoenzimáticos pueden cambiar durante el desarrollo de la planta y por el ambiente (Venkatachalam y col., 2007).

### 1.2.4. Marcadores de ADN

El desarrollo de los marcadores moleculares de ADN permitió revelar diferencias entre individuos basadas directamente en la secuencia nucleotídica de su ADN. A diferencia de los marcadores morfológicos y proteicos, los marcadores de ADN permiten realizar determinaciones sobre cualquier órgano y en cualquier estadio de desarrollo de la planta, sin estar afectados por el ambiente y pudiendo presentar un alto nivel de polimorfismo. El uso de los marcadores moleculares de ADN permitió el acceso a un rango de variabilidad mucho mayor del obtenido hasta el momento, abarcando tanto las regiones codificantes del genoma, como las que no los son (intrones, zonas de ADN repetitivo, pseudogenes, etc.).

Durante los últimos 20 años se han desarrollado diferentes técnicas moleculares que han sido utilizadas en estudios de evolución genética, poblaciones, ecología, mapeo genético o clonación de genes (Picca y col., 2004). Muchas de estas técnicas moleculares han sido también una herramienta útil para detectar variación somaclonal de una manera más precisa y a nivel de ADN (Polanco y Ruiz, 2002) y para determinar los niveles y los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal (Read y Preece, 2003).

Existe una gran diversidad y tipos de estos marcadores, unos basados en el uso de endonucleasas de restricción como los RFLP, (Restriction Fragment Length Polymorphism) otros basados en la amplificación del ADN por PCR (Polymerase Chain Reaction) entre los que se pueden nombrar los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), SCAR (Sequence Characterized Amplified Regions), CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence), SSR (Simple Sequence Repeats), o bien aquellos que necesitan del uso de endonucleasas de restricción y de PCR, como los AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). Muchos de estos tipos de marcadores se han usado con éxito para la detección de variación somaclonal en diversas especies de plantas (Bairu y col., 2011).

A continuación se describen con detalle aquellos marcadores basados en el análisis directo del ADN que se han empleado en el presente trabajo. En concreto, los marcadores AFLP que combinan el uso de endonucleasas y amplificación por PCR y sus derivados para el análisis de los estados de metilación, MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism) y metAFLP (methylated-AFLP), además de la técnica de "Transposon Display" (TD) y su adaptación para el análisis del estado de metilación de elementos transponibles (TMD).

### 1.2.4.1 Marcadores AFLP

A mediados de los años 90 se desarrollaron los marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphisms; Vos y col., 1995) basándose en la combinación de dos técnicas usadas en la generación de marcadores moleculares: la digestión con enzimas de restricción propia de los RFLPs y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Para obtener los marcadores AFLPs se emplean dos enzimas de restricción, una de corte frecuente y otra de corte poco frecuente, que generalmente son *Mse*I y *Eco*RI respectivamente. En un segundo paso, se realiza la unión de unos adaptadores de doble cadena en ambos extremos de los fragmentos generados. Finalmente, se realiza una amplificación de dichos segmentos de ADN con cebadores diseñados tomando en consideración las secuencias de los sitios de restricción de las enzimas y de los adaptadores empleados, sin necesidad del conocimiento previo de la secuencia del genoma de la especie que se desee estudiar. La amplificación de todos los fragmentos generados impediría, en la práctica, poder individualizarlos. Por ello, se amplifica únicamente un subconjunto usando cebadores a los que se les ha añadido en su extremo 3´ uno o más nucleótidos llamados selectivos, que reducen en una cuarta parte el número de fragmentos amplificados por cada nucleótido añadido.

Los fragmentos amplificados se visualizan mediante separación electroforética en geles de acrilamida o bien empleando electroforesis capilar si se ha usado marcaje con fluorocromos de uno de los cebadores selectivos. Usando combinaciones de cebadores con diferentes bases selectivas o empleando diferentes enzimas de restricción y sus correspondientes adaptadores, se puede disponer de un número ilimitado de marcadores (Vos y col., 1995).

Es importante destacar que en los geles de acrilamida los productos amplificados se presentan en forma de bandas, mientras que éstos se visualizan en forma de picos cuando se

emplea un secuenciador automático para realizar una electroforesis capilar, aunque la interpretación de ambos es la misma y suelen analizarse como marcadores dominantes respecto a la presencia o ausencia de cada fragmento amplificado. Se ha propuesto otro tipo de interpretación basada en programas de análisis de imagen, que podría permitir la asociación entre una mayor o menor intensidad de la banda o altura del pico y el carácter homocigoto o heterocigoto del marcador, haciendo posible para algunos casos interpretar los AFLPs como marcadores codominantes (Castiglioni y col., 1999).

Las principales ventajas de los AFLPs son la capacidad de obtener un número muy elevado de polimorfismos en relativamente poco tiempo y además hacerlo con un tipo de marcadores muy reproducibles. Por ello, son muy utilizados como marcadores genéticos, incluyendo análisis de variabilidad, búsqueda de marcadores ligados a genes de interés y cartografía génica a pesar de ser una metodología compleja y relativamente cara. También se han empleado en la detección de variación somaclonal en distintas especies de plantas, incluyendo *Arabidopsis thaliana* (Polanco y Ruiz, 2002), centeno (de la Puente et al., 2008) y arroz (Wang y col., 2013), y continúa siendo empleado de forma generalizada en este tipo de estudios (Zeng y col., 2010; Wang y Wang, 2012; Akash y col., 2013; Slazak y col., 2015).

#### 1.2.4.2 Marcadores MSAP y metAFLP

La técnica MSAP "Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism" es una adaptación de la técnica AFLP para el estudio de la metilación de citosinas (Reyna-López y col., 1997) que también recibe el nombre de MS-AFLP (Methylation Sensitive AFLP) por algunos autores (Schrey y col., 2013). Los marcadores MSAP, al igual que los AFLPs, consisten básicamente en la amplificación selectiva de fragmentos obtenidos en la digestión de DNA genómico con dos enzimas de restricción. Sin embargo, en este caso se digiere el DNA de cada muestra en dos reacciones independientes con dos endonucleasas en cada una de las reacciones, siendo una de las endonucleasas común. Las enzimas empleadas originalmente para los MSAP son las endonucleasas *Hpa*II y *Msp*I, como enzimas de corte frecuente añadidas cada una de ellas en una de las dos reacciones y *Eco*RI, como enzima de corte poco frecuente y común en las dos reacciones independientes. *Hpa*II y *Msp*I reconocen la misma secuencia diana 5'-CCGG-3' y se ven afectadas por la presencia de citosinas metiladas, pero tienen un comportamiento distinto según el estado de metilación concreto a nivel de doble cadena de dicho motivo.

Bednarek y col. (2007) emplearon una combinación diferente de enzimas para el análisis del estado de metilación usando *Mse*I como enzima de corte frecuente, y común en las dos reacciones independientes, y la pareja *Kpn*I y *Acc*65I que reconocen la secuencia diana 5'-GGTACC-3' como enzimas de corte poco frecuente y específicas en cada reacción de digestión. Esta combinación permite detectar de forma simultánea, al comparar distintas muestras, cambios producidos a nivel de secuencia y a nivel de metilación porque *Kpn*I no se ve afectada por metilación en la diana mientras que *Acc*65I si lo está (Bednarek y col., 2007). Dada la diferente interpretación de los resultados cuando se emplea esta última combinación de enzimas, Bednarek y col. (2007) propusieron la abreviatura metAFLP como específica para los marcadores obtenidos con esta metodología para diferenciarlos de los MSAP, obtenidos con *Hpa*II y *Msp*I.

Tanto para los marcadores MSAP como metAFLP, y al igual que en los AFLP, en un segundo paso posterior a la digestión del ADN y aprovechando los extremos cohesivos generados por el corte de las enzimas de restricción, se realiza la ligación de unos adaptadores que permitirán finalmente la amplificación de los fragmentos sin la necesidad de conocer previamente sus secuencias. También se emplean combinaciones de cebadores con diferentes bases selectivas para reducir el número final de fragmentos que se amplifican.

Uno de los cebadores selectivos ha de estar marcado para posibilitar la detección de los fragmentos amplificados. El protocolo original de AFLP de Vos y col. (1995) requería el uso de radioisótopos en geles desnaturalizantes de poliacrilamida, pero su uso implicaba la contaminación de la zona de trabajo y del termociclador empleado en las reacciones de amplificación, además del coste de equipamiento y manejo de material radiactivo, lo que hacía inaccesible esta técnica a un alto número de investigadores. Por ello, la alternativa que más se sigue empleando es el uso de la tinción de plata, pero el proceso de tinción es laborioso y difícil de controlar.

También se ha propuesto el uso de tinción con bromuro de etidio en geles no desnaturalizantes de acrilamida, pero se reduce enormemente el número de fragmentos visualizados ya que esta tinción requiere una mayor cantidad de DNA que cualquiera de las dos anteriores. Otra posibilidad es el empleo de marcaje con fluorocromos para la detección de MSAPs y metAFLPS que permite, por un lado, una sensibilidad semejante a la obtenida con radioisótopos y, por otro, la automatización del proceso mediante secuenciadores automáticos de DNA basados en el marcaje con fluorocromos. De esta manera, es posible

utilizar los equipos denominados analizadores genéticos o analizadores de fragmentos, ya que se ha desarrollado software específico para secuenciadores automáticos que permite el análisis simultáneo de fragmentos generados con diferentes combinaciones de cebadores específicos. Incluso también es posible la clonación de marcadores detectados por fluorescencia en electroforesis capilar (Polanco y col., 2005) poder aislar aquellos fragmentos que puedan ser de interés para poder realizar su posterior secuenciación, factor que podía inclinar hacia el empleo de marcaje radiactivo (Cho y col., 1996; Shan y col., 1999), tinción de plata (Briard y col., 2000; Thomas, 2004;) o bromuro de etidio (Cho y col., 1996).

Los investigadores no comenzaron a emplear la metodología MSAP para medir la metilación de los sitios 5'-CCGG-3' hasta pasados unos años de su publicación (Reyna-Lopez y col., 1997), siendo los primeros trabajos en cultivares de arroz (Ashikawa y col., 1999; Xiong y col., 1999), cambios de metilación asociados con micropropagación en banana (Peraza-Echevarria y col., 2001) y manzana (Xu y col., 2000), estudios de metilación en banana (Engelborghs y col., 2000), variación somaclonal en palmera de aceite (Matthes y col., 2001) y vernalización del trigo (Sherman y Talbert, 2002). Desde entonces son numerosos los trabajos que se han publicado en los que se analizan la variación en el estado de metilación, tanto presente de forma natural como producida por distintos tratamientos, empleando marcadores MSAP. Por su parte, los marcadores metAFLP son más recientes y se han empleado, hasta el momento, en unas pocas especies vegetales como son cebada (Bednarek y col., 2007), *Gentiana pannonica* (Fiuk y col., 2010) *Phyllostachys praecox* (Lu y col., 2012), *Poa annua* (Chwedorzewska and Bednarek 2012) y triticale (Machczynska y col., 2014b).

### 1.3 "Transposon Display" sensible a metilación (TMD)

La técnica de "Transposon Display" (TD) descrita por Casa y col. (2000) también denominada como S-SAP (Sequence-Specific Amplification Polymorphism) es una modificación de la técnica AFLP en la que uno de los cebadores selectivos es complementario a una secuencia conocida, y el otro cebador es uno de los usados habitualmente para la detección de AFLPs, es decir, complementario a la secuencia del adaptador de la enzima de restricción empleada. Esta técnica puede ser usada diseñando un cebador a partir de un LTR (Long Terminal Repeat) de un retrotransposón o a partir de secuencias conservadas de otros transposones presentes en el genoma vegetal.

Los marcadores TD son dominantes y permiten detectar variación de secuencia debida al sitio de inserción del retrotransposón LTR (presencia/ausencia del elemento), variación de la secuencia genómica que flanquea el elemento y variación de la secuencia del propio elemento (Ellis y col., 1998). Estos marcadores se han usado con éxito para analizar la activación, movilidad y diversidad de retrotransposones con diversos fines, incluyendo la evaluación de la variación somaclonal (Kalendar y col. 2011).

En el protocolo de la técnica "Transposon Display" sensible a metilación (TMD) se utilizan las mismas endonucleasas de restricción *Hpa*II y *Msp*I que se emplean para los marcadores MSAP, permitiendo obtener diferentes fragmentos en cada reacción según el estado de metilación de las citosinas en los sitios 5'-CCGG-3' que se encuentren flanqueando las zonas de inserción de los transposones que se analicen (Kashkush y Khasdan, 2007). Para ello, en la amplificación selectiva, se sustituye uno de los dos cebadores con bases selectivas por otro específico de la secuencia que se quiere amplificar, siendo el caso más común un cebador derivado de la región LTR de un retrotransposón.

Existen diversas técnicas que también utilizan las características de los retrotransposones LTR para generar marcadores moleculares altamente informativos, entre las que se pueden nombrar: Los IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) que son marcadores que se basan en la amplificación de la zona que se encuentra entre dos retrotransposones situados próximos y en orientaciones opuestas en el genoma; los REMAP (Retrotransposon-Microsatellite Amplified Polymorphism) que detectan polimorfismos entre la zona amplificada comprendida entre un retrotransposon y una repetición de tipo microsatélite o SSR (Kalendar y col., 1999); los RBIP (Retrotransposon-Based Insertion Polymorphism) que utilizan como cebadores una secuencia del retrotransposon y una secuencia del DNA flanqueante a este elemento (Flavell y col., 1998); los RVIP (Retrotransposon Internal Variation Polymorphism) que utilizan como cebadores secuencias internas a los retrotransposones, y sirven para revelar variaciones en la estructura interna de las diferentes copias de un elemento o familia (Vershinin y Ellis, 1999).

### 1.4 Metilación del ADN en plantas

Se ha comprobado que la variación somaclonal está relacionada con modificaciones en los patrones de metilación de las líneas celulares y en ocasiones, de las plantas regeneradas (Kubis y col., 2003). Como hemos indicado anteriormente, las plantas regeneradas muestran

un amplio rango de variabilidad, que va desde las mutaciones a cambios temporales en el fenotipo. Los cambios en la metilación del ADN provocan, en algunas ocasiones, cambios permanentes en la expresión génica que se manifiestan en el fenotipo. La metilación del ADN en las plantas está relacionada con la regulación de la expresión genética, defensa de la integridad del genoma, la diferenciación celular, la inactivación de la cromatina y la impronta genética (Smulders y Klerk, 2011).

La metilación del ADN es un proceso dinámico y eficientemente regulado, de tal forma que las secuencias no metiladas pueden ser metiladas pero también los grupos metilo pueden perderse, por lo que los patrones de metilación de las células somáticas son el resultado de ambas actividades, metilación y desmetilación. En plantas, la metilación ocurre en secuencias simétricas CG y CHG (donde H es adenina, citosina o timina) y asimétricas CHH teniendo cada una de ellas requerimientos distintos para el mantenimiento de su estado de metilación (Chan et al., 2005). En *Arabidopsis thaliana* los niveles de metilación observados son aproximadamente del 24 %, 6,7 % y 1.7% para los motivos CG, CHG y CHH, respectivamente (Cokus y col., 2008). En las plantas la metilación tiene lugar principalmente en transposones y otros elementos repetidos (Zhang y col., 2006).

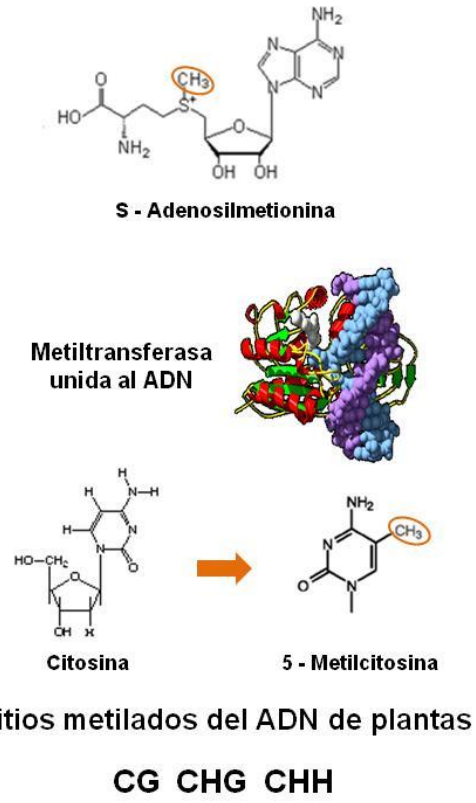


**Figura 1.3.** Reacción de metilación catalizada por las ADN-metiltransferasas.

La metilación del ADN consiste en la adición post-síntesis de un grupo metilo en la posición 5' del anillo pirimidínico de la citosina. Las enzimas que llevan cabo esta transformación catalizan la transferencia del grupo metilo procedente de la S-adenosilmetionina (SAM) y se denominan ADN-metiltransferasas (Figura 1.3).

En plantas, la metilación de *novo* está catalizada por la enzima DRM2 (metiltransferasa reorganizadora de dominios 2) que es un homólogo de las metiltransferasas DNMT3 de mamíferos. El mantenimiento de la metilación ocurre por tres vías diferentes: i) La enzima MET1 (también conocida como DMT1, metiltransferasa de ADN 1) que es la homóloga en plantas de la DNMT1, se encarga de mantener la metilación de grupos CG. ii) Por su parte, la CMT3 (cromometilasa 3) mantiene metiladas las citosinas de las secuencias CHG y iii) mediante una metilación persistente de *novo* por DRM2 se mantiene la metilación de las secuencias asimétricas CHH (Chan y col., 2005). Sin embargo, las rutas que controlan el establecimiento y mantenimiento de la metilación del ADN, así como las involucradas en la eliminación de dicha metilación, están menos caracterizadas (Law y Jacobsen, 2010).

La importancia de la metilación en las plantas es obvia dado que los genes constituyen tan solo una pequeña parte de la porción total del genoma y el control preciso de su expresión constituye un problema sustancial de regulación. El ADN no codificante que contiene intrones, elementos repetitivos y elementos activos de transposición requiere un sistema de silenciamiento a largo plazo. El genoma de las plantas contiene un gran número de elementos transponibles, la mayoría de ellos silenciados o inactivados y se propone que es precisamente la metilación de citosinas la que suprime la actividad de estos elementos (Cañal y col., 2003). Lo mismo ocurre con secuencias transgénicas donde la inactivación puede ocurrir, bien porque la metilación ocurra en el promotor del transgén o por modificación de la estructura de la cromatina que haga inaccesible la entrada de la maquinaria de transcripción. La metilación en plantas también está involucrada en el fenómeno de impronta genética, es decir, la expresión alélica dependiente del parental asociado a dicho alelo (Ruiz-García y col., 2005).

Los elementos de transposición (TE) y sus derivados son los principales objetivos del silenciamiento epigenético en las plantas y la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y los micro-ARN participan en el mantenimiento de la represión de los elementos de transposición (Rigal y Mathieu, 2011; Slotkin y col., 2012). Las rutas de metilación y desmetilación interactúan, indicando que las plantas poseen un sistema de defensa de la

transposición altamente sofisticado que además juega un importante papel en la regulación de la expresión génica (Kim y Zilberman, 2014).

En *A. thaliana*, aproximadamente un tercio de los genes presentan metilación CG en sus zonas codificantes, mantenida por la enzima MET1 (también conocida como DMT1, metiltransferasa de ADN 1). A diferencia de la metilación de los transposones, esta metilación CG no parece causar silenciamiento, dado que dichos genes metilados se expresan de forma moderada en muchos tejidos. Esta presencia de metilación CG en zonas codificantes también se ha observado en invertebrados, sugiriendo que pueda ser una característica común de genomas eucarióticos (Furner y Matzke, 2011). Los estudios iniciales en *A. thaliana* parecen indicar que esta metilación podría suprimir la producción de transcritos antisentido desde promotores crípticos, aunque también se han encontrado resultados en los que no aumentan dichos transcritos antisentido en mutantes *MET1*, por lo que la función de la metilación de las zonas codificantes permanece aún poco precisa (Law y Jacobsen, 2010).

Aunque en la mayoría de los casos la metilación del DNA es un marcador epigenético estable, se han observado niveles reducidos de metilación durante el desarrollo de mamíferos y plantas. Esta pérdida neta de metilación se ha documentado que pude ocurrir tanto de forma pasiva por ausencia funcional de rutas de mantenimiento de metilación durante la replicación del ADN, como de forma activa mediante la eliminación de citosinas metiladas. En plantas, la desmetilación activa ocurre por actividad de las DNA glicosilasas, probablemente en combinación con el mecanismo de reparación por excisión de bases (Zhu, 2009).

Las diferencias en los patrones de metilación del ADN entre ecotipos diferentes de plantas son de gran importancia para la comprensión del control genético de metilación del ADN. En tal sentido, Furner y Matzke (2011) mencionan que las diferencias en los patrones de metilación no son aleatorias y puede ocurrir que ciertas secuencias nucleotídicas sean frecuentemente metiladas y otras raramente metiladas. Una vez establecida la premisa de que la metilación no es estática y que potencialmente puede cambiar en respuesta al desarrollo o estímulos relacionados con el ambiente, pueden ocurrir cambios de la expresión génica por modificaciones en los patrones de metilación, bien de forma pasiva debido a la falta de mantenimiento en la metilación del ADN a través del mecanismo de replicación o bien activamente, a través de la acción de enzimas con actividad glicosilasa que eliminen los grupos metilo o de metiltransferasas que los incorporen. Los estudios genéticos han revelado detalles que permiten una mejor compresión acerca de los patrones y cambios dinámicos de la

metilación del ADN en las plantas como *A. thaliana*. Además, su estudio ha contribuido a la identificación de los genes involucrados en los mecanismos de metilación y desmetilación y el entendimiento del silenciamiento génico y su relación con los elementos transponibles, entre otros.

### 1.5 Elementos transponibles

Los elementos transponibles (TE, Transposable Elements) son fragmentos de ADN que tienen la capacidad de movilizarse y multiplicarse dentro de los genomas, es decir, los TEs tienen la capacidad de separarse de una posición en el genoma y reinsertarse en otra, incluso ser copiados e insertados en distintos lugares del genoma, de forma autónoma o utilizando enzimas codificadas en otros TEs. McClintock (1948) realizó el descubrimiento de los elementos transponibles en su trabajo sobre la inestabilidad cromosómica y la variegación observada en el maíz, planteando la existencia de unos elementos que podrían causar inestabilidad cromosómica. Ella observó que estos elementos se movilizaban entre múltiples genes activando o reprimiendo la expresión de los mismos. Años más tarde se realizó la primera caracterización molecular de un elemento transponible (Jordan y col., 1967) lo cual marcó el inicio en la profundización de los estudios y caracterización de los elementos genéticos móviles.

La gran diversidad de estos fragmentos en diferentes organismos ha hecho difícil un consenso científico en cuanto a los criterios utilizados para clasificarlos. En este sentido se encuentran en la literatura varios sistemas que buscan resolver este inconveniente. Finnegan (1989) propuso un primer sistema de clasificación basado en el mecanismo de transposición; posteriormente Hull (2001) realizó una nomenclatura taxonómica similar a la utilizada en tipos virales, definiendo así varios grupos de retrotransposones. Capy (2005) apoyado en su propuesta de 1997, realizó una síntesis de la nomenclatura existente basándose en el modo en que se transponen, clasificándolos así en dos grandes grupos: los TE clase I o retrotransposones en los cuales su intermediario para la transposición es el ARN (modo replicativo) y los TE clase II o transposones de ADN en el cual es el propio ADN el que se moviliza (modo conservativo).

Teniendo en cuenta la rapidez con la que se describen nuevas secuencias de TEs con diferentes mecanismos de transposición, así como también el descubrimiento de TEs no autónomos como los MITEs (Miniature Inverted Repeat Transposable Elements), se han

generado múltiples adaptaciones a partir de la clasificación original de Finnegan (1989). A continuación se describirá brevemente la propuesta realizada por Wicker y col. (2007) esquematizada en la Figura 1.4.

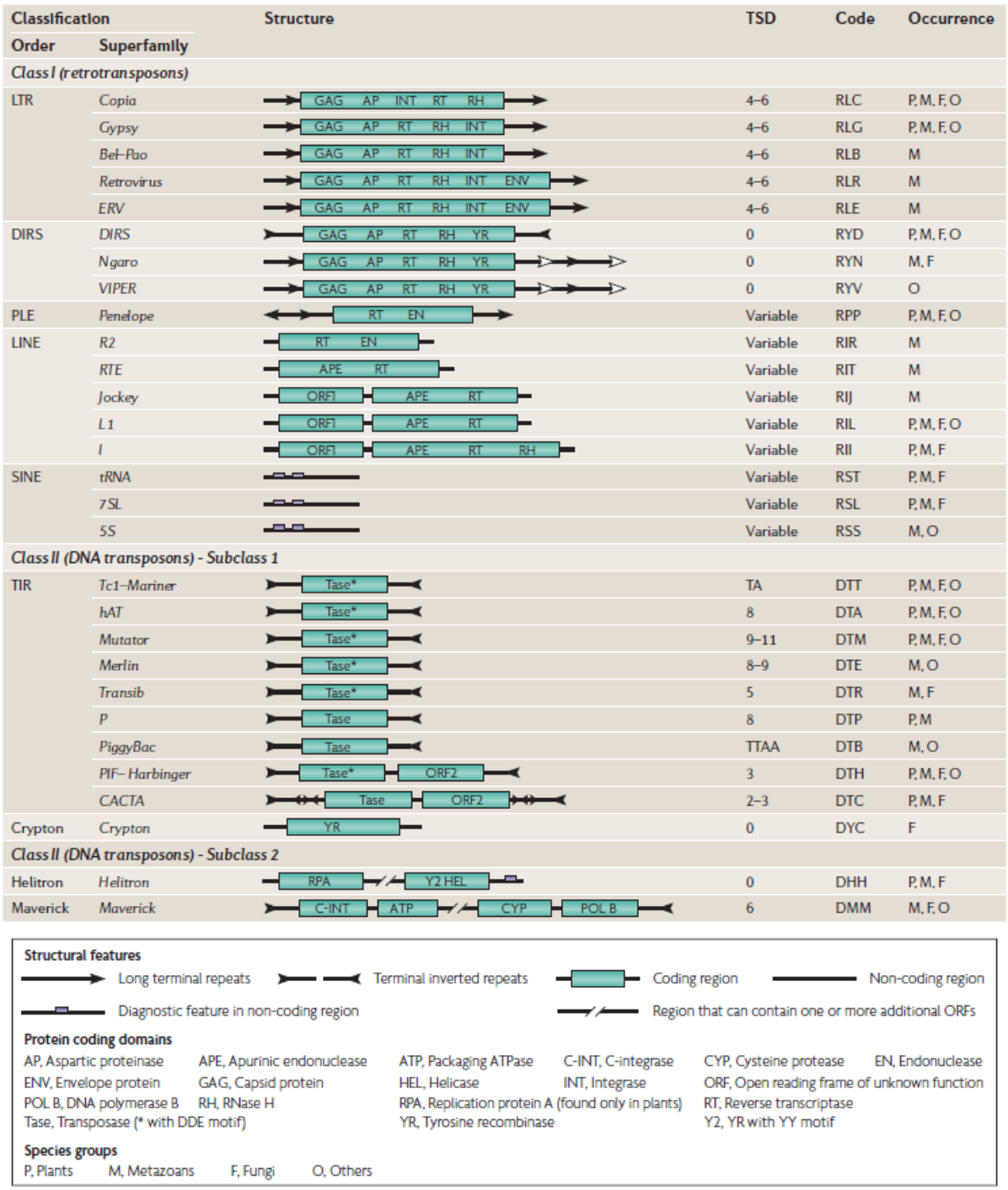


**Figura 1.4.** Clasificación de los elementos transponibles (tomado de Wicker y col., 2007).

### 1.5.1 Elementos transponibles de clase I (retrotransposones)

Estos elementos móviles también son llamados retroelementos y necesitan una transcriptasa inversa para su movilización. Así, el ADN correspondiente al transposón se transcribe a ARN y es inversamente transcrito, siendo el ADN copia el que se integra en la nueva localización. Este modo replicativo de transposición de los retroelementos que integra nuevas copias vía un intermediario de ARN, induce a un incremento rápido del número de copias de los elementos en el genoma. Wicker y col. (2007) han clasificado estos elementos en cinco ordenes basados en la organización y filogenia de su transcriptasa reversa, estos son: LTR, LINE, SINE, DIRS y PLE.

Los retrotransposones con LTR (Long Terminal Repeat) en los extremos del elemento, son el orden predominante en las plantas y se clasifican en tres superfamilias: *Copia, Gypsy y Bel*, diferenciadas tanto estructuralmente como por el grado de homología de las secuencias de su transcriptasa reversa. Los LTRs se caracterizan por comenzar su secuencia por 5´-TG-3´ y terminar con 5´-CA-3´, las cuales flanquean la región interna codificante y su longitud puede encontrarse desde las 100 pb hasta varias kb. También contienen secuencias cortas duplicadas en los extremos (TSD, Target site duplications) que pueden tener entre 4 y 6 pb, además presentan un marco abierto de lectura o ORF (Open reading frame) para el gen *Gag* que codifica una proteína estructural (involucrado en formación de partículas similares a las virales) y otro ORF para el gen *Pol*, situado siempre a continuación del gen *Gag*, que codifica para diferentes actividades enzimáticas entre las que se pueden nombrar: proteasa, transcriptasa inversa, ARNsa e integrasa.

Los elementos *LINEs* (Long Interspersed Elements) son menos abundantes en plantas, no presentan LTR, algunos son autónomos ya que poseen un ORF que codifica para *Pol* y otras presentan ORF homólogos a los genes *Gag*, aunque su actividad no está del todo clara. Otros pueden presentar una cola poliadenilada o regiones ricas en adeninas en su extremo 3´. El sistema por el que se integran los *LINEs* involucra una rotura del ADN que es utilizada como cebador en la transcripción inversa del ARN transcrito.

Los elementos *SINEs* (Short Interspersed Nuclear Elementes) no presentan LTR ni un marco abierto de lectura ORF así que no codifican para ninguna proteína implicada en su transposición, presentan un promotor interno de una polimerasa III que permite que se transcriban utilizando la maquinaria de transcripción de los *LINEs* cercanos. Generalmente

estos elementos son menores a 500 pb siendo las secuencias *Alu* de estos elementos las más abundantes y mejor conocidas en el genoma humano.

Los elementos *DIRs* carecen de LTRs pero si presentan repeticiones terminales invertidas (TIRs, Terminal Inverted Repeats) y un marco abierto de lectura ORF para los genes *Gag* y *Pol*; es importante destacar que estos codifican para una tirosina-recombinasa y no para una integrasa, razón por la cual carecen de secuencias cortas duplicadas TSDs. Dentro de este orden se establecen tres superfamilias: *DIRS, Ngaro* y *VIPER* diferenciados por análisis genético de las enzimas transcriptasas inversas y ribonucleasas.

Los elementos del tipo *PLE* (Penelope Like Element) poseen un ORF que codifica para transcriptasas inversas de los retrotransposones con LTRs o del tipo *LINE*, más relacionadas con la telomerasa. Adicionalmente también codifican para una endonucleasa homologa a las codificadas por algunos intrones y a una proteína llamada UvrC que está involucrada en la reparación del ADN de las bacterias.

### 1.5.2 Elementos transponibles de clase II (Transposones de ADN)

Los transposones de ADN presentan un sistema por el cual se mueven directamente a través de un intermediario de ADN, mediante escisiones que son insertadas en distinto sitio, a través de un mecanismo de corte y pega. De esta forma, su número de copias no aumentan en el genoma huésped. Presentan repeticiones terminales invertidas (TIR, Terminal Inverted Repeated), reconocidas por la enzima transposasa que cataliza posteriormente la movilización de estos elementos. Esta clase se ha subdividido en subclase I y subclase II.

Los elementos de la subclase I se han subdivido en dos órdenes: *TIR* y *Crypton*; el primero se caracteriza por tener un marco abierto de lectura ORF que codifican para una transposasa y el segundo tiene la capacidad de codificar para una triosin-recombinasa caracterizado por no presentar repeticiones terminales invertidas TIRs.

Los elementos de la subclase II, cuyo mecanismo de movilización lo realizan cortando una de las dos cadenas de ADN, se han subdivido en dos órdenes: *Helitron* y *Maverick*; los primeros se caracterizan por la ausencia de TIRs y se multiplican por el mecanismo del circulo rodante, codificando para Y2-tirosin-recombinasa y para una proteína de unión de cadena simple; los segundos, se caracterizan por presentar TIRs y codifican para una ADN

polimerasa B y para una integrasa, su mecanismo de movilización lo realizan cortando el ADN y se replican de forma extracromosómica para ser integrados posteriormente.

También hay que mencionar a los *MITE* (Miniature Inverted-repeat Transposable Element) que son un tipo especial de elementos transponibles de pequeño tamaño (de 100 a 700 pb) y que son estructuralmente como TE de clase II. Éstos presentan TIR y no tienen capacidad codificante. Sin embargo, parecen tener un tipo de movilización replicativa propia de TE de clase I, ya que se encuentran en un número muy elevado de copias; además cada subfamilia de *MITE* está muy conservada a nivel de tamaño y secuencia. Varios autores han reportado que posiblemente los *MITEs* se movilizan por la actividad de otros elementos denominados *PONG*, los cuales codifican para una transposasa de la familia *PIF/Harbinger*.

Desde hace más de una década, diversos autores han reportado la presencia y posterior caracterización de un gran número de elementos transponibles en muchas especies vegetales y han puesto de manifiesto la importancia del rol que desempeñan en la evolución de las plantas (Todorovska, 2007). Así mismo, otros investigadores también han reportado sus avances en la identificación y evaluación de retrotransposones en varios organismos vegetales como avena (Bayram y col. 2012), maíz (Casa y col. 2002), arroz (Hirochika, 1996; Feschotte y col., 2003; Tsugane y col., 2006; Miyao y col., 2012) y *A. thaliana* (Hollister y col., 2011; Matsunaga y col., 2012; Park y col., 2014;) entre otros.

A partir del descubrimiento de los TE se sugirió una posible relación entre la variación somaclonal y los elementos móviles (Lee y Phillips 1988). Ahora se sabe que los elementos transponibles, están presentes de manera extendida dentro de los genomas vegetales, siendo la mayor clase de ADN repetitivo disperso en los mismos. Las secuencias de retrotransposones de clase I están dispersas a todo lo largo de la eucromatina, de forma aleatoria y de forma no aleatoria dependiendo tanto de la especie vegetal así como también del tipo de elemento móvil estudiado (Heslop-Harrison y col. 1997). Por otra parte, algunos elementos están presentes en poca cantidad o incluso ausentes en ciertas regiones como centrómeros, regiones heterocromáticas intersticiales y terminales y sitios de ADN ribosomal (Kumar y Bennetzen, 1999). Además, los elementos transponibles pueden inducir mutaciones relativamente estables ya que se transponen vía replicación, reteniendo la secuencia en el sitio de inserción. Estas mutaciones pueden ser causa de inactivación génica o alteraciones en los patrones de expresión de los genes, o de la estructura de las proteínas que codifican. Así que es probable que los genomas que contienen un gran número de elementos transponibles sean más

inestables bajo condiciones *in vitro* que aquellos que no los contengan, o los tienen en menor cantidad (Karp, 1995).

### 1.6 *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

**Figura 1.5.** *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

La especie *A. thaliana* (Figura 1.5) fue descrita en el siglo XVI por Johannes Thal, de quien procede su actual nombre específico, aunque fue llamada inicialmente *Pilosella siliquosa*. Desde entonces ha pasado por una serie de cambios de nombre, siendo en 1841 renombrada como *Arabidopsis thaliana* por el botánico alemán Gustav Heynhold. Su número cromosómico, 2n=10, fue correctamente determinado por Laibach (1907).

A partir de mediados del siglo XX, esta especie comenzó a ser utilizada en diferentes estudios de tal forma que el propio Laibach fue el primer investigador en dar a conocer el potencial de *A. thaliana* como modelo biológico al describir su fecundidad, facilidad para realizar cruzamientos, corto tiempo por generación y la posibilidad de mutagénesis (Laibach, 1943). En el año 1945 en el laboratorio de Leibach, usando rayos X, se obtuvo la primera colección de mutantes para esta especie y ya en la década de 1950 quedó establecida la importancia de esta especie para los estudios genéticos. En la actualidad es ampliamente utilizada para estudios botánicos, citogenéticos, evolutivos, poblacionales así como también el estudio de estructura celular y molecular.

Además, sus características morfológicas, anatómicas y fisiológicas le proporcionan ventajas para ser utilizada como especie modelo. Así, su porte bajo permite maximizar la cantidad de plantas utilizadas por unidad de área, su ciclo de vida es corto cuando se cultiva con luz continua a 25 ºC, pudiéndose obtener una alta producción de semillas (hasta 5.000 semillas por individuo) las cuales permanecen viables por varios años y su condición de autogamia permite que los genes recesivos puedan expresarse con mayor facilidad (Meinke y col., 1998). Esta especie es de crecimiento rápido, permitiendo obtener numerosas

generaciones en periodos de tiempo relativamente cortos, lo que facilita el análisis genético. Otro aspecto de gran importancia dentro de las ventajas genéticas de *A. thaliana* consiste en que esta especie puede ser transformada con *Agrobacterium tumefaciens* de manera muy eficiente (Labra y col., 2004).

La mayoría de los procesos biológicos que ocurren en especies de importancia económica también se producen en *A. thaliana*. Un ejemplo de ello se puede apreciar en la comparación realizada entre el proteoma de *A. thaliana* y el de arroz, comprobando que el 71% de las proteínas que posee el arroz se observan también en *A. thaliana* lo que sugiere que muchas de las funciones celulares y bioquímicas en el arroz, así como también en otros cultivos, puedan ser establecidas a partir de experimentos previos realizados con *A. Thaliana* (De la Torre y Silva, 2008). Por lo tanto, la determinación de las relaciones ortólogas entre *A. thaliana* y especies de importancia económica, hace factible en gran medida, transferir la información obtenida en un organismo modelo para un mayor entendimiento del comportamiento de otros organismo bajo una condición determinada.

Uno de los aspectos más importantes a considerar, es que posee un genoma muy pequeño de aproximadamente 135 Mb, con un número de cromosomas haploide de cinco (n = 5). Existen mapas genéticos y físicos de sus cinco cromosomas (Serrano-Cartagena y col., 1999; Bevan y Walsh 2005) y fue la primera planta y el tercer organismo multicelular, después de *Caenorhabditis elegans* y *Drosophila melanogaster*, en ser secuenciado completamente (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). El genoma de *A. thaliana* es cuatro veces menor que el del arroz y 130 veces menor que el del trigo. La densidad de genes es mayor en *A. thaliana* que en el arroz y el maíz, estando alrededor del 85% de su genoma compuesto por genes funcionales, a diferencia del trigo donde solo el 1% del genoma son genes funcionales y el resto son secuencias no codificantes (Devos y Gale, 2000). Este hecho hace que la secuenciación, aislamiento y, por ende, la comprensión de las funciones de cada gen de *A. thaliana* se pueda realizar con mayor rapidez y eficacia que en otras especies.

Cervera y col. (2002) empleando marcadores MSAP estudiaron la variabilidad existente en el estado de metilación de los sitios 5'-CCGG-3' en el genoma de diez ecotipos de *Arabidopsis thaliana*, comprobando que el patrón de metilación entre plantas pertenecientes al mismo ecotipo resultó altamente conservado. Sin embargo, la comparación por parejas de los patrones de metilación de plantas pertenecientes a diferentes ecotipos mostró un 34% de variabilidad revelando la presencia de un importante nivel de variación natural. Ruiz-García y

col. (2005) también utilizaron la técnica de obtención de marcadores MSAP para analizar la estabilidad de la metilación del ADN durante el desarrollo de *A. thaliana*, concluyendo que los cambios de metilación desempeñan un papel importante en el mantenimiento del estado de desarrollo en la planta existiendo una tendencia progresiva al incremento de metilación desde los cotiledones a los órganos vegetativos y los reproductivos.

### 1.6.1 Variación somaclonal en *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh

En *A. thaliana* las técnicas de cultivo *in vitro* se han desarrollado ampliamente, aunque especialmente dirigidas hacia la obtención de plantas transgénicas, por lo que sedispone de protocolos eficientes de regeneración de plantas (Gaj, 2001; Barkla y col., 2014). La mayoría de los estudios realizados sobre variación somaclonal en esta especie se refieren a cambios morfológicos, citológicos y, en menor frecuencia, a cambios bioquímicos y moleculares que se han detectado analizando plantas regeneradas y células de callos. Se ha descrito la presencia de mutaciones clorofílicas, embriones letales, así como plantas poliploides (Gaj y Maluszynsky, 1987). *A. thaliana* es una especie polisomática con tejidos somáticos mixoploides y tejidos meristemáticos diploides (Galbraith y col., 1991) siendo frecuente la regeneración de plantas poliploides. También es sabido que la presencia de más de dos juegos cromosómicos en plantas transgénicas de *Arabidopsis* puede inducir al silenciamiento epigenético de los transgenes (Mittelsten Scheid y col., 1996).

Altmann y col. (1994) describieron que muchas de las plantas regeneradas transgénicas obtenidas de plantas diploides de *A. thaliana* eran poliploides y aneuploides de tal forma que el nivel de variación somaclonal dependía del proceso de transformación y del tipo de explante utilizados. Posiblemente debido a la naturaleza mixoploide de los explantes, Sangwan y col. (1992) cultivando *in vitro* embriones cigóticos de *Arabidopsis* obtuvieron un 4% de plantas regeneradas tetraploides, mientras que las plantas restantes fueron diploides.

Los niveles de ploidía observados en las células de los callos no siempre se corresponden con los encontrados en las plantas regeneradas. Fras y Maluszynska (2003) estudiaron callos originados de explantes diploides y tetraploides observando células 2X-8X y 4X-14X, respectivamente, pero las plantas regeneradas fueron únicamente diploides, triploides y tetraploides. Otros autores han demostrado que la frecuencia y nivel de poliploidización encontrados en células de callo de *A. thaliana* están relacionados con el

ecotipo al que pertenece la plantas de las que se toman los explantes (Fras y Maluszynska, 2004).

Fras y col. (2007) identificaron que los procesos que conducen a la poliploidización temprana de las células de los callo en *Arabidopsis* son endorreduplicación preexistente en las células de los explantes, endomitosis, reordenamientos anormales de los microtúbulos del huso, endorreduplicación inducida por el cultivo *in vitro* y daños en el DNA.

Un análisis realizado en células de *Arabidopsis* mantenidas en suspensión durante más de siete años reveló que el cultivo era mixoploide y que la cantidad de ADN en las células variaba de 4 a 16 C (Sedov y col. 2014). Sin embargo, estos cambios no ser vieron acompañados por un nivel elevado de polimorfismos en la secuencia de ADN en marcadores RAPD e ISSR.

Existen pocos datos publicados respecto a la variabilidad a nivel de ADN que genera el cultivo de células y tejidos de *A. thaliana* (Polanco y Ruiz, 2002; Labra y col. 2004; Jiang y col. 2011; Sedov y col. 2014). Polanco y Ruiz (2002) realizaron un análisis de marcadores AFLP (amplified fragment length polymorphisms) con el fin de evaluar la variación de ADN entre plantas de *A. thaliana* regeneradas a través de organogénesis a partir de explantes de raíz. Analizaron un total de 778 marcadores AFLP obtenidos con 12 combinaciones de cebadores, en 51 plantas regeneradas provenientes de cinco callos diferentes. El 66,6% de las plantas mostró al menos una variación al ser comparadas con las plantas regeneradas del mismo callo, el número de mutaciones observadas varió para cada planta de uno a 18 y la proporción media de fragmentos AFLP compartidos fue mayor del 99,4%. La distribución de la variación entre las plantas regeneradas fue diferente y sólo tres plantas regeneradas acumularon el 40% de las variaciones observadas de tal forma que el porcentaje de fragmentos polimórficos osciló entre el 0,15 % y el 5,2 %. Los valores de la diversidad nucleotídica estimados, para cada grupo de plantas regeneradas, fue de dos a tres órdenes de magnitud menores que la variación natural descrita para distintos ecotipos de *A. thaliana*.

Labra y col (2004) utilizaron marcadores AFLP y RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) para analizar los cambios a nivel de ADN que presentaban plantas transgénicas de *Arabidopsis* obtenidas por infiltración directa de *Agrobacterium* en las flores sin necesidad de procesos de cultivo *in vitro* frente a plantas regeneradas derivadas de callo y plantas control no regeneradas. Únicamente los AFLP mostraron polimorfismos, que

se detectaron con una frecuencia similar y muy baja (de 0,4 %al 1,39 %) tanto en las plantas transgénicas obtenidas por infiltración como en las plantas regeneradas pero que fueron mucho más frecuentes en las plantas regeneradas (6,16 %).

El análisis mediante secuenciación masiva de nueva generación (NGS, usando lecturas paired-end de 76 nucleótidos) de una planta progenitora y cinco plantas R1 de *Arabidopsis* obtenidas por organogénesis a partir de un explante de raíz, permitió a Jiang y col. (2011) detectar cambios nucleotídicos en el genoma (SNPs y pequeñas inserciones y deleciones) y calcular la tasa de mutación que genera el cultivo in vitro que estaría incrementada entre 60 y 350 veces respecto a la tasa de mutación espontánea en plantas propagadas sexualmente. El análisis de incremento de número de copia para 3321 secuencias de transposones de tipo *CACTA*, *COPIA*, *gypsy*, *hAT* y no *LTR* no reveló ninguna nueva amplificación detectable de transposones, por lo que estos autores concluyen que la inserción de transposones en genes es poco probable que contribuya a la variación fenotípica observada en plantas regeneradas de *Arabidopsis*.

### 1.7 Arroz (*Oryza sativa* L.)

**Figura 1.6.** *Oryza sativa* L.

El arroz, *Oryza sativa* L. (Figura 1.6) es el segundo cereal más consumido en el mundo siendo el alimento básico de más de la mitad de la población mundial. Después del trigo y el maíz, el arroz es el cereal con más superficie cultivada, se produce en 113 países y es el principal sustento de gran parte de la población asiática, africana y latinoamericana. La introducción del arroz en España se atribuye a los árabes durante el siglo VIII. Posteriormente en el siglo XV se propagó a Italia y Francia, y tras los descubrimientos protagonizados por conquistadores europeos, se implantó en todos los continentes.

La superficie mundial del arroz alcanza cerca de 180 millones de hectáreas, de las que un 90 % se sitúa en Asia, con una producción de arroz cáscara de unos 750 millones de

toneladas en 2014 (equivalente a 450 millones de arroz blanco) de acuerdo a los datos de FAOSTAT (http://faostat3.fao.org). España dedica algo más de 100.000 hectáreas, siendo el segundo mayor productor de arroz en Europa (30 %) por detrás de Italia (50 % de la producción). Aproximadamente el 65 % de la producción de arroz en España corresponde a variedades del tipo índica, de grano largo o semilargo, que se producen en Andalucía y Extremadura y se exportan casi en su totalidad y el otro 35 % de la producción corresponde a variedades del tipo *japonica*, de grano corto y redondo, destinada al consumo interno ya que es el tipo de arroz más utilizado en España (Datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; http://www.magrama.gob.es).

De Candolle (1883) propone que *O. sativa* es una especie originaria del sur de la India, donde se encuentra la mayor variabilidad genética y existen las condiciones naturales más favorables para su cultivo, como son suelos pantanosos e inundaciones periódicas. Sin embargo, Quirós (2003) plantea que existen evidencias que indican que *O. sativa* sí es originaria de Asia, pero que no se conocen con certeza datos sobre su domesticación. Sin embargo, se cree que su domesticación se inició hace más de 5.000 años dado que en China se han encontrado muestras de arroz que datan del año 6.500 a. C. y la evidencia arqueológica más antigua de la India se remonta al año 2.500 a. C.

La especie *O. sativa* está diferenciada en tres subespecies basadas en sus condiciones geográficas, siendo estas indica, javánica y *japonica*. La subespecie índica se refiere a las variedades tropicales y subtropicales, javánica designa a los arroces bulu (aristado) y gundil (sin aristas) con panículas largas y granos bien delineados que crecen a lo largo de las regiones índicas en Indonesia y *japonica* se refiere a las variedades de granos pequeños y redondeados de las zonas templadas (Hancock, 2005; Ali y col., 2010).

Desde el punto de vista de sus características genéticas, el arroz posee el genoma más pequeño de todos los cereales cultivados con aproximadamente 430 Mb distribuidos en 12 cromosomas (2n = 24).Su alta estabilidad genética, la eficiente transformación y el desarrollo de mapas genéticos altamente saturados, hacen de este cultivo un modelo para estudios fisiológicos, genéticos y evolutivos.

El interés que presenta el genoma del arroz queda reflejado en el hecho de que fue la primera planta cultivada en la fue secuenciado. Los primeros borradores fueron publicados en el año 2002, tanto por el Instituto de Genómica de Beijing para la subespecie indica (Yu y

col., 2002) como por Syngenta y el IRGSP (a partir de datos previos facilitados por la compañía Monsanto) para la subespecie Japónica variedad Nipponbare (Goff y col., 2002). Recientemente se ha publicado la resecuenciación del genoma de una colección de 3000 accesiones de arroz procedentes de 89 países que ha permitido la anotación de 18,9 millones de polimorfismos de tipo SNP respecto al genoma de referencia de la variedad Nipponbare (Li y col., 2014).

### 1.7.1 Variación somaclonal en *Oryza sativa* L.

Los primeros datos sobre variación somaclonal en arroz fueron publicados por Nishi y col. (1968), Heinz y Mee (1969) y Oono (1978) y desde entonces son numerosos los trabajos realizados en este campo. Las plantas regeneradas *in vitro* de arroz muestran, con alta frecuencia, alteraciones fenotípicas, habiéndose descrito la presencia de variación somaclonal en diversos caracteres de interés agronómico como la tasa de germinación, el periodo de crecimiento, la altura de la planta, la resistencia a *Pyricularia oryzae*, la pigmentación del ápice de las spikelets y el número de granos por panícula (Dogbe 1990). También se identificaron mutantes somáticos relacionados con los caracteres altura de la planta, biomasa, días de floración, número de semillas, producción de grano y peso de cien granos (Adkins y col. 1995). Algunos de los polimorfismos en estos caracteres de importancia agronómica que han surgido por variación somaclonal se han utilizado posteriormente en la mejora de variedades de arroz (Bertin y col., 1997; Jan y col., 1997; Jain, 2001).

En plantas de arroz, algunos transposones endógenos, incluidos *Tos*17 y *mPing* se pueden activar por el cultivo *in vitro* de células y tejidos. Hirochika y col., 1996 demostraron que las familias *Tos*10, *Tos*17 y *Tos* 19 de retrotransposones incrementaron la tasa de transcripción y transposición en cultivos celulares de arroz, según aumentaba el tiempo en cultivo, y que esta activación fue superior en *Tos*17. El análisis de las secuencias flanqueantes indicó que la integración del retrotransposón ocurría en regiones génicas. Se han llegado a observar de cinco a treinta copias transpuestas de *Tos*17 en plantas regeneradas (Hirochika, 2001).

Gao y col. (2009) realizaron un estudio con 120 marcadores SSR (Simple sequence Repeats) y la utilización de la técnica de tranposon display (TD) con cinco transposones activos de arroz (*Tos*17, *Karma*, *mPing*, *nDart* y *dTok*,), en ocho mutantes somaclonales, derivados de siete cultivares diferentes. Reportaron que 13 de los SSRs utilizados resultaron

polimórficos al comparar el mutante resistente al tizón bacteriano y su tipo silvestre, y otros 10 SSR mostraron diferencias entre un mutante de vaina púrpura y su fenotipo silvestre. Pero que ninguno de los SSRs analizados resultaron ser polimórficos cuando se compararon los mutantes con rasgos de enanismo y de porte alto con su tipo silvestre. La técnica de TD reveló diferencias en al menos dos de los transposones en algunas líneas mutantes al compararlas con los correspondientes genotipos silvestres, lo que indica que nuevas inserciones de transposones están involucradas en la variación somaclonal derivada del cultivo de tejidos. El análisis en conjunto de las dos técnicas sugiere que existen múltiples mecanismos moleculares responsables de la variación somaclonal observada en plantas regeneradas de arroz.

Un análisis fenotípico a gran escala de líneas de arroz con inserciones de *Tos*17 mostró que la mitad de las líneas mutantes presentaban al menos un cambio fenotípico; sin embargo, la contribución de *Tos*17 a este cambio fenotípico fue menor de un 10% (Miyao y col., 2007). Estudios posteriores realizados por Miyao y col. (2012) utilizando marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) detectaron en plantas regeneradas la transposición del elemento *Tos*17 entre un total de 43 transposones y concluyen que los SNPs son marcadores eficientes para identificar cambios que afectan a elementos móviles, y que las inserciones y deleciones, junto con la transposición de *Tos*17 son causas importantes de la variación somaclonal en arroz.

Wang y col. (2013) estudiaron las alteraciones genéticas y epigenéticas inducidas por el cultivo de tejido en plantas regeneradas de arroz, obtenidas a partir dos líneas puras de diferentes subespecies, un par de híbridos recíprocos F1 obtenidos con las dos líneas puras y dos tetraploides recíprocos obtenidas de los híbridos. Utilizaron marcadores AFLP y MSAP para detectar cambios genéticos y epigenéticos, respectivamente, y observaron diferencias significativas con ambos tipos de marcadores pero sólo las alteraciones genéticas mostraron rasgos distintivos entre los tres tipos de genomas. Por ello concluyen que el genotipo de origen tiene un efecto determinante en la frecuencia de las alteraciones observadas y que en arroz son las alteraciones genéticas la principal causa de la variación somaclonal aunque se presenten de forma conjunta con las alteraciones epigenéticas.

Stroud y col. (2013) realizaron un mapeo a nivel nucleotídico de la metilación del genoma de arroz en varias líneas regeneradas transformadas con diferentes transgenes, en callos y en líneas regeneradas sin transformación. Detectaron que todas las plantas regeneradas analizadas mostraron una pérdida significativa en los niveles de metilación en

comparación con plantas de una población control, afectando de forma diferente a plantas individuales. La pérdida de metilación se mantuvo estable durante varias generaciones y algunos sitios del genoma resultaron ser particularmente susceptibles. La pérdida de metilación estaba enriquecida en las secuencias promotoras por lo que se asocia con la desregulación de la expresión de genes codificantes para proteínas. En los callos observaron una menor desmetilación global, pero fue patente la presencia de hipermetilación en promotores de ciertos genes que se había eliminado en las plantas regeneradas de la generación T2 sugiriendo que los estados de hipermetilación pueden estar asociados específicamente al estado desdiferenciado.

Recientemente, Zhang y col. (2014) realizaron una resecuenciación del genoma completo de una línea originada por cultivo de tejido y autofecundada durante ocho generaciones sucesivas y la compararon con el genoma completo de su donador original, comprobando la presencia de numerosas variantes genómicas incluyendo SNPs, pequeñas inserciones y deleciones y la reactivación transposicional de tres elementos transponibles (*Tos17*, *Osr6* y *RN_21-12*), a pesar de no existir diferencias fenotípicas apreciables. Todas estas diferencias no se distribuían de forma aleatoria en cada uno de los 12 cromosomas y afectaban a un gran número de genes funcionales.

### 1.8 Centeno (*Secale cereale* L.)

**Figura 1.7.** *Secale cereale* L.

El centeno, *Secale cereale* L. (Figura 1.7) es el octavo cultivo de cereales del mundo con una producción de 16,7 millones de toneladas en el año 2013. En los últimos años, su producción ha decrecido en importancia en relación a los principales cultivos de cereales, trigo, arroz y maíz. La mayor zona de producción es Europa, principalmente en Alemania, Polonia, Rusia y Lituania, junto con algunas repúblicas centroasiáticas y China. Europa y las repúblicas de la antigua Unión Soviética son responsables del 90 % de la producción mundial. La mayor parte de su producción se

dedica a la fabricación de pan y el resto para alimentación animal y producción de alcohol (Bolibok-Brągoszewska y col, 2014).

En España la superficie media en el último quinquenio con datos disponibles (2007-2011) dedicada al cultivo de centeno es aproximadamente de 128.000 ha., con un rendimiento medio aproximado de 2.1 t/ha (Datos del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente; http://www.magrama.gob.es).

El centeno es resistente a las heladas, por lo que se adapta mejor que otros cereales a zonas frías, hasta los 1.800 de altitud. Además, por su rusticidad, el centeno se adapta prácticamente a cualquier tipo de suelo incluso suelos ácidos, arenosos y poco profundos, lo que hace que su uso este muy extendido en regiones montañosas (Targonska y col., 2013).

El centeno es considerado como un cultivo secundario, porque apareció inicialmente en los campos de los agricultores como una mala hierba entre otros cultivos como el trigo y la cebada y posteriormente se sometió a la domesticación convirtiéndose en un tipo de grano con utilidad (Vavilov, 1992). Varios autores coinciden que el origen geográfico de ésta especie no está muy claro y que posiblemente se localice en Irán. Bolibok-Brągoszewska y col. (2014) mencionan que es probable que el centeno cultivado sea originario del sudoeste de Asia, desde donde fue introducido a través de Rusia a Polonia, Alemania y posteriormente distribuidos a la mayor parte de Europa. También se plantea la hipótesis de que había una segunda ruta de migración de las especies en Europa desde Turquía y a través de la península de los Balcanes (Hilman, 1978). Las informaciones históricas señalan que esta especie ha sido utilizada por el hombre más recientemente que el trigo, ya que su cultivo data de unos 2.000 a 3.000 años de antigüedad. Aunque existen evidencias arqueológicas de que este tipo de grano se cultivaba en tiempos de los romanos, Plinio el Viejo en su Historia Natural del año 77-79 d.C. escribe del centeno que “es un alimento muy pobre y solo sirve para evitar la inanición” (libro XVIII, capítulo 40). Es a partir de la Edad Media cuando el centeno comienza a cultivarse ampliamente en Europa Central y del Este, siendo el cereal principal para la fabricación de pan en diversas regiones.

El centeno es una planta anual autoincompatible con incompatibilidad gametofítica, además de presentar el fenómeno conocido como protandría (Allard y Bradshaw, 1964). La tasa de alogamia está entre el 96-99 %, por lo cual es difícil mantener las características de

una determinada variedad. Por ello es conveniente hablar de una población de centeno o de un determinado tipo de centeno.

El centeno cultivado diploide tiene siete pares de cromosomas (2n = 2x = 14) y fórmula genómica RR. A partir de él se han obtenido centenos tetraploides de 28 cromosomas (2n = 4x = 28) que han ofrecido ventajas respecto a los diploides, en cuanto a rendimiento, tamaño del grano y firmeza del tallo (Schlegel y Mettin, 1986). Los centenos tetraploides mantienen cierta inestabilidad genética, alrededor del 15% de las plantas de una población de centeno autotetraploide son aneuploides con 27, 29 ó 30 cromosomas, que como consecuencia de su desequilibrio genético producen, en general, menos semilla que las plantas tetraploides. Se han obtenido centenos tetraploides que tienen caña más firme, más resistencia a la sequía y granos más pesados que los centenos diploides, que para mantener estas características y evitar esterilidad deben sembrarse aislados de los centenos diploides (Schlegel y Mettin, 1986).

El centeno posee un genoma de 8.100 Mb, casi un 50 % mayor que el de la cebada. Se desconoce si es resultado exclusivo de una mayor cantidad de ADN repetitivo o si el centeno también contiene más genes que otras especies diploides de la tribu Triticeae (Martis y col., 2013). El centeno y el trigo divergieron hace siete millones de años y ambos linajes y el de la cebada se separaron del ancestro común de los Triticeae hace unos once millones de años (Cuadrado y Jouve, 2002). Aún no se dispone de la secuencia del genoma del centeno, pero se ha publicado un modelo virtual de orden lineal de sus genes (*genome zipper*) que comprende el 72 % de los 31,008 genes detectados en centeno (Martis y col., 2013).

### 1.8.1 Variación somaclonal en *Secale cereale* L.

El centeno es una especie alógama que, además de poseer una alta variabilidad *in vivo*, presenta frecuencias elevadas de variación somaclonal al ser sometida a procesos de cultivo *in vitro* (Linacero y Vázquez, 1992a y 1992b; Linacero y Vázquez 1993; Rakoczy-Trojanowska, 2002, de la Puente y col., 2008) habiéndose detectado distintas mutaciones para caracteres morfológicos, citológicos y bioquímicos en las plantas regeneradas (Figueiras y col., 1991; Karp y col., 1992). En muchos casos, el espectro de mutaciones inducidas en centeno por el cultivo *in vitro* no es al azar y se han detectado frecuencias altas de mutaciones específicas. Por ejemplo, mutaciones albinas en centeno se han producido en el mismo locus en plantas

regeneradas de distintas líneas celulares (Linacero y Vázquez 1992b, Ballesteros y col., 2009).

El uso de marcadores moleculares para analizar la estabilidad/desestabilizad de las plantas regeneradas, también ha revelado que en centeno, algunos genes son altamente variables bajo condiciones *in vitro*. Linacero y col. (2000) analizando marcadores RAPD observaron que algunos marcadores, o sus secuencias flanqueantes, eran hipervariables, indicando la existencia de puntos calientes de inestabilidad en el DNA de centeno. En centeno también se ha descrito la activación de elementos móviles en el genoma del centeno por las condiciones del cultivo *in vitro*. Alves y col. (2005) demostraron que el transposón RYS1 de centeno se activó durante el cultivo *in vitro* con la particularidad de que tenía lugares de inserción preferenciales, tal y como le ocurre al retotransposón *Tos*17 de arroz (Miyao y col., 2003).

De la Puente y col. (2008) evaluaron la tasa de variación somaclonal en centeno utilizando marcadores AFLP comprobando que el 8.8 %, de un total de 887 marcadores analizados, identificaban el mismo polimorfismo en plantas regeneradas de líneas celulares diferentes, revelando posibles puntos calientes de mutación en el DNA, como ya habían descrito, analizando marcadores RAPD, para esta especie Linacero y col. (2000). Además, la secuenciación de marcadores AFLP hipervariables permitió identificar a uno de ellos como parte de una secuencia repetida en tándem que está localizada en las regiones teloméricas y ampliamente distribuida en los cromosomas de centeno y mostró alta similitud con regiones del retrotransposón *Angela*, por lo que estos autores concluyen que en las regiones hipervariables están relacionadas con elementos móviles y secuencias repetidas en tandem del genoma del centeno.

Linacero y col. (2011) realizaron un estudio, en los cultivares Ailés y Merced de centeno, para identificar la ocurrencia de cambios genéticos y epigenéticos en plantas regeneradas a través de cultivo de tejidos. Para ello obtuvieron marcadores ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) a partir de ADN digerido con los isoesquizómeros *Hpa*II y *Msp*I, sensibles a metilación, y con ADN intacto. Los datos obtenidos proporcionaron evidencias sobre modificaciones epigenéticas y cambios genéticos dentro de las mismas secuencias de ADN. Los autores indican que la frecuencia de plantas con al menos una variación fue alta: del 73 % y del 30% de plantas que mostraron al menos un cambio genético, y del 50% y 75 % de plantas que mostraron al menos un cambio de metilación, en los cultivares de Ailés y

Merced, respectivamente. Además, un número considerable de los marcadores variables mostró ambos tipos de modificaciones, lo que indica la posible existencia de un mecanismo común que relaciona a ambos tipos de variación.

González y col. (2013) realizaron un análisis de los patrones de metilación en centeno empleando 1.226 marcadores MSAP que fueron obtenidos de plantas regeneradas por embriogénesis somática de diferentes líneas celulares, así como de plantas control crecidas a partir de semillas maduras. Se observó que mientras que existe una conservación de sitios parcialmente metilados en todos los tipos de plantas, el número medio de sitios no metilados fue de casi el doble en las plantas regeneradas respecto a las plantas control. Se observaron cambios de metilación en todas las plantas regeneradas comparando dentro de su línea celular en una media del 9% de los marcadores. También se observaron cambios en los mismos marcadores en distintas líneas celulares, lo que apunta a un comportamiento no aleatorio en los cambios de metilación.

Targonska y col. (2013) indican que se han utilizado diferentes métodos biotecnológicos para obtener plantas de centeno dobles haploides, plantas con características de importancia agronómica a través de la inducción de variación somaclonal, incluso plantas transformadas genéticamente, muchas de las cuales han sido utilizadas con éxito en programas de mejoramiento genético, sin embargo muchas de estas aplicaciones biotecnológicas están limitadas tomando en cuenta que el centeno, es una especie recalcitrante para su manejo bajo condiciones *in vitro*.

# OBJETIVOS

# 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo General:

Analizar a nivel molecular los aspectos genéticos y epigenéticos relacionados con la variación somaclonal en líneas celulares regeneradas de las especies *Arabidposis thaliana*, *Oryza sativa* y *Secale cereale*, así como en transgénicas de *Arabidposis thaliana* y *Oryza sativa*, empleando las técnicas metAFLP y TMD.

## 2.2 Objetivos Específicos:

**1.** Desarrollar la metodología necesaria para la aplicación de la técnica metAFLP empleando los isoesquizómeros *Acc*65I y *Kpn*I en plantas control así como en plantas regeneradas y plantas transgénicas mediante el empleo de cebadores selectivos apropiados, marcados con fluorocromos y electroforesis en capilar.

**2.** Desarrollar la metodología necesaria para la aplicación de la técnica TMD empleando los isoesquizómeros *Hpa*II y *Msp*I en plantas control así como en plantas regeneradas y plantas transgénicas, mediante el empleo de cebadores selectivos apropiados, marcados con fluorocromos y electroforesis en capilar.

**3.** Analizar los cambios a nivel de secuencia nucleotídica y de estado de metilación en los motivos 5´-GGTACC-3’ como consecuencia del cultivo de tejidos y compararlos con los que presentan las plantas de la población control.

**4.** Analizar, en plantas de la población control así como en plantas regeneradas y plantas transgénicas, el estado de metilación de los motivos 5’-CCGG-3’ que flanquean a elementos transponibles presentes en el genoma de *Arabidposis thaliana* y de *Oryza sativa.*

# MATERIALES Y MÉTODOS

# 3. MATERIALES Y MÉTODOS

## 3.1 Material vegetal

### 3.1.1 *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh

El material vegetal utilizado en este estudio (Tabla 3.1) estuvo constituido por tres poblaciones diferenciadas en cuanto a su modo de obtención: germinación *in vitro*, regeneración mediante organogénesis somática y transformación genética. Se analizaron un total de 31 plantas de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh pertenecientes al ecotipo Columbia 907 (COL), las cuales se distribuyeron de la siguiente manera:

**a. Población de plantas control:** constituida por diez plantas provenientes de germinación de semillas *in vitro*, identificadas con los códigos consecutivos AtP.1 a AtP.10

**b. Población de plantas regeneradas:** constituida por once plantas, obtenidas a partir de dos líneas celulares independientes, regeneradas mediante organogénesis somática, de las cuales seis procedían de la línea celular 208R0 numeradas consecutivamente de At0.1 a la At0.6 y las cinco restantes procedían de la línea celular 211R0 numeradas consecutivamente de At1.1 a la At.15.

**c. Población de plantas transformadas:** constituida por diez plantas obtenidas a través de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* a partir de dos líneas celulares independientes, la 261T0 de la cual se obtuvieron cinco plantas regeneradas numeradas consecutivamente de At6.1 a la At6.5 y la línea celular 291T0 de la cual se generaron otras cinco plantas regeneradas, numeradas consecutivamente de At9.1 a la At9.5.

**Tabla 3.1.** Material analizado de *Arabidopsis thaliana*.

| Especie | Poblaciones | Línea celular | Identificación |
|---|---|---|---|
| *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh (Variedad Columbia 907) | Control n = 10 | — | AtP.0 a AtP.9 |
| | Regeneradas n = 11 | 208R0 n = 6 | At0.1 a At0.6 |
| | | 211R0 n = 5 | At1.1 a At1.5 |
| | Transgénicas n = 10 | 261T0 n = 5 | At6.1 a At6.5 |
| | | 291T0 n = 5 | At9.1 a At9.5 |

### 3.1.1.1 Obtención de plantas control de *Arabidopsis thaliana* a través de germinación de semillas *in vitro*

Las semillas de *A. thaliana* fueron colocadas en un tubo eppendorf para facilitar el proceso de desinfección, utilizando el protocolo descrito por McCourt y Keith (1998). Para ello, se agregaron 500 µl de hipoclorito sódico diluido al 1,25 %; las semillas se mantuvieron en dicha solución durante 10 minutos realizando una agitación manual cada tres minutos. Seguidamente, se procedió a centrifugar los tubos durante un minuto a 14.000 rpm; se eliminó la solución en la que estaban sumergidas las semillas, para ser resuspendidas en 500 µl de agua estéril y, a continuación, ser centrifugadas a 14.000 rpm. Este lavado fue repetido tres veces, con el objeto retirar al máximo los restos de solución de hipoclorito sódico. Las semillas desinfectadas fueron tomadas con la ayuda de una micropipeta y sembradas en placas Petri que contenían medio GM para inducir la germinación, el cual consiste en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 10 g/l de sacarosa (Tablas 3.2 y 3.3).

**Tabla 3.2.** Composición de los medios de cultivo utilizados para *Arabidopsis thaliana*.

| Medio de cultivo | Sales | Sacarosa (g/l) | Glucosa (g/l) | 2,4-D (mg/l) | KN (mg/l) | IAA (mg/l) | 2-IP (mg/l) | IBA (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GM | MS | 10 | - | - | - | - | - | - |
| CIM | B5 | - | 20 | 0,5 | 0,05 | - | - | - |
| SIM | B5 | - | 20 | - | - | 0,15 | 5,0 | - |
| MSR | MS | 30 | - | - | 0,1 | - | - | 12 |

**Tabla 3.3.** Composición de los medios básicos MS y B5.

| Compuesto macroelementos | MS mg/l | MS mM | B5 mg/l | B5 mM | Compuesto microelementos | MS mg/l | MS mM | B5 mg/l | B5 mM |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $NH_4NO_3$ | 1.650 | 20,6 | - | - | KI | 0,83 | 5,0 | 0,75 | 4,5 |
| $KNO_3$ | 1.900 | 18,8 | 2.500 | 25 | $H_3SO_4$ | 6,20 | 100 | 3,0 | 50 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 400 | 3,00 | 150 | 1,0 | $MnSO_4.4H_2O$ | 22,3 | 100 | - | - |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 370 | 1,50 | 250 | 1,0 | $MnSO_4.H_2O$ | - | - | 10 | 60 |
| $KH_2PO_4$ | 170 | 1,25 | - | - | $ZnSO_4.7H_2O$ | 8,6 | 30,0 | 2,0 | 7,0 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | - | - | 134 | 1,0 | $Na_2MoO_4.2H_2O$ | 0,25 | 1,00 | 0,25 | 1,0 |
| $NaH_2PO_4.H_2O$ | - | - | 150 | 1,1 | $CuSO_4.5H_2O$ | 0,025 | 0,1 | 0,025 | 0,1 |
| Otros | mg/l | mM | mg/l | mM | $CoCl_2.6H_2O$ | 0,025 | 0,1 | 0,025 | 0,1 |
| *myo*-Inositol | 100 | 555 | 100 | 555 | $Na_2.EDTA$ | 37,3 | 100 | 37,3 | 100 |
| Ác. Nicotínico | 0,5 | 4 | 1,0 | 8 | $FeSO_4.7H_2O$ | 27,8 | 100 | 27,8 | 100 |
| Piridoxina HCl | 0,5 | 2,5 | 1,0 | 5 | pH | MS | | B5 | |
| Tiamina HCl | 0,1 | 0,3 | 10 | 30 | | 5,8 | | 5,5 | |
| Glicina | 2,0 | 27 | - | - | MS: Murashige y Skoog, 1962; B5: Gamborg y col., 1968. | | | | |

Posteriormente, se mantuvieron durante 21 días en una cámara de crecimiento a 24 ± 1 ºC con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Cuando aparecieron las silicuas en las plantas adultas, las hojas de la roseta fueron recolectadas y congeladas a -80 ºC hasta la extracción del ADN.

### 3.1.1.2 Obtención de plantas regeneradas de *Arabidopsis thaliana*

Se tomaron explantes de raíces a partir de plantas de 21 días, obtenidas de acuerdo a lo descrito en el punto anterior, y se procedió a la siembra de dichos explantes según el protocolo descrito por Mathur y Koncz (1998), los cuales fueron sembrados en el medio de inducción de callo CIM y mantenidos durante cuatro días. Posteriormente se transplantaron al medio de inducción de tallo SIM donde permanecieron 30 días. Los tallos regenerados fueron transferidos al medio de enraizamiento MSR durante treinta días más. La mayor parte de las plantas necesitaron un período adicional de 2-3 semanas en medio básico GM hasta la aparición de las silicuas, posteriormente se recolectaron las hojas de la roseta y fueron congeladas hasta su utilización.

La composición de los distintos medios de cultivo citados se describe en las Tablas 3.2 y 3.3. A todos los medios se les añadieron 8 g/l de agar y 0,5 g/l del ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico MES, ajustando el pH a 5,7. Los medios se esterilizaron en autoclave a 120 ºC y 1,2 atmósferas de presión durante 20 minutos. Después, aún calientes, se distribuyeron en placas Petri añadiendo a cada una 20 ml, aproximadamente.

Todos los cultivos se mantuvieron en una cámara de crecimiento a 24 ± 1 ºC con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Se realizaron transplantes a medio fresco cada 15 días.

### 3.1.1.3 Obtención de plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana*

Para la transformación de *A. thaliana* se utilizó el protocolo descrito por Valvekens y col. (1988). Para ello se dispuso de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA-4404 (Hoekema y col., 1983) portadora del plásmido desarmado pBin19, en el cual la región del T-ADN contiene el gen marcador *nptII* (resistencia a kanamicina) bajo el control del promotor *nos* y el gen reportero *GUS* bajo el control del promotor 355 (Figura 3.1). Para la multiplicación de la cepa se tomaron 500 µl del cultivo de *A. tumefaciens,* conservada a 4 ºC, que fueron sembrados en una placa Petri con medio sólido LB+kanamicina (50 mg/l) e

incubada durante 48 horas a 24 ºC. Transcurrido este tiempo, con la ayuda de un palillo de madera se tomó una colonia y se sembró en medio liquido LB+kanamicina (50 mg/l), dejando crecer durante 18 horas en agitación continua a 200 rpm a 24 ºC.

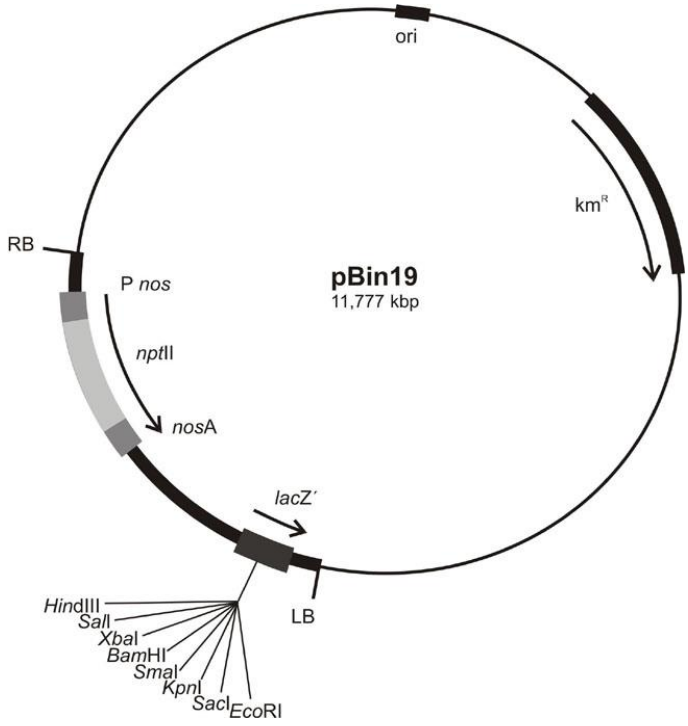


**Figura 3.1:** Mapa del plásmido pBin19.

Para el cocultivo de las células bacterianas y el tejido vegetal, las raíces provenientes de la germinación *in vitro*, fueron cortadas en trozos pequeños de aproximadamente 0,5 cm y pasadas a una placa que contenía 10 ml de medio CIM líquido. Seguidamente se le añadió 1 ml del cultivo de *Agrobacterium* y se agitó durante 2 minutos. A continuación, los trozos fueron secados con papel de filtro estéril y fueron cocultivados en placas Petri con medio CIM sólido durante un periodo de 48 horas. Transcurrido este periodo de tiempo se procedió a realizar el lavado de los explantes con medio CIM líquido suplementado con 100 mg/l de timentina y posteriormente se secaron con papel de filtro estéril.

Una vez finalizado el cocultivo, se procedió a sembrar los segmentos de raíces en medio selectivo SIM suplementado con 50 mg/l de kanamicina y 100 mg/l de timentina para proceder a la regeneración de las plantas transgénicas siguiendo el mismo protocolo descrito en el apartado 3.1.1.2 para la obtención de plantas regeneradas.

### 3.1.2 Arroz (*Oryza sativa* spp. *japonica*)

Las plantas de arroz (*Oryza sativa* spp. *japonica*, variedad Nipponbare) utilizadas para este estudio fueron obtenidas por el grupo de investigación de la Dra. Ana María Vázquez del departamento de Genética de la Universidad Complutense de Madrid y distintas muestras de ADN genómico aislado en el mismo estado de desarrollo de las plantas fueron amablemente cedidas para la realización de este trabajo. Este material correspondía a un total de 28 plantas divididas en tres grupos de acuerdo a la metodología de su obtención (Tabla 3.4), las cuales se describen a continuación.

**Tabla 3.4.** Material analizado de arroz.

| Especie | Poblaciones | Línea celular | Identificación |
|---|---|---|---|
| *Orysa sativa* L. spp. *japonica*, (variedad Nipponbare) | Control n = 7 | — | OsP.1 a OsP.7 |
| | Regeneradas n = 11 | R1J n = 6 | Os1.1 a Os1.6 |
| | | R3A n = 5 | Os3.1 a Os3.5 |
| | Transgénicas n = 10 | T2 n = 5 | Os2.1 a Os2.5 |
| | | T4 n = 5 | Os4.1 a Os4.5 |

**a. Población control:** constituida por siete plantas obtenidas por germinación de semillas maduras, identificadas consecutivamente de la OsP.1 a OsP.7.

**b. Población de plantas regeneradas:** constituida por once plantas obtenidas mediante embriogénesis somática a partir de dos líneas celulares independientes; la primera correspondía a la línea celular R1J de la cual se obtuvieron seis plantas identificadas de la Os1.1 a Os1.6 y la segunda correspondía a la línea celular R3A de la cual se obtuvieron cinco plantas identificadas de la Os3.1 a Os3.5.

**c. Población de plantas transformadas:** constituidas por diez plantas obtenidas través de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* a partir de dos líneas celulares independientes, la línea celular identificada como T2 de la cual se regeneraron cinco plantas numeradas de la Os2.1 a Os2.5 y la línea celular denominada T4 de la cual se regeneraron otras cinco plantas, numeradas de la Os4.1 a Os4.5.

### 3.1.2.1 Obtención de plantas control de arroz a través de germinación de semillas

Las plantas de arroz que constituyeron la población control habían sido obtenidas a través de la germinación de semillas maduras. Éstas fueron colocadas en una cámara de crecimiento utilizando recipientes que contenían tierra rica en nutrientes, siendo sometidas a las siguientes condiciones físicas: 28 ± 2 ºC con un fotoperíodo de 16h de luz y 8 horas de oscuridad. Las muestras foliares fueron recolectadas en el momento de la aparición de la hoja bandera y se conservaron congeladas a -80 ºC hasta la extracción del ADN.

### 3.1.2.2 Obtención de plantas regeneradas de arroz

Se describe a continuación el protocolo con el que se habían obtenido las plantas regeneradas de arroz basado en el descrito por Toki y col. (2006) con algunas modificaciones. En la tabla 3.5 se detalla la composición de los medios de cultivo necesarios. Se emplearon como explantes semillas maduras desprovista de su cáscara que fueron inicialmente sometidas a un proceso de desinfección superficial con etanol al 70% durante 60 segundos; seguidamente fueron lavadas con agua destilada estéril para eliminar los restos de etanol y después fueron sumergidas durante 15 minutos en una solución de hipoclorito de sodio diluido al 2,5 % que contenía 1 gota de Tween 20 por cada 50 ml; finalmente, fueron lavadas cinco veces con agua destilada estéril y secadas con papel absorbente estéril. Culminado el proceso de desinfección, las semillas fueron colocadas en los recipientes que contenían el medio de cultivo N6D, suplementado con 0,4 % de goma gellan (Gelrite) para inducir la formación de callos.

Las semillas se mantuvieron durante un periodo de 21 días en una cámara de crecimiento a 32 ± 1 ºC bajo luz continua. Todos los callos formados del escutelo y provenientes del mismo embrión constituyeron una línea celular. Los callos embriogénicos fueron cultivados en oscuridad durante 5 días en medio RE-III para la regeneración de plántulas. Una vez obtenidas las plántulas, fueron transferidas a medio HF en ausencia de los reguladores de crecimiento vegetal y colocadas en cámaras climáticas con 16 horas de luz a una temperatura de 25 ± 1 ºC. Transcurridos 60 días, las plántulas obtenidas fueron transplantadas a recipientes con un sustrato rico en nutrientes y aclimatadas a las condiciones *ex vitro* a 28 ± 2 ºC y un fotoperíodo de 16h de luz y 8 horas de oscuridad. Las muestras foliares fueron recolectadas en el momento de la aparición de la hoja bandera y conservadas congeladas a -80 ºC hasta el momento de la extracción del ADN.

**Tabla 3.5.** Medios de cultivo utilizados en arroz.

| Macroelementos | N6D[1] (mg/l) | 2N6-AS[1] (mg/l) | AAM[2] (mg/l) | RE-III[1] (mg/l) | HF[1] (mg/l) | AB[3] (mg/l) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| $KNO_3$ | 2.830 | 2.830 | -- | 1.900 | 1.900 | -- |
| $NH_4CL$ | -- | -- | -- | -- | -- | 1.000 |
| $NH_4NO_3$ | -- | -- | -- | 1.650 | 1.650 | -- |
| $(NH_4)_2SO_4$ | 463 | 463 | -- | -- | -- | -- |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 185 | 185 | 250 | 370 | 370 | 296 |
| $CaCl_2.2H_2O$ | 166 | 166 | 150 | 440 | 440 | 10 |
| $NaH_2PO_4.H_2O$ | -- | -- | 150 | -- | -- | 1.300 |
| $K_2HPO_4$ | -- | -- | -- | -- | -- | 3.000 |
| $KH_2PO_4$ | 400 | 400 | -- | 170 | 170 | -- |
| KCL | -- | -- | 3.000 | -- | -- | 150 |
| Microelementos | | | | | | |
| $Na_2EDTA$ | 37,3 | 37,3 | -- | 37,3 | 37,3 | -- |
| $FeSO_4.7H_2O$ | 27,8 | 27,8 | -- | 27,8 | 27,8 | 2,5 |
| Fe-EDTA | -- | -- | 40 | -- | -- | -- |
| $MnSO_4.H_2O$ | 4,4 | 4,4 | 10 | 22,3 | 22,3 | -- |
| $ZnSO_4.7H_2O$ | 1,5 | 1,5 | 2,0 | 8,6 | 8,6 | -- |
| $CuSO_4.5H_2O$ | -- | -- | 0,025 | 0,025 | 0,025 | -- |
| $CoCl_2.6H_2O$ | -- | -- | 0,025 | 0,025 | 0,025 | -- |
| KI | 0,8 | 0,8 | 0,75 | 0,83 | 0,83 | -- |
| $H_3BO_3$ | 1,6 | 1,6 | 3,0 | 6,2 | 6,2 | -- |
| $Na_2MoO_4.H_2O$ | -- | -- | 0,25 | 0,25 | 0,25 | -- |
| Componentes Orgánicos | | | | | | |
| Ác. Casamino | 300 | 300 | 500 | 2.000 | -- | -- |
| Glicina | 2,0 | 2,0 | 7,5 | 2,0 | 2,0 | -- |
| L-Arginina | -- | -- | 176,7 | -- | -- | -- |
| L-Prolina | 2.878 | -- | -- | -- | -- | -- |
| L-Glutamina | -- | -- | 900 | -- | -- | -- |
| L-Ác. Aspártico | -- | -- | 300 | -- | -- | -- |
| *myo*-Inositol | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | -- |
| Ác. Nicotínico | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | -- |
| HCl Piridoxina | 0,5 | 0,5 | 1,0 | 0,5 | 0,5 | -- |
| HCl Tiamina | 1,0 | 1,0 | 10 | 0,1 | 0,1 | -- |
| Reguladores de crecimiento vegetal | | | | | | |
| Ác. 2,4-diclorofenoxiacético | 2,0 | 2,0 | -- | -- | -- | -- |
| Ác. 1-naftalenacético | -- | -- | -- | 0,02 | -- | -- |
| Kinetina | -- | -- | -- | 2,0 | -- | -- |
| Acetosiringona | -- | 10~20 | 10~20 | -- | -- | -- |
| Fuente de carbono | | | | | | |
| Sacarosa | 30.000 | 30.000 | 68.500 | 30.000 | 30.000 | -- |
| Sorbitol | -- | -- | -- | 30.000 | -- | -- |
| Glucosa | -- | 10.000 | 36.000 | -- | -- | 5.000 |
| pH | 5,8 | 5,2 | 5,2 | 5,8 | 5,8 | 7,2 |

[1]Toki, 2006 ; [2]Hiei y col., 1994; [3]Chilton y col., 1974

Las semillas se mantuvieron durante un periodo de 21 días en una cámara de crecimiento a 32 ± 1 ºC bajo luz continua. Todos los callos formados del escutelo y provenientes del mismo embrión constituyeron una línea celular. Los callos embriogénicos fueron cultivados en oscuridad durante 5 días en medio RE-III para la regeneración de plántulas. Una vez obtenidas las plántulas, fueron transferidas a medio HF en ausencia de los reguladores de crecimiento vegetal y colocadas en cámaras climáticas con 16 horas de luz a una temperatura de 25 ± 1 ºC. Transcurridos 60 días, las plántulas obtenidas fueron transplantadas a recipientes con un sustrato rico en nutrientes y aclimatadas a las condiciones *ex vitro* a 28 ± 2 ºC y un fotoperíodo de 16h de luz y 8 horas de oscuridad. Las muestras foliares fueron recolectadas en el momento de la aparición de la hoja bandera y conservadas congeladas a -80 ºC hasta el momento de la extracción del ADN.

### 3.1.2.3 Obtención de plántulas transformadas de arroz

Se describe a continuación el protocolo con el que se habían obtenido las plantas transformadas de arroz basado en el descrito por Toki y col., (2006), con ligeras modificaciones, y que se desarrolló en cuatro pasos. En la tabla 3.5 se detalla la composición de los medios de cultivo necesarios.

**a. Multiplicación de la cepa de *Agrobacterium*:** se dispuso de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 portadora del vector binario pCAMBIA1301 en el cual la región del T-ADN contiene el gen marcador de selección que confiere resistencia a higromicina y el gen reportero *gus*A que codifica para ß-glucoronidasa, ambos genes bajo el control del promotor CaMV 35S (Figura 3.2). La cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens* fue cultivada en oscuridad en medio AB (Chilton y col., 1974), solidificado con agar al 1,5 % con 50 mg/l de sulfato de kanamicina a pH 7,2 durante un periodo de tres días a 28 ºC; posteriormente las células bacterianas obtenidas fueron resuspendidas en el medio de cultivo líquido AAM (Hiei y col., 1994).

**b. Obtención de callos:** como paso previo al proceso de transformación genética se realizó el pre-cultivo de las semillas maduras de arroz, las cuales fueron descascarilladas y sometidas a un proceso de desinfección tal y como se describe en el apartado anterior de obtención de plantas regeneradas de arroz. Posteriormente fueron cultivadas en medio N6D solidificado

con goma gellan (Gelrite) al 0,4 % durante un período de cinco días a 32 ºC bajo luz continua; con el propósito de inducir la formación de callos.

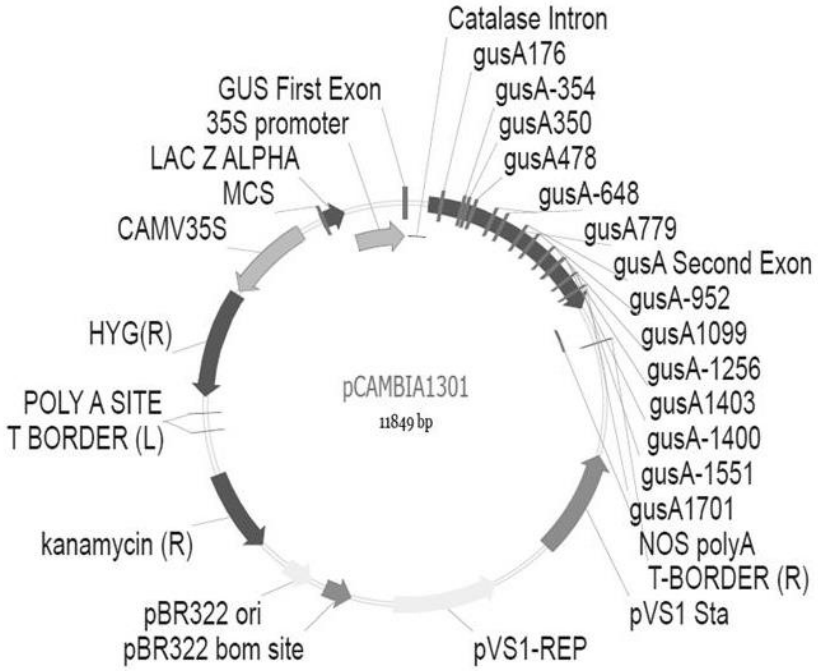


**Figura 3.2:** Mapa del vector binario pCAMBIA1301

**c. Infección con *Agrobacterium* y selección de callos transformados:** los callos formados a partir del escutelo de la semilla fueron embebidos en tubos que contenían la suspensión de células bacterianas, realizando una mezcla por inversión durante un minuto y medio. Posteriormente fueron secados con papel absorbente estéril para eliminar el exceso de *Agrobacterium* y transferidos a discos de papel de filtro estéril de 9 cm de diámetro impregnados con 0,5 ml de medio AAM y colocados sobre placas de Petri que contenían medio 2N6-AS sólido y co-cultivados en oscuridad durante un periodo de tres días a 25 ºC. Trascurrido este tiempo, los callos infectados con *Agrobacterium* fueron lavados cinco veces con agua destilada estéril y una última vez con agua destilada estéril que contenía 500 mg/l de carbenicilina para eliminar *Agrobacterium*. Seguidamente, los callos fueron secados con papel absorbente estéril y cultivados en medio N6D que contenía 50 mg/l de higromicina como agente selectivo para las células transformadas y 400 mg/l de carbenicilina, bajo luz continua durante un periodo de dos semanas a 32 ºC.

**d. Regeneración de plántulas transformadas:** los callos tratados fueron transferidos a medio RE-III para la regeneración de plántulas, las cuales fueron transferidas posteriormente a medio HF sin reguladores de crecimiento vegetal para inducir el desarrollo de las raíces, siendo colocadas en cámaras climáticas con 16 horas de luz a una temperatura de 25 ± 1 ºC. Las plántulas obtenidas fueron transplantadas a recipientes con un sustrato rico en nutrientes y aclimatadas a las condiciones *ex vitro* a 28 ± 2 ºC y un fotoperíodo de 16h de luz y 8 horas de oscuridad. Las muestras foliares fueron recolectadas al momento de la aparición de la hoja bandera y conservadas congeladas a -80 ºC hasta el momento de la extracción del ADN.

### 3.1.3 Centeno (*Secale cereale* L. cv. Ailés)

El material vegetal de centeno (*Secale cereale* L. cv. Ailés) utilizado en este estudio estuvo constituido por un total de 24 plantas divididas en dos poblaciones diferentes de acuerdo a la metodología de obtención (Tabla 3.6), las cuales se describen a continuación:

**a. Población control:** constituida por doce plantas obtenidas por germinación de semillas maduras del cultivar Ailés e identificadas con los códigos consecutivos de ScP.1 a ScP.12.

**b. Población de plantas regeneradas:** constituida por doce plantas regeneradas mediante embriogénesis somática a partir de dos líneas celulares independientes; la primera correspondía a la línea celular K(1A1C) de la cual se obtuvieron seis plantas identificadas de la ScK.13 a ScK.18 y la segunda correspondía a la línea celular M(7A1) de la cual se obtuvieron seis plantas identificadas de la ScM.19 a ScM.24.

Es importante destacar que el centeno es una especie recalcitrante desde el punto de vista de su transformación genética y por consiguiente no se utilizaron líneas celulares transformadas.

**Tabla 3.6.** Material analizado de centeno.

| Especie | Poblaciones | Línea celular | Identificación |
|---|---|---|---|
| *Secale cereale* L. (cultivar Ailés) | Control n = 12 | — | ScP.1 a ScP.12 |
| | Regeneradas n = 12 | K(1A1C) n = 6 | ScK.1 a ScK.6 |
| | | M(7A1) n = 6 | ScM.1 a ScM.6 |

### 3.1.3.1 Obtención de plantas control de centeno

Las plantas utilizadas como población control se obtuvieron a partir de semillas maduras de *S. cereale* L. del cultivar Ailés de acuerdo a lo descrito por González y col. (2013). Las semillas fueron colocadas en un recipiente con tierra rica en nutrientes y cuando las plantas alcanzaron una longitud de 13 a 15 cm, se controló el desarrollo de nuevas hojas. Entonces, y para cada una de las plantas control, se recogió una hoja de siete días de edad que se mantuvo congelada a -80 ºC hasta el momento de la extracción del ADN.

### 3.1.3.2 Obtención de plantas regeneradas de centeno

Se utilizaron semillas inmaduras de centeno recogidas cuando los embriones inmaduros habían alcanzado un tamaño entre 1 y 1,5 mm. Las semillas se esterilizaron mediante una primera inmersión en etanol al 70 % durante unos segundos seguida de otra inmersión en una solución de hipoclorito sódico al 5 % durante 20 minutos. Después de realizar tres lavados con agua estéril se diseccionaron las semillas para separar el embrión del respectivo endospermo. Todas las operaciones se realizaron en condiciones asépticas en el interior de una cabina de flujo laminar. Los embriones fueron sembrados de tal forma que la superficie del corte estuviera en contacto con el medio de cultivo.

Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 25±1 ºC para inducir la formación de callo y su proliferación. Como medio de cultivo se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con sacarosa al 3 % (p/v) como fuente de carbono, agar al 1 % y 2 mg/l de 2,4-D, ajustándose el pH a 5,7. Tras su esterilización por autoclavado a 1,2 atmósferas de presión y 120 ºC durante 20 minutos fue vertido en placas Petri de 9 cm de diámetro. Los callos se transplantaron a medio fresco cada seis semanas, eliminando las regiones que hubieran desarrollado primordios radiculares. Los callos embriogénicos originados a partir de callos de 3 a 6 meses de edad fueron transplantados a medio MS libre de fitohormonas para inducir la germinación de los embriones somáticos e incubados bajo un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y a una temperatura de 24±1 ºC. Las plántulas regeneradas emergentes fueron trasplantadas a tierra, para su aclimatación, y cuando alcanzaron entre 13 y 15 cm de altura se controló la aparición de nuevas hojas. Para cada una de las plantas regeneradas se recolectó una hoja de siete días de edad completamente desarrollada en condiciones *ex-vitro* que se mantuvo congelada a -80 ºC hasta el momento de la extracción del ADN.

## 3.2 Extracción de ADN

### 3.2.1 Extracción de ADN de *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh

La extracción de ADN total de *Arabidopsis thaliana* se realizó utilizando el protocolo de Li y Chory (1998). Para ello se colocaron 0,2 g de tejido foliar en un eppendorf de 1,5 ml, para posteriormente realizar la destrucción mecánica de la muestra utilizando nitrógeno líquido y una varilla de aluminio. Seguidamente se agregó 1 ml del buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, 0,5 M EDTA, 1 % SDS) y se incubó durante 10 minutos a una temperatura de 65 ºC, proceso que permitió la lisis de las paredes celulares y la extracción del contenido celular. Posteriormente se inició el proceso de precipitación y purificación del ADN y para ello se agregaron al tubo 0,33 ml de acetato de potasio 5M y se incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación se procedió a centrifugar las muestras durante 15 min a 14.000 rpm a una temperatura de 4 ºC; finalizado este proceso, se trasfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos bajo las mismas condiciones con el objeto de eliminar la mayor cantidad de impurezas. El sobrenadante final se transfirió a un tubo eppendorf y se le añadieron 2/3 del volumen del sobrenadante de isopropanol enfriado a 4 ºC. Se incubó el tubo durante 30 min a -20 ºC y transcurrido este tiempo se procedió a centrifugar durante 15 minutos a 14.000 rpm a una temperatura de 4 ºC. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a 37 ºC durante 30 minutos. Finalmente se resuspendió el pellet en 100 µl de agua Milli-Q con 2 µl de RNAsa (0,5 µg/ml). La cuantificación del ADN genómico se realizó con un equipo NANODROP ND-1000 conectado a un ordenador PC con software específico versión 3.7.1 y se analizó su calidad mediante electroforesis en geles de agarosa.

### 3.2.2 Extracción de ADN de arroz y centeno

La extracción de ADN genómico se realizó a partir del tejido foliar conservado a -80 ºC, empleando el método de extracción en columnas basado en el kit para plantas DNeasy® Plant Mini Kit siguiendo las instrucciones del fabricante (QIAGEN Ltd). Usando 100 mg del citado material, sometido a destrucción mecánica utilizando nitrógeno líquido y una varilla de aluminio, se añadieron 400 µl de tampón AP1 y 4 µl de RNasa A en solución (100 mg/ml), incluidos en el "kit". Se incubó la mezcla en un baño a 65 ºC durante 10 minutos, realizando tres inversiones del tubo a intervalos de tres minutos. A continuación, se añadieron 130 µl de tampón AP2 a la mezcla de lisado, se mezcló por inversión de los tubos y se incubó en hielo

durante 5 minutos. Seguidamente, se procedió a centrifugar la muestra durante 5 minutos a 14.000 rpm. Se tomó el sobrenadante para pasarlo por a una columna QIAshredder Mini Spin (color lila) con capacidad para 2 ml y realizar una centrifugación a temperatura ambiente durante dos minutos a 14.000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo donde se añadieron 0,5 volúmenes de tampón AP3 y un volumen de etanol, mezclándolo con una micropipeta. La mezcla formada se pasó por una columna Dneasy Mini Spin (color blanco) que fue centrifugada durante un minuto a 8.000 rpm. Se descartó el sobrenadante obtenido y se añadieron 500 µl de tampón AW a la misma columna, centrifugando de nuevo durante 2 minutos a 14.000 rpm. Después se colocó la columna en un tubo "eppendorf" estándar y en ella se añadieron 100 µl de tampón AE. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos y finalmente se centrifugó durante un minuto a 8.000 rpm para diluir la fase con el ADN (este último paso se repitió una vez con la misma columna para obtener una mayor eficiencia en la extracción). Las muestras obtenidas se almacenaban en congelador a -20 ºC para su conservación. La cuantificación del ADN genómico se realizó con un equipo NANODROP ND-1000 conectado a un ordenador PC con software específico versión 3.7.1 y se analizó su calidad mediante electroforesis en geles de agarosa.

### 3.3 Electroforesis en geles de agarosa.

Se emplearon geles de agarosa en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8; EDTA 1 mM) de forma rutinaria para la separación y visualización de distintos fragmentos de ADN. Los geles se prepararon a diferentes concentraciones según el tamaño de los fragmentos de ADN. Se utilizaron geles al 1 % (p/v) para analizar el ADN genómico y geles al 1,5 % (p/v) para visualizar los productos de las amplificaciones preselectivas correspondientes a los protocolos de obtención de marcadores metAFLP y TMD. La disolución de la agarosa en el tampón TAE se realiza cuando la mezcla de ambos compuestos se lleva a ebullición, de tal forma que al enfriarse se forma el gel. Antes de ser incorporadas a los pocillos del gel, las muestras de ADN se mezclaron con un tampón de carga (glicerol 30 % v/v; azul de bromofenol 0,5 % p/v) que es más denso que el tampón TAE.

Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales con los geles sumergidos en el tampón TAE. Tanto para el análisis de ADN genómico como para el procedente de reacciones de amplificación, las electroforesis se realizaron a un voltaje constante de 100 V. Como marcador de pesos moleculares conocidos se utilizó 1 kb-"Plus Ladder™" de Invitrogen. Una vez finalizada la electroforesis y previa incubación del gel en una solución de bromuro de

etidio (0,5 mg/ml), los fragmentos se visualizaron y se fotografiaron bajo luz ultravioleta. Las imágenes se obtuvieron y almacenaron digitalmente con la ayuda de un equipo de adquisición de imágenes Gene Genius Bio Imaging®, comercializado por la marca Syngene.

### 3.4 Obtención de marcadores metAFLP

El protocolo utilizado para la obtención de los marcadores metAFLP está basado en el descrito por Bednarek y col. (2007) para adaptar la utilización de las parejas de endonucleasas *Acc*65I/*Mse*I y *Kpn*I/*Mse*I al protocolo original de marcadores MSAP (Reyna-López y col., 1997), aunque fue necesario incorporar modificaciones para emplear el marcaje con fluorocromos y separación de los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar en un analizador ABI Prism 310. Dicho protocolo se desarrolló en cuatro pasos (Figura 3.3):

**a. Restricción de fragmentos de ADN:** para ello se utilizaron los isoesquizómeros *Acc*65I y *Kpn*I, como enzimas de corte poco frecuente y *Mse*I como enzima de corte frecuente. Para la preparación de la reacción de restricción con *Acc*65I/*Mse*I fueron mezclados: 2 µl de tampón NEB 3 (New England Biolabs), 0,5 µl de *Acc*65I (10 U/µl), 0,5 µl de la endonucleasa *Mse*I (10 U/µl), 11,5 µl de agua Milli-Q y 5,5 µl de ADN genómico (95 ng/µl). De igual forma, los componentes de la mezcla en la reacción de restricción con el isoesquizómero *Kpn*I fueron: 2 µl de tampón NEB 1 (New England Biolabs), 0,5 µl de *Kpn*I (10 U/µl), 0,5 µl de *Mse*I (10 U/µl), 11,5 µl de agua Milli-Q y 5,5 µl de ADN genómico (95 ng/µl). Estas dos reacciones se realizaron de forma independiente para cada una de las muestras a analizar, incubando las mezclas a 37 ºC durante dos horas y media.

**b. Ligación de adaptadores de doble cadena a los extremos de los fragmentos generados:** para la preparación de los tres adaptadores que se unen, respectivamente, a los extremos generados por las endonucleasas *Acc*65I, *Kpn*I y *Mse*I se dispuso de los siguientes oligonucleótidos: *Acc*65I-adaptador1 (5'-CTCGTAGCA TGCGTACA-3') y *Acc*65I-adaptador2 (5'-GTACTGTACGCATGCTAC-3'); *Kpn*I-adaptador1 (5'-CTCGTAGCATG CGTACAGTAC-3') y *Kpn*I-adaptador2 (5'-TGTACGCATGCTAC-3'); *Mse*I-adaptador1 (5'-TACTCAGGACTCATC-3') y *Mse*I-adaptador2 (5'-GAGTCCTGAGTAGCAG-3').

El protocolo se inició con la desnaturalización a 95 ºC durante 5 minutos de las tres soluciones acuosas que contienen las parejas de oligonucleótidos correspondientes a cada adaptador, para luego ser renaturalizados a temperatura ambiente durante otros 20 minutos.

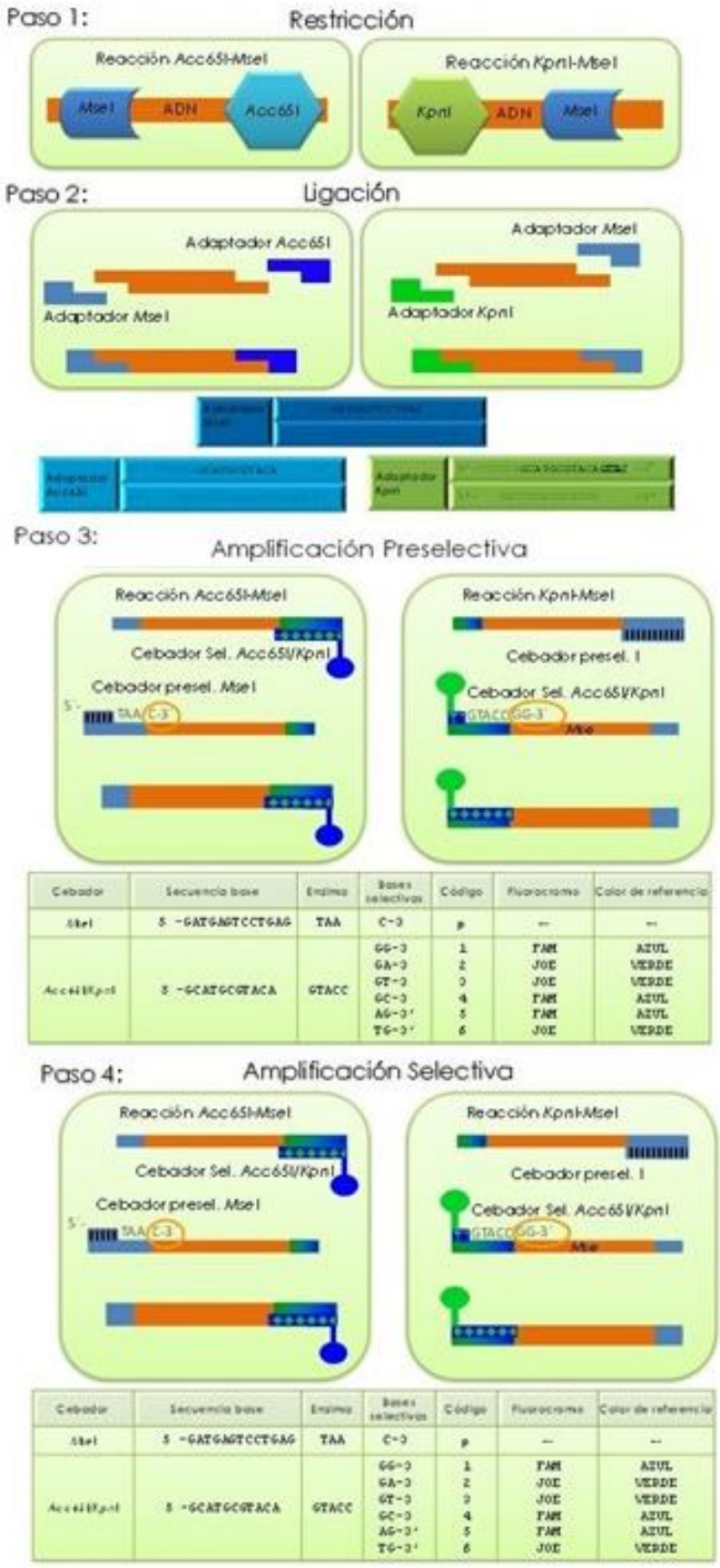


**Figura 3.3.** Proceso de obtención de marcadores metAFLP.

La mezcla de componentes para la reacción de ligación estuvo constituida, en el caso de *Acc*65I/*Mse*I, por 3 µl de tampón de ligasa T4 NEB (New England Biolabs), 1 µl del adaptador de doble cadena *Acc*65I (50 pmol/µl), 1 µl del adaptador de doble cadena *Mse*I (50 pmol/µl), 0,5 µl de ligasa T4 NEB, (400 U/µl) 4,5 µl de agua Milli-Q y 20 µl de la reacción obtenida en la restricción con *Acc*65I/*Mse*I del paso anterior.

De la misma manera, la preparación de la mezcla para la reacción de ligación en el caso de *Kpn*I/*Mse*I estuvo constituida por 3 µl de tampón de ligasa T4 NEB, 1 µl del adaptador de doble cadena *Kpn*I (50 pmol/µl), 0,5 µl de ligasa T4 NEB (400 U/µl), 4,5 µl de agua Milli-Q y 20 µl de la reacción obtenida en la restricción con *Kpn*I/*Mse*I. Las reacciones de ligación se realizaron incubando las mezclas a 16 ºC en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp 9700 durante 16 horas, equipo que también fue empleado para todas las reacciones de amplificación que se describen a continuación.

**c. Amplificación preselectiva de fragmentos de ADN:** ésta reacción se llevó a cabo a través de la unión de los cebadores preselectivos a la secuencia específica situada en los adaptadores en ambos extremos. Se empleó un único oligonucleótido como cebador preselectivo común y específico para ambos adaptadores de *Acc*65I y *Kpn*I (5´-GCATGCGTACAGTACC-3´) y otro oligonucleótido específico para el adaptador de *Mse*I (5´-GATGACTCCTGAGTAAC-3´).

La mezcla de componentes para la reacción preselectiva para cada muestra estuvo constituida por 15 µl de core mix (mezcla comercial de dNTPs, *Taq* DNA-polimerasa y tampón de amplificación, Applied Biosystems), 1 µl de cada uno de los cebadores preselectivos *Acc*65I/*Kpn*I y *Mse*I a una concentración de 10 pmol/µl y finalmente 4 µl de la reacción de ligación correspondiente, diluida al 15 % (v/v) en agua Milli-Q. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de 2 minutos a 72 °C, seguido de 20 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 2 minutos a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 30 minutos a 60 °C. Las reacciones se almacenaron a 4 ºC hasta su dilución. Posteriormente, se realizó la verificación de la amplificación mediante la carga de la mitad del volumen de la reacción de las reacciones preselectivas (10 µl) en un gel de agarosa al 1,5 %. Tras visualizar el gel y comprobar la existencia de una amplificación

preselectiva positiva, se diluyó el volumen restante de reacción añadiendo 190 µl de agua Milli-Q para quedar almacenado a -20 °C hasta su utilización posterior.

**d. Amplificación selectiva de fragmentos de ADN:** para reducir el número total de fragmentos a analizar hasta valores que puedan ser resueltos mediante electroforesis, se llevó a cabo una amplificación empleando seis cebadores selectivos con dos bases extra en su extremo 3' y que estaban marcados en su extremo 5' con uno de los fluorocromos 6-carboxifluoresceina (FAM) o 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceina (JOE) lo que permitió detectar los fragmentos amplificados mediante electroforesis capilar. Se realizaron un total de seis reacciones diferentes por muestra y digestión, resultado de la combinación del cebador preselectivo *Mse*I con cada uno de los seis cebadores selectivos *Acc*65I/*Kpn*I, cuyas secuencias se detallan en la tabla 3.7.

**Tabla 3.7.** Secuencias correspondientes a los cebadores selectivos de metAFLP.

| Cebador | Secuencia base | Enzima | Bases selectivas | Fluorocromo en 5' | Código |
|---|---|---|---|---|---|
| *MseI* | 5´-GATGAGTCCTGAG | TAA | C-3´ | - | P |
| *Acc65I/ KpnI* | 5´-GCATGCGTACA | GTACC | GG-3´ | FAM | 1 |
| | | | GA-3´ | JOE | 2 |
| | | | GT-3´ | JOE | 3 |
| | | | GC-3´ | FAM | 4 |
| | | | AG-3' | FAM | 5 |
| | | | TG-3' | JOE | 6 |

La preparación de la mezcla de componentes para las reacciones selectivas, para cada muestra, estuvo constituida por 15 µl de core mix (mezcla comercial de dNTPs, *Taq* DNA-polimerasa y tampón de amplificación, Applied Biosystems), 1 µl de uno de los cebadores selectivos *Acc*65I/*Kpn*I a una concentración de 5 pmol/µl, 1 µl del cebador preselectivo *Mse*I a una concentración de 5 pmol/µl y finalmente 3 µl de la reacción preselectiva diluida correspondiente. El programa de amplificación utilizado en el termociclador consistió en un ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 10 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 2 minutos a 66 °C (con un descenso de 1 °C por ciclo) y 2 minutos a 72 °C, seguido de otros 20 ciclos 20 segundos a 94 °C, 2 minutos a 66 °C y 2 minutos a 72 °C y un último ciclo de elongación de 30 minutos a 60 °C. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos que fueron almacenadas a -20 ºC.

### 3.5 Transposon display sensible a metilación (TMD)

El protocolo utilizado para la obtención de los marcadores TMD, se basó en el descrito por Takata y col. (2007) aunque se adaptó para poder emplear marcaje con fluorocromos y separación de productos amplificados de menos de 500 pb mediante electroforesis capilar en un analizador automático de fragmentos. En dicho protocolo, se emplean las endonucleasas sensibles a metilación *Hpa*II y *Msp*I y consta también de cuatro fases: la primera es la restricción del ADN genómico con distintas endonucleasas, luego la ligación de los adaptadores de doble cadena a los extremos, posteriormente la amplificación preselectiva y finalmente la amplificación selectiva de los fragmentos de ADN situados en proximidad a transposones (Figura 3.4). Estos marcadores fueron utilizados para el estudio de las especies *A. thaliana* y *O. sativa.*

#### 3.5.1 Obtención de marcadores TMD en *A. thaliana*

En *A. thaliana* se empleó la técnica TMD para analizar el estado de metilación de secuencias flanqueantes a cuatro tipos de retrotransposones de clase I: *gypsy*, *copia*, *TRIM* y *SINE*.

**a. Restricción de fragmentos ADN genómico:** se emplearon en reacciones independientes los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*, como enzimas de corte frecuente, que presentan distinta respuesta de corte según el estado de metilación de las dos citosinas de la secuencia 5´-CCGG-3´ a nivel de doble cadena.

Adicionalmente, fue empleada la endonucleasas *Eco*RI, como enzima de corte poco frecuente. Para la preparación de la reacción de restricción de cada una de las muestras fueron mezclados, en el caso de *HpaII*: 2 µl de tampón NEB 1(New England Biolabs), 0,1 µl del isoesquizómero *HpaII* (50 U/µl), 0,05 µl de la endonucleasa *Eco*RI (100 U/µl), 12,35 µl de agua Milli-Q y 5,5 µl de ADN genómico (95 ng/µl). De igual forma, los componentes de la mezcla para la reacción de restricción con el isoesquizómero *MspI* fueron: 2 µl de tampón NEB 4 (new England Biolabs), 0,05 µl del isoesquizómero *MspI* (100 U/µl), 0,05 µl de la enzima *Eco*RI (100 U/µl), 12,35 µl de agua Milli-Q y 5,5 µl de ADN genómico (95 ng/µl). Estas dos reacciones se realizaron independientemente, para cada una de las muestras analizadas, incubando las mezclas a 37 ºC durante dos horas y media.

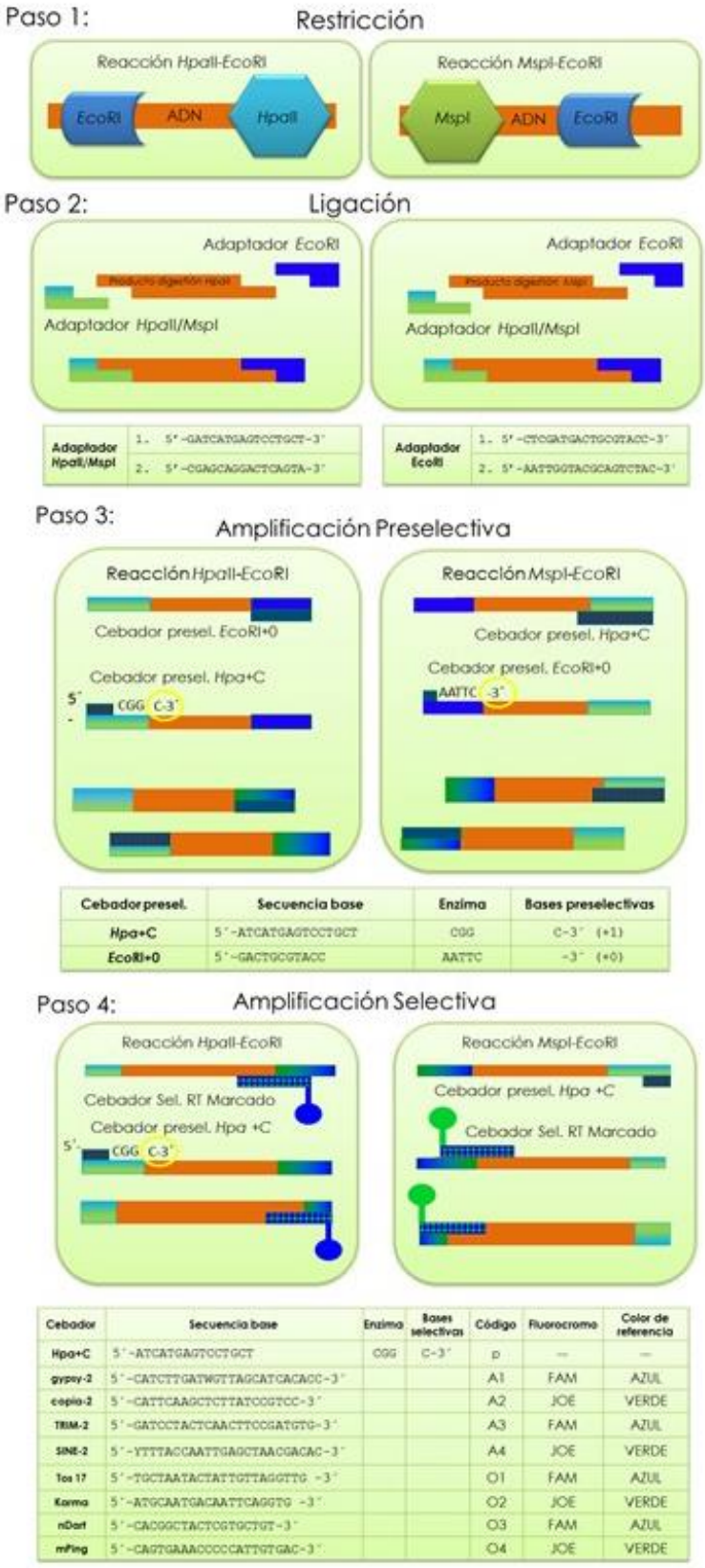


**Figura 3.4.** Proceso de obtención de marcadores TMD

**b. Ligación de los adaptadores de doble cadena a los extremos de los fragmentos generados:** para la preparación de los adaptadores se utilizó una única pareja de oligonucleótidos para ambos isoesquizómeros, *HpaII/MspI*–adaptador1 (5'-GATCATGAGTCCTGCT-3') y *HpaII/MspI*–adaptador2 (5'-CGAGCAGGACTCAGTA-3') y, por otro lado, la pareja de oligonucleótidos para los extremos generados por la enzima de corte poco frecuente, *Eco*RI-adaptador1 (5'-CTCGATGACTGCGTACC-3') y *Eco*RI-adaptador2 (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3').

La ligación se inició con la desnaturalización a 95º C durante 5 minutos de las soluciones acuosas que contenían las parejas de oligonucleótidos correspondientes a cada adaptador, para luego ser renaturalizados a temperatura ambiente durante otros 20 minutos. La mezcla de componentes para la reacción de ligación estuvo constituida, en el caso de la reacción *HpaII/Eco*RI, de 3 µl de tampón de ligasa T4 NEB (New England Biolabs), 1 µl del adaptador de doble cadena *HpaII/MspI* (50 pmol/µl), 1 µl del adaptador de doble cadena *Eco*RI (50 pmol/µl), 0,5 µl de ligasa T4 NEB (400 U/µl), 4,5 µl de agua Milli-Q y 20 µl de la reacción obtenida en la restricción con *HpaII/Eco*RI del paso anterior. De la misma manera, la preparación de la mezcla para la reacción de ligación en el caso de la reacción *MspI/Eco*RI estuvo constituida de 3 µl de tampón de ligasa T4 NEB, 1 µl del adaptador de doble cadena *HpaII/MspI* (50 pmol/µl), 0,5 µl de ligasa T4 NEB (400 U/µl), 4,5 µl de agua Milli-Q y 20 µl de la reacción obtenida en la restricción con *MspI/Eco*RI. Las reacciones de ligación se realizaron incubando las mezclas a 16 ºC en un termociclador Applied Biosystems GeneAmp 9700 durante 16 horas, equipo que también fue empleado para todas las reacciones de amplificación que se describen a continuación.

**c. Amplificación preselectiva de fragmentos de ADN:** se llevó a cabo a través de la unión de los cebadores preselectivos a la secuencia específica de los adaptadores situados en los extremos. Se empleó el oligonucleótido *Hpa*+C (5´-ATCATGAGTCCTGCTCGGC-3´) como cebador preselectivo común y específico para el adaptador de *HpaII/MspI* y el oligonucleótido *Eco*RI+0 (5´-GACTGCG TACCAATTC-3´) específico para el adaptador de *Eco*RI. La mezcla de componentes para la reacción preselectiva para cada muestra estuvo constituida por 15 µl de core mix (mezcla comercial de dNTPs, *Taq* DNA-polimerasa y tampón de amplificación, Applied Biosystems), 1 µl de cada uno de los cebadores preselectivos *Hpa*+C y *Eco*RI+0 a una concentración de 10 pmol/µl y

finalmente 4 µl de la reacción de ligación correspondiente diluida al 15% (v/v) en agua Milli-Q. Las condiciones de amplificación consistieron en un ciclo inicial de 2 minutos a 72 °C, seguido de 20 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C y 2 minutos a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 30 minutos a 60 °C. Las reacciones se almacenaron a 4 ºC hasta su dilución posteriormente, se realizó la verificación de la amplificación mediante la carga de la mitad del volumen de la reacción de las reacciones preselectivas (10 µl) en un gel de agarosa al 1,5 %. Tras visualizar el gel y comprobar la existencia de una amplificación preselectiva positiva se diluyó el volumen restante de reacción añadiendo 190 µl de agua Milli-Q para quedar almacenado a -20 °C hasta su utilización posterior.

**d. Amplificación selectiva de los fragmentos de ADN:** la amplificación se llevó a cabo empleando los cebadores específicos para cuatro tipos de retrotransposones clase I: *gypsy*, *copia*, *TRIM* y *SINE* (Tabla 3.8). Estos oligonucleótidos fueron diseñados por MacKenzie y col. (2005) y se sintetizaron marcados en su extremo 5' con uno de los fluorocromos 6-carboxifluoresceina (FAM) o 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceina **(**JOE), lo que permitió detectar los fragmentos amplificados posteriormente mediante electroforesis capilar. Se realizaron cuatro reacciones diferentes por muestra y digestión, resultado de la combinación del cebador *Hpa*+C con los cebadores específicos para cada uno de los retrotransposones mencionados anteriormente. Es importante destacar que finalmente se utilizó únicamente el cebador *Hpa*+C debido a que, cuando se ensayaron como selectivos a distintos cebadores los fragmentos obtenidos se ubicaron por encima de las 500 pb, estando fuera de la resolución fijada para este estudio, definida por el marcador de peso molecular utilizado (ROX-500).

**Tabla 3.8.** Secuencias correspondientes a los cebadores selectivos empleados para obtener marcadores TMD en *Arabidopsis*.

| Cebador | Secuencia | Fluorocromo en 5' | Código |
|---|---|---|---|
| *Hpa*+C | 5´-ATCATGAGTCCTGCTCGGC-3´ | - | P |
| *gypsy* | 5´-CATCTTGATWGTTAGCATCACACC-3´ | FAM | 1 |
| *copia* | 5´-CATTCAAGCTCTTATCCGTCC-3´ | JOE | 2 |
| *SINE* | 5´-YTTTACCAATTGAGCTAACGACAC-3´ | JOE | 3 |
| *TRIM* | 5´-GATCCTACTCAACTTCCGATGTG-3´ | FAM | 4 |

La preparación de la mezcla de componentes para la reacción selectiva para cada muestra estuvo constituida por 15 µl de core mix (mezcla comercial de dNTPs, *Taq* DNA-polimerasa y tampón de amplificación, Applied Biosystems), 1 µl de uno de los cebadores selectivos específicos de transposones, a una concentración de 10 pmol/µl, 1 µl del cebador preselectivo *Hpa*+C a una concentración de 10 pmol/µl y finalmente 3 µl de la reacción preselectiva correspondiente diluida. El programa de amplificación utilizado en el termociclador consistió en un ciclo inicial de 2 minutos a 94 °C, seguido de 10 ciclos de 20 segundos a 94 °C, 30 segundos a 66 °C (con un descenso de 1 °C por ciclo) y 2 minutos a 72 °C, seguido de otros 25 ciclos 20 segundos a 94 °C, 30 segundos a 56 °C, 2 minutos a 72 °C, y un último ciclo de elongación de 30 minutos a 60 °C. Las reacciones se realizaron en placas de 96 pocillos que fueron almacenadas a -20 ºC.

### 3.5.2 Obtención de marcadores TMD en *O. sativa*

Se empleó la técnica TMD para analizar el estado de metilación de cuatro de los transposones activos en arroz, los retrotransposones de clase I *Tos17* (*copia*) y *Karma* (*LINE*) y los transposones de ADN de clase II *mPing* (*MITE*) y *nDart*.

El procedimiento fue el mismo descrito en el apartado anterior para *A. thaliana*, realizando los mismo pasos y reacciones, pero empleando como cebadores selectivos, en el último paso, los cebadores descritos por Gao y col. (2009) marcados en su extremo 5’ con uno de los fluorocromos 6-carboxifluoresceina (FAM) o 6-carboxi-4',5'-dicloro-2',7'-dimetoxifluoresceina **(**JOE) que se detallan en la tabla 3.9. Se realizaron cuatro reacciones selectivas diferentes por muestra y digestión, resultado de la combinación del cebador *Hpa*+C con los cuatro cebadores específicos de para elementos móviles de arroz, mencionados anteriormente.

**Tabla 3.9.** Secuencias correspondientes a los cebadores selectivos empleados para obtener marcadores TMD en arroz.

| Cebador | Super Familia | Secuencia base | Código | Fluorocromo |
|---|---|---|---|---|
| *Hpa*+C | --- | 5´-ATCATGAGTCCTGCTCGGC-3´ | P | --- |
| *Tos 17* | LTR-copia | 5´-TGCTAATACTATTGTTAGGTTG -3´ | 1 | FAM |
| *Karma* | LINE | 5´-ATGCAATGACAATTCAGGTG -3´ | 2 | JOE |
| *nDart* | hAT | 5´-CACGGCTACTCGTGCTGT-3´ | 3 | FAM |
| *mPing* | MITE | 5´-CAGTGAAACCCCCATTGTGAC-3´ | 4 | JOE |

### 3.6 Electroforesis capilar para la detección de los marcadores metAFLP y TMD

Para la separación y detección de los fragmentos amplificados de forma selectiva tanto en los protocolos de metAFLP como de TMD, se utilizó la técnica de electroforesis capilar en un analizador de fragmentos de ADN, modelo ABI Prism 310 (Applied Biosystems) representado en la figura 3.5.

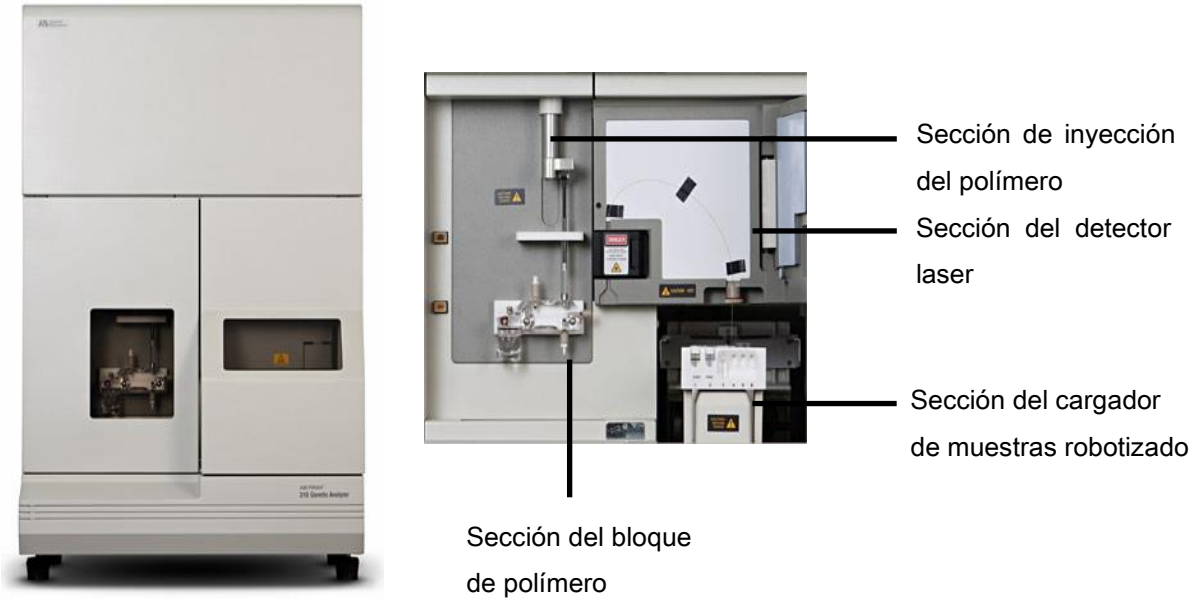


**Figura 3.5.** Analizador de fragmentos de ADN, ABI Prism 310, basado en electroforesis capilar en polímero específico POP-4 y en la detección de ADN marcado con fluorocromos mediante excitación por luz láser.

Los fragmentos son detectados gracias al marcaje empleado, dado que uno de los dos oligonucleótidos usados en las amplificaciones selectivas estaba marcado en su extremo 5´ con un fluorocromo, FAM ó JOE. De esta forma se pudo realizar simultáneamente la electroforesis de los productos de amplificación de dos reacciones selectivas diferentes, marcadas con distinto fluorocromo, junto con un marcador de pesos moleculares marcado con un tercer fluorocromo. En este estudio, se empleó el marcador ROX-500 suministrado por la casa comercial Applied Biosystems (Figura 3.6).

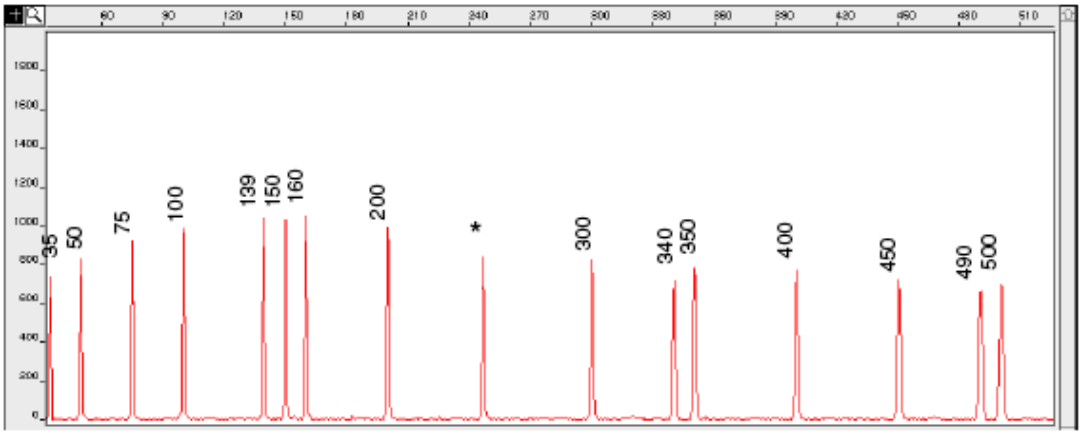


**Figura 3.6.** Marcador de pesos moleculares ROX-500 (Applied Biosystems). El número situado sobre cada pico indica el tamaño, en pares de bases, de cada uno de los fragmentos utilizados como referencia para el cálculo del peso molecular de los marcadores amplificados.

Para la preparación de la electroforesis, fueron mezclados en un tubo eppendorf de 0,5 ml: 2 µl de reacción selectiva marcada con FAM y 2 µl de reacción selectiva marcada con JOE junto a 25 µl de formamida desionizada y 0,5 µl de marcador ROX-500 (Applied Biosystems). Esta mezcla se desnaturalizó a 95 ºC durante 5 minutos y posteriormente se enfrió rápidamente en un baño con hielo, evitando la formación de ADN de doble cadena, donde se mantuvo al menos durante 5 minutos antes de colocar el tubo en el analizador ABI Prism 310.

La electroforesis se realizó en un polímero específico denominado POP-4 (Applied Biosystems), a una temperatura de 60 ºC para mantener las muestras desnaturalizadas y a 15 kV durante 26 minutos. La carga de las muestras se obtuvo por ionización a 15 kV durante 18 segundos. El analizador ABI Prism 310 estuvo controlado por un ordenador PC mediante el software específico Data Collection® versión 3.1, que registró el dato crudo de fluorescencia correspondiente a los fragmentos marcados. La fluorescencia fue detectada por la cámara CCD del equipo cuando éstos pasaron a través de la ventana de detección del capilar y fueron excitados por el láser.

### 3.7 Análisis de marcadores metAFLP y TMD

Para el análisis de los resultados de electroforesis capilar registrados por el software Data Collection 3.1, se utilizó el programa informático GeneMapper 4.0 de Applied Biosystems (Figura 3.7), ajustando los parámetros necesarios para analizar los marcadores metAFLP y TMD, a partir de la metodología indicada por el fabricante para marcadores tipo

microsatélites (SSRs). Para cada una de las combinaciones de cebadores específicos de cada marcador se evalúo la presencia de fragmentos amplificados en la región delimitada entre los 50 y los 500 pb, generándose una matriz de datos donde el valor cero (0) corresponde a la ausencia del fragmento y el valor uno (1) a la presencia del mismo. Para obtener cada una de las matrices, se compararon todos los electroferogramas obtenidos a partir de las correspondientes reacciones dobles de digestión realizadas para todas las plantas analizadas de la especie vegetal correspondiente.

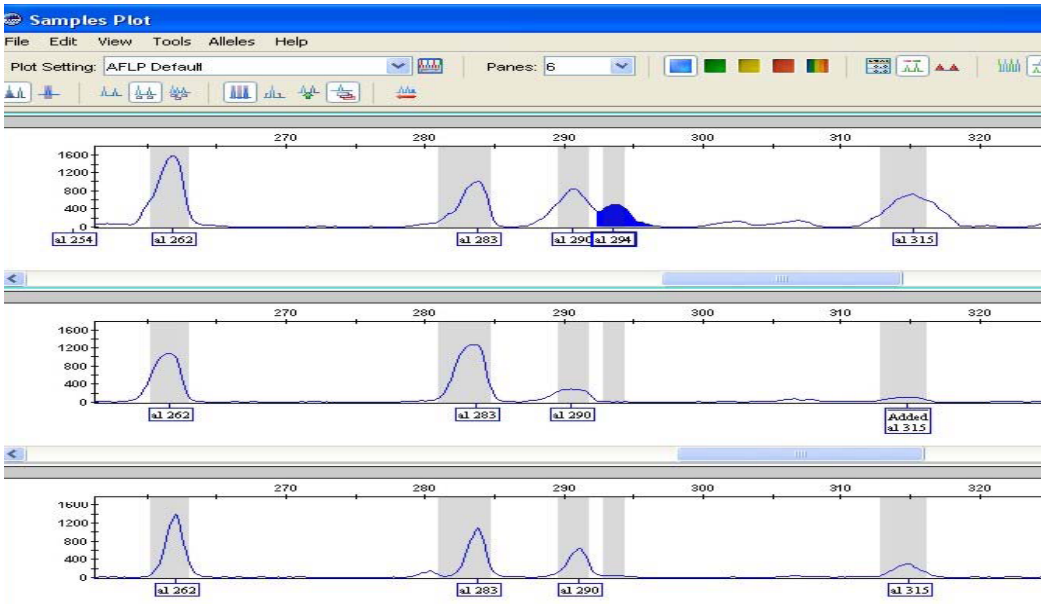


**Figura 3.7.** Imagen del programa informático GeneMapper 4.0 empleado para el análisis de marcadores metAFLP y TMD obtenidos con un equipo ABI Prism 310, en la que se muestran tres electroferogramas parciales. El eje de abscisas corresponde a las unidades de fluorescencia relativa y el de ordenadas al peso molecular en pares de bases. El pico sombreado corresponde a un marcador polimórfico.

Los polimorfismos detectados en cada una de las matrices obtenidas con GeneMapper 4.0 fueron revisados de forma manual mediante la comparación por observación directa de los electroferogramas correspondientes a las muestras implicadas y la confirmación o corrección del valor asignado en la matriz, empleando una hoja de cálculo Microsoft Excel 2003.

Los datos de presencia/ausencia fueron analizados con la ayuda de hojas Excel y de software propio desarrollado en lenguaje PERL que permitió calcular el índice IRM de identidad de marcadores de tipo MSAP (González y col., 2013). Los fenogramas UPGMA para la representación gráfica de la identidad de las muestras se obtuvieron con el software MEGA 6 (Tamura y col., 2013).

### 3.7.1 Interpretación de variación en marcadores metAFLP de plantas regeneradas

Para emplear la metodología descrita por Machczynska y col. (2014b) para analizar la variación de los marcadores metAFLP obtenidos en las plantas regeneradas y en las regeneradas transformadas, se estableció como estado inicial de metilación, para cada uno de los marcadores polimórficos, a aquel más frecuentemente entre los presentados por las plantas regeneradas obtenidas de la misma línea celular. El método de Machczynska y col. (2014b) se basa en la interpretación propuesta por Bednarek y col., (2007) utilizando un código binario de cuatro dígitos, de todos los cambios posibles en los patrones de marcadores detectados como consecuencia de modificaciones de secuencia nucleotídica o de estado de metilación (Figura 3.8) que permite calcular la frecuencia con la que ocurren diferentes tipos de eventos (Tablas 3.10 y 3.11). Machczynska y col. (2014b) ampliaron la interpretación inicial con la introducción de coeficientes de corrección (Tabla 3.12) para calcular las características de la variación presente en las plantas regeneradas (Tabla 3.13).

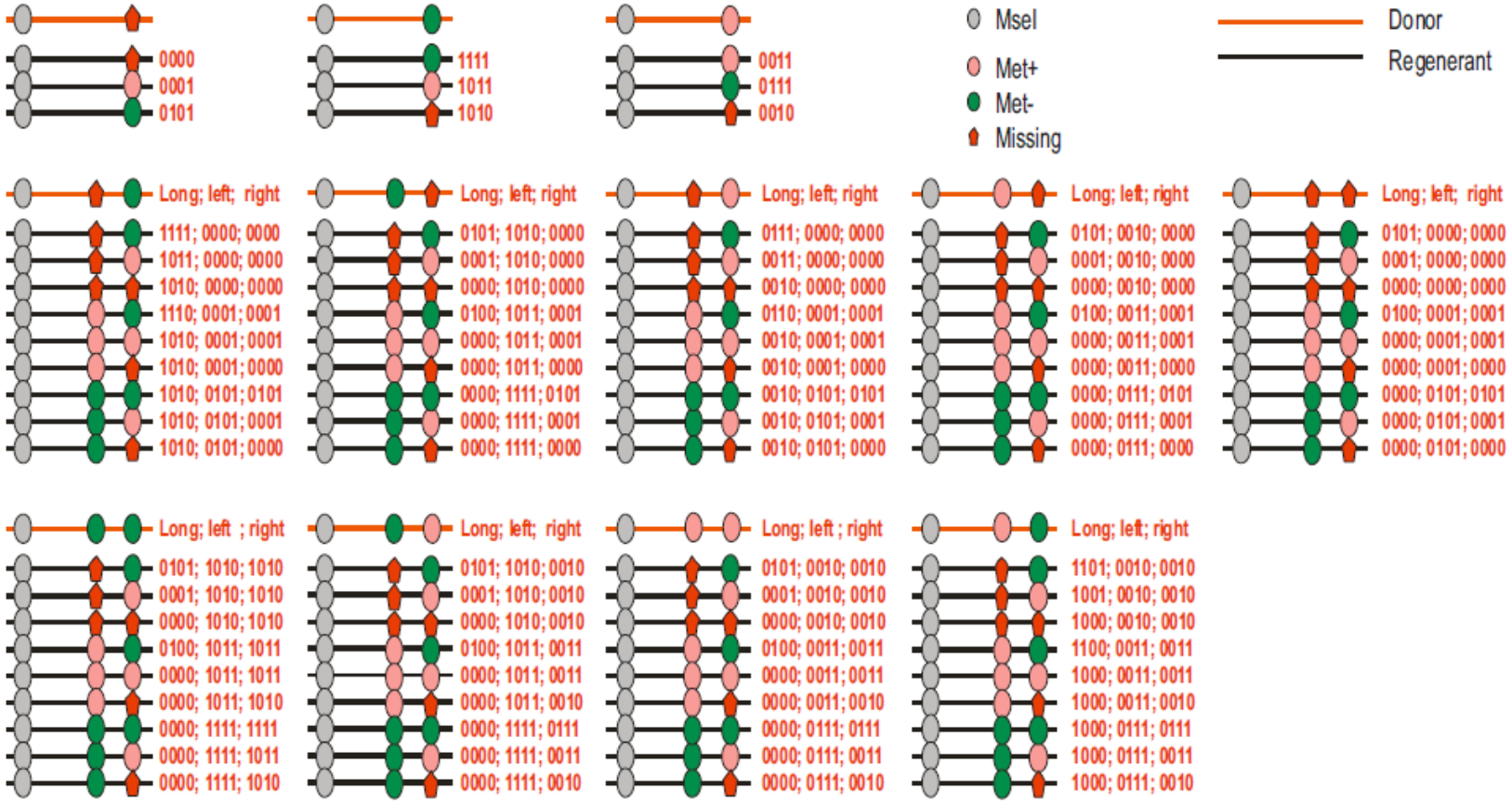


**Figura 3.8.** Representación esquemática de la interpretación de todos los cambios posibles en los patrones de marcadores metAFLP de plantas regeneradas, detectados como consecuencia de cambios de secuencia nucleotídica o de metilación en sitios 5´-GGTACC-3' (tomado de Bednarek y col., 2007). Las líneas horizontales rojas representan el estado inicial del ADN (Donor) y las negras el estado en la planta regenerada (Regenerant); los círculos grises indican dianas para *Mse*I, los círculos rosas indican sitios metilados digeridos por *Kpn*I pero no por *Acc*65I y los círculos verdes indican sitios no metilados digeridos por *Kpn*I y por *Acc*65I; los pentágonos rojos indican sitios no digeridos por *Kpn*I ni por *Acc*65I debido a cambios de secuencia. En la fila superior se presentan los cambios posibles cuando existe un único sitio *Acc*65I/*Kpn*I dentro del amplicón, mientras que en las dos filas inferiores se presentan los cambios posibles cuando estén presentes dos sitios *Acc*65I/*Kpn*I en el amplicón, generando hasta tres fragmentos de distinta longitud: Long, left y right. El código binario de cuatro dígitos corresponde a la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Acc*65I seguido de la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Kpn*I.

**Tabla 3.10.** Fórmulas usadas para el cálculo de los diferentes tipos de eventos a partir de marcadores metAFLP en plantas regeneradas (Bednarek y col., 2007).

| Abreviatura | Fórmula | Descripción |
|---|---|---|
| SE | ∑(0001) + ∑(0010) + ∑(0101) + ∑(0110) +∑(1001) + ∑(1010) + ∑(1110) + ∑(1101) | Eventos de secuencia |
| DME | ∑(0111) + ∑(0110) | Eventos de desmetilación |
| DNME | ∑ (1011) + ∑ (1001) | Eventos de metilación *de novo* |
| CE | ∑ (0100) +∑ (1000) | Eventos complejos |
| SNMS | ∑ (1100) + ∑ (1111) + ∑ (1101) | Estado no metilado heredado |
| SMS | ∑ (0011) + (1100) | Estado metilado heredado |
| TNTCIE | SE + DME + DNME + CE | Número total de eventos inducidos por el cultivo de tejidos |

**Tabla 3.11.** Fórmulas usadas para calcular, como porcentajes, características de la variación en marcadores metFLP de plantas regeneradas (Bednarek y col., 2007).

| Abreviatura | Fórmula | Descripción |
|---|---|---|
| DENOMINADOR1 | SE + DME + DNME + CE + SMS + SNMS + 0000 | Usado para el cálculo de porcentajes de SV, DMV, DNMV, CV, TTCIV, SNMS y SMS |
| SV | 100 x SE/DENOMINADOR 1 | Variación de secuencia nucleotídica |
| DMV | 100 x DME/DENOMINADOR 1 | Variación por desmetilación |
| DNMV | 100 x DNME/DENOMINADOR 1 | Variación por metilación *de novo* |
| CV | 100 x CE/DENOMINADOR 1 | Cambios complejos |
| TTCIV | 100 x TTCIE/DENOMINADOR 1 | Variación total inducida por el cultivo de tejidos |
| SNMS | 100 x SNMS/DENOMINADOR 1 | Estado desmetilado heredado |
| SMS | 100 x SMS/DENOMINADOR 1 | Estado metilado heredado |

**Tabla 3.12.** Fórmulas de los coeficientes de corrección y valores corregidos de Machczynska y col. (2014b).

| Abreviatura | Fórmula | Descripción |
|---|---|---|
| CCSV | CV x SV/(SV + DMV + DNMV) | Coeficiente de corrección de SV |
| CCDMV | CV x DMV/(SV + DMV + DNMV) | Coeficiente de corrección de DMV |
| CCDNMV | CV x DNMV/(SV + DMV + DNMV) | Coeficiente de corrección de DNMV |
| CSV | SV + CCSV | SV corregido |
| CDMV | DMV + CCDMV | DMV corregido |
| CDNMV | DNMV + CCDNMV | DNMV corregido |

**Tabla 3.13.** Características que describen la variación de marcadores metAFLP en plantas regeneradas (Machczynska y col. 2014b).

| Abreviatura | Fórmula | Descripción |
|---|---|---|
| TNNMS | DME + SNMS | Número total de sitios no metilados |
| TNMS | DNME + SMS | Número total de sitios metilados |
| DENOMINADOR 2 | TNMS + TNNMS | Usado para calcular porcentajes de GM y GNM |
| GM | 100 x TNMS/DENOMINADOR2 | Porcentaje del genoma metilado |
| GNM | 100 x TNNMS/DENOMINADOR2 | Porcentaje del genoma no metilado |
| SUTCIV | 100 - TTCIV | Sítios no afectados por variación inducida por el cultivo de tejidos |
| SAM | TTCIV - CSV | Sítios afectados por metilación |

# RESULTADOS

# 4. RESULTADOS

## 4.1 Detección de marcadores moleculares metAFLP en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

A partir del análisis de un total de 31 plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia, se han obtenido marcadores metAFLP mediante el empleo de los isoesquizómeros *Acc65*I y *Kpn*I, endonucleasas que reconocen la secuencia diana palindrómica 5´-GGTACC-3' y que tienen un comportamiento diferente según el estado de metilación de las citosinas en cada una de las dos cadenas del ADN. El corte por *Acc65*I está bloqueado por el estado metilado de la citosina situada en el extremo 3' en ambas cadenas del ADN y altamente impedido (80%) en caso de hemimetilación, mientras que *Kpn*I no se ve afectada por ninguno de estos estados en la citosina terminal. La hemimetilación de la citosina interna no afecta a *Kpn*I aunque su corte está bloqueado cuando las citosinas internas de ambas cadenas están metiladas y afectado en un 50 % cuando las dos citosinas están hemimetiladas en la misma cadena de ADN. Actualmente no se conoce cómo afecta la metilación en la citosina interna a la actividad de *Acc65*I.

Las plantas analizadas correspondían a diez individuos de la población control Columbia, once plantas regeneradas a partir de dos líneas celulares independientes (seis plantas de 208R0 y cinco plantas de 211R0) y diez plantas transgénicas obtenidas a partir de otras dos líneas celulares independientes (cinco plantas de 261T0 y cinco plantas de 291T0). Para cada una de estas 31 plantas, se han obtenido doce electroferogramas correspondientes a seis combinaciones de cebadores selectivos empleados con cada una de las dos reacciones de digestión realizadas independientemente, con *Acc65*I y *Kpn*I respectivamente. El procedimiento se repitió al menos una vez para todas las muestras. Por tanto, se generaron 372 electroferogramas en total que fueron comparados inicialmente con la ayuda del software GeneMapper v.4.0 y sometidos posteriormente a una revisión manual de la que se obtuvieron un total de 887 marcadores metAFLP (Tabla 4.1). Se ha considerado como marcador a cada uno de los fragmentos de ADN detectados en al menos una de las plantas analizadas y que esté presente en al menos una de las dos dobles reacciones de digestión (*Acc65*I+*Mse*I o *Kpn*I+*Mse*I) que corresponde a la presencia de un sitio 5´-GGTACC-3'. Dicho número de marcadores implicó la realización de una matriz global de presencia-ausencia de 54.994 datos, al considerar la situación de cada uno de los marcadores en cada planta y reacción de digestión, en la que se codificaron con un 1 cuando estaban presentes y un 0 cuando estaban ausentes.

**Tabla 4.1.** Marcadores metAFLP detectados con cada combinación de cebadores selectivos en *Arabidopsis thaliana*.

| Combinación de cebadores | Marcadores totales n = 31 | P. control (COL) n = 10 | Línea 208R0 n = 6 | Línea 211R0 n = 5 | Línea 261T0 n = 5 | Línea 291T0 n = 5 | Líneas agrupadas n = 21 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 [a] | 151 | 139 | 98 | 106 | 98 | 100 | 119 |
| P2 [a] | 147 | 142 | 102 | 106 | 108 | 101 | 112 |
| P3 [a] | 154 | 151 | 118 | 121 | 120 | 121 | 128 |
| P4 [a] | 149 | 145 | 98 | 98 | 100 | 100 | 114 |
| P5 [b] | 154 | 151 | 96 | 102 | 105 | 101 | 109 |
| P6 [b] | 132 | 128 | 105 | 116 | 114 | 112 | 116 |
| TOTAL | 887 | 857 | 617 | 649 | 645 | 635 | 698 |

[a] cebador del grupo CCGN; [b] cebador del grupo CCWG

El número de marcadores distintos detectados ha sido de 857 para la población control, que corresponden al 96,6 % del total de marcadores, mientras que fue claramente inferior y de 617 y 649 en las plantas regeneradas de las líneas celulares 208R0 y 211R0, así como de 645 y 635 en las plantas transgénicas de las líneas celulares 261T0 y 291T0, respectivamente (Tabla 4.1). El mayor número de marcadores distintos en la población podría achacarse al mayor tamaño de muestra, pero si se generan todos los agrupamientos posibles de cinco individuos de la población (252 combinaciones), el número de marcadores distintos que se detectarían oscila entre 735 y 839, con un valor medio de 807 marcadores, valores claramente superiores a los observados en las líneas celulares. Por otro lado, al agrupar las 21 plantas analizadas de las cuatro líneas celulares, el número de marcadores distintos detectados fue de 698 (el 78,7 % del total) también claramente inferior al de la población de origen. Este mayor número de marcadores distintos detectados en la población control puede deberse tanto a la existencia de un mayor número de motivos que pueden ser cortados por las endonucleasas empleadas a nivel individual, como a la presencia de un mayor polimorfismo de marcadores metAFLP entre los individuos de la población control respecto al que presentan las plantas clónicas obtenidas de las líneas celulares, aspectos que se analizarán a continuación.

Cada uno de los marcadores metAFLP detectados fue clasificado en cada planta analizada con un código de dos dígitos de acuerdo a su patrón de presencia-ausencia en las dos dobles digestiones indicadas anteriormente. Aquellos que aparecen en ambas reacciones

se les denominó marcadores 11, a los que aparecen únicamente en la reacción con *Acc65*I se les catalogó como 10 y a los presentes exclusivamente en la reacción con *Kpn*I se les nombró como 01. Se asignó el código 00 a los marcadores ausentes en las dos reacciones de alguna de las plantas comparadas, cuando se realizaron los análisis de variabilidad.

El número total de marcadores metAFLP detectado en cada una de las plantas analizadas se representa gráficamente en la figura 4.1 y es proporcional al número de sitos 5´-GGTACC-3' que pueden ser cortados indistintamente por *Acc65*I y *Kpn*I, de tal forma que la suma de marcadores de tipo 11 y 01 corresponde a los cortes por *Kpn*I y la suma de tipos 11 y 10 a los cortes por *Acc65*I. En todas las plantas el número de fragmentos generados por *Kpn*I ha sido superior al de *Acc65*I, como consecuencia de la presencia de distintos estados de metilación de la secuencia diana que afectan principalmente a la actividad de *Acc65*I, como se indicó anteriormente.

En la población control, el número total de marcadores por planta ha oscilado entre 626 y 729, que representan del 73,0 % al 85,1 % del total de marcadores detectado en dicha población, con un valor medio de 667,8. Por su parte, en cada una de las líneas celulares ha variado entre 586 y 597 (media de 592,0) en la línea 208R0, entre 621 y 633 (media de 627,8) en la línea 211R0, entre 605 y 619 (media de 613,2) en la línea 261T0 y entre 591 y 611 (media de 602,8) en la línea 291T0, que representan, los siguientes porcentajes del total de marcadores detectado en cada una de dichas líneas: del 95,0 % al 96,8 % en 208R0, del 95,7 % al 97,5 % en 211R0, del 93,8 % al 96,0 % en 261T0 y del 93,1 % al 96,2 % en 291T0. Considerando a todas las 21 plantas regeneradas como un único grupo, el número medio de marcadores por planta fue de 608,1. La distribución de la variación en el grupo de regeneradas solapa con la de la población, aunque se situó claramente en la región con valores más bajos. El valor medio de marcadores totales por planta presentó diferencias muy significativas (*t* de Student; $p<0,0001$) entre la población control y los agrupamientos de plantas regeneradas (208R0+211R0), regeneradas transgénicas (261T0+291T0) y total de regeneradas agrupadas. También fue significativamente superior en la población control respecto al valor medio en cada una de las cuatro líneas celulares aunque a distintos niveles de significación: 208R0, $p<0,001$; 211R0, $p<0,05$; 261T0 y 291T0, $p<0,01$. No se observaron diferencias significativas comparando los valores medios de los agrupamientos de las plantas regeneradas y de las regeneradas transgénicas.

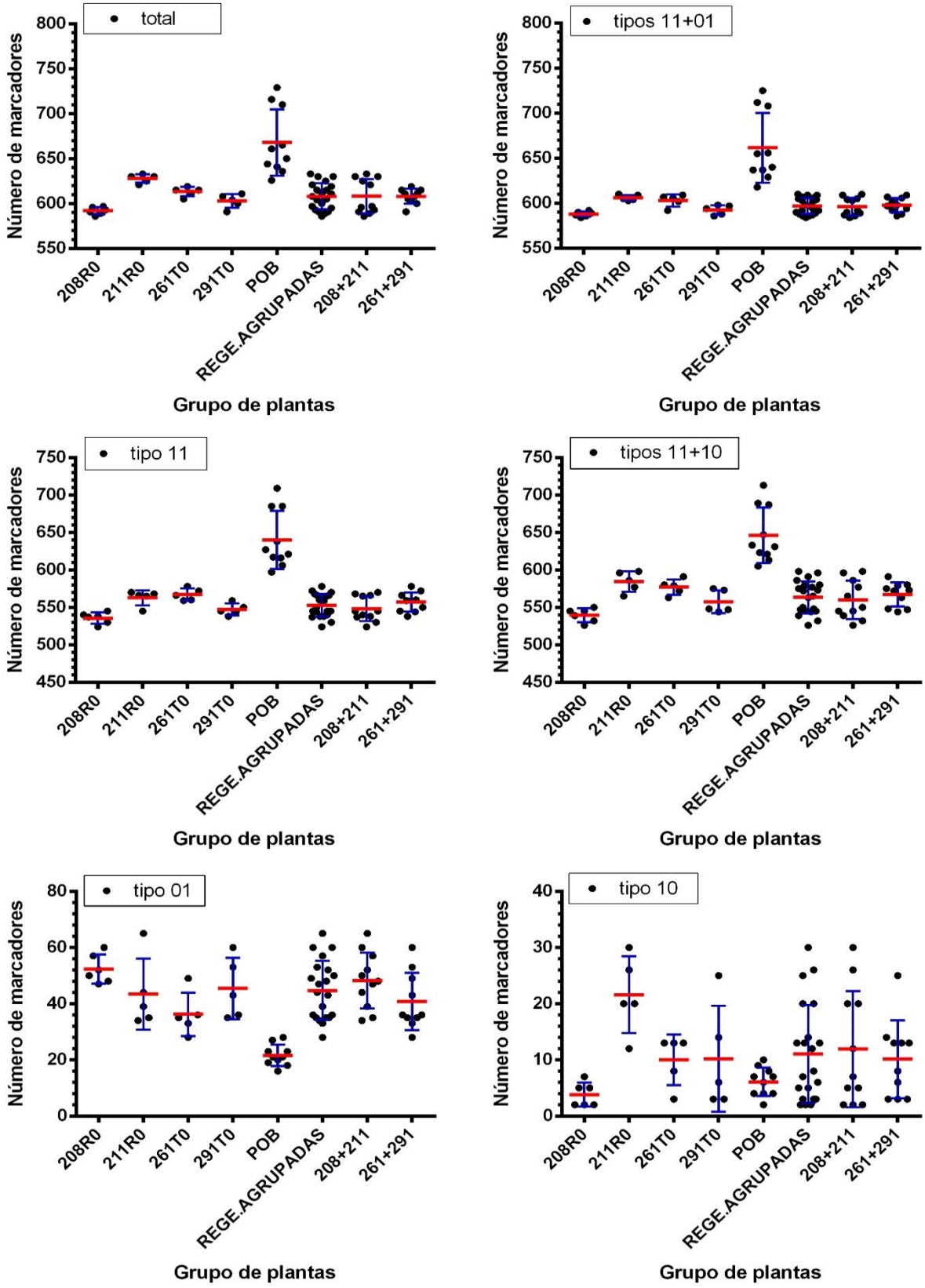


**Figura 4.1.** Número de marcadores metAFLP detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana*; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Cuando se consideran únicamente los marcadores generados por la endonucleasa *Kpn*I (tipo 11 + tipo 01), a la que no le afecta la metilación en la citosina en posición 3', también se observa (Figura 4.1) un valor medio significativamente más elevado en la población control respecto a cualquiera de los agrupamientos de las plantas regeneradas (*t* de Student; $p<0,0001$) y a los valores medios obtenidos en cada línea celular ($p<0,01$). Por lo tanto, las plantas regeneradas presentan un menor número de secuencias diana 5´-GGTACC-3' que puedan ser cortadas por *Kpn*I que las plantas de la población de la que proceden. Este menor número puede atribuirse tanto a pérdidas de secuencia diana por cambios nucleotídicos como a una mayor presencia de citosinas internas metiladas en la secuencia diana.

También existe un valor medio significativamente más elevado en la población control respecto a cualquiera de los agrupamientos de las plantas regeneradas (*t* de Student; $p<0,0001$) y a los valores medios obtenidos en cada línea celular ($p<0,01$), cuando se analizan los marcadores generados por la endonucleasa *Acc65*I (tipo 11 + tipo 10).

Al comparar independientemente cada uno de los tres tipos de marcadores se comprobó que los tipo 11 son los de mayor presencia en todas las plantas, seguidos por los de tipo 01 y finalmente por los de tipo 10 (Figura 4.1). El número medio de marcadores tipo 11 fue significativamente superior en la población y el de tipo 01 significativamente inferior, respecto a los valores obtenidos en cualquiera de las líneas celulares o sus agrupamientos para cada uno de estos tipos de marcadores (*t* de Student; $p<0,001$).

Para estos dos tipos de marcadores, 11 y 01, no se observaron diferencias significativas, respecto a su número medio por planta, entre los agrupamientos de las plantas regeneradas y las regeneradas transgénicas. Los valores medios de marcadores de tipo 10, los de menor abundancia, no presentaron diferencias significativas entre los obtenidos para la población control y los correspondientes a los agrupamientos de plantas regeneradas o a las líneas celulares, excepto para la líneas celular 211R0 (*t* de Student; $p<0,001$). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los agrupamientos de las plantas regeneradas y las regeneradas transgénicas para el valor medio de marcadores de tipo 10.

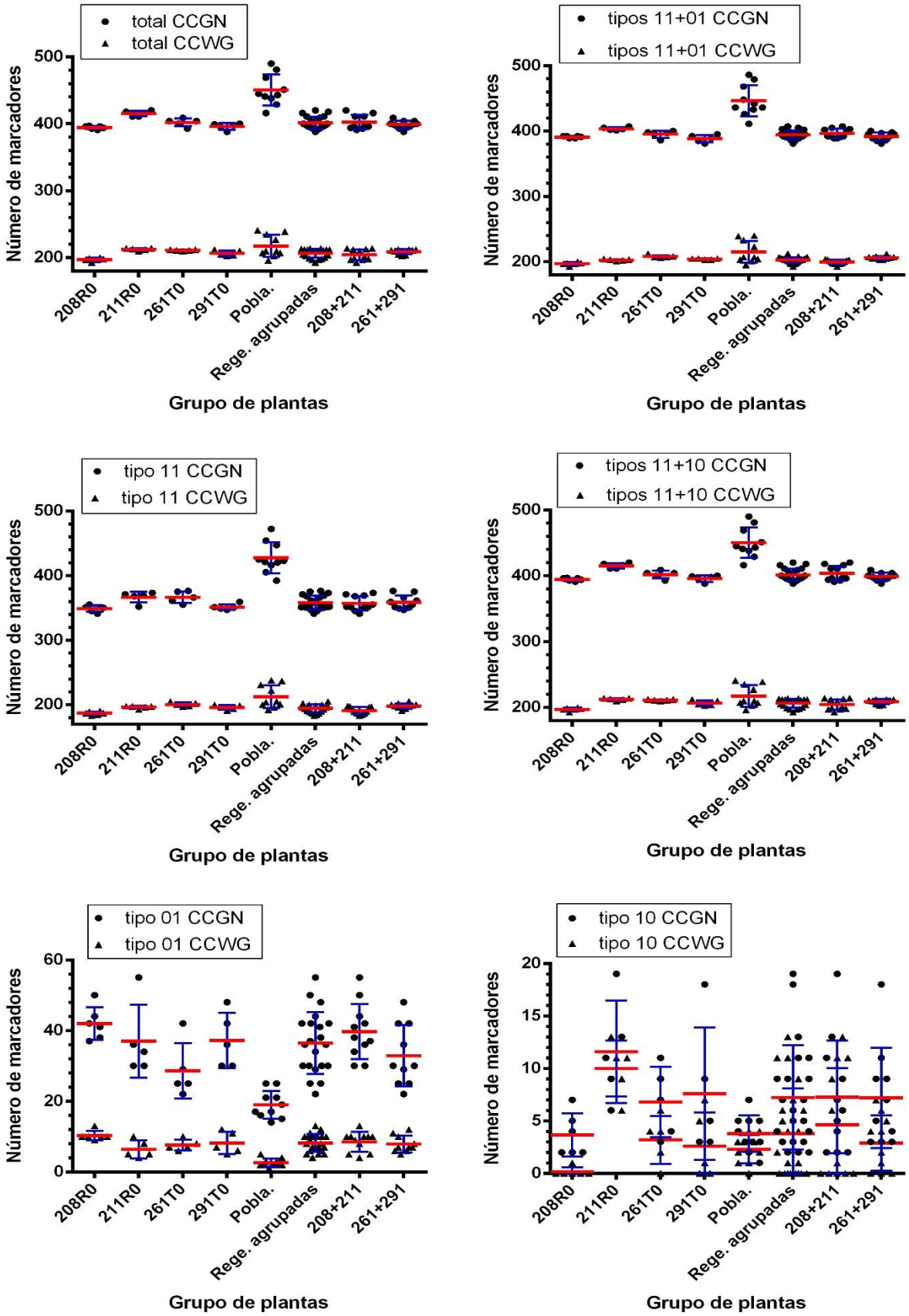


**Figura 4.2.** Número de marcadores metAFLP, totales y de distintos tipos, detectados en cada planta y grupo analizado con los grupos de cebadores CCGN y CCWG en *Arabidopsis thaliana*; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Los marcadores metAFLP detectados pueden separarse en dos grupos teniendo en cuenta el contexto de metilación que pueden detectar cada uno de los cebadores selectivos que se han empleado para su obtención. Respecto a la secuencia diana común para *Acc65*I y *Kpn*I 5´-GGTACC-3', los cebadores P1, P2, P3 y P4 permiten detectar cambios en los patrones por metilación de la citosina externa en el contexto CG y metilación de la citosina interna en el contexto CHG y forman el grupo que hemos denominado CCGN. Por su parte, P5 y P6 forman el grupo denominado como CCWG que detecta la metilación de la citosina externa en el contexto CHG y la metilación de la citosina interna en el contexto CHH.

Cuando se analizaron de forma separada los marcadores obtenidos con cada uno de los grupos de cebadores en cada una de las plantas (Figura 4.2), también se observaron diferencias en los valores medios al comparar la población con los distintos agrupamientos de las plantas regeneradas. Así, fue significativamente mayor en la población que en el agrupamiento de todas las plantas regenerados tanto el número de marcadores total, de tipo 11 como de tipos 11+01 obtenidos tanto con el grupo CCNG (*t* de Student; $p<0,0001$) como también con el grupo CCWG (*t* de Student; $p<0,01$). Por su parte, el número de marcadores 01 fue significativamente menor en la población que en el agrupamiento de plantas regeneradas tanto para CCNG como CCWG (*t* de Student; $p<0,0001$). Por lo tanto, los marcadores obtenidos con los dos grupos de cebadores revelaron un mismo patrón, con un mayor número total y de marcadores correspondientes a sitios cortados por *Kpn*I en las plantas de la población que en las plantas regeneradas y un menor número de marcadores de tipo 01 en las plantas de la población que en las regeneradas.

Cuando se compara la proporción media con la que aparecen los distintos tipos de marcadores (Tabla 4.2) también se observaron diferencias significativas (Test *Z*; $p<0.05$) en la frecuencia relativa de los códigos 11 y 01 entre las plantas de la población control y las plantas regeneradas de cada una de las líneas celulares o su agrupamiento, pero no para los códigos 10 (excepto en el caso de la línea 211R0). Respecto a la citosina situada en el extremo 3' de la secuencia diana, los tipos 01 son proporcionales al número de sitios metilados o hemimetilados y los tipos 11 al número de sitios sin metilación. Las diferencias significativas detectadas indican que en las plantas regeneradas existen, proporcionalmente en su genoma, un número menor de sitios no metilados y aproximadamente más del doble de sitios 5´-GGTACC-3' metilados que en las plantas de la población de origen.

**Tabla 4.2.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas en *Arabidopsis thaliana*.

| | Pobl. control (COL) | Línea 208R0 | Línea 211R0 | Línea 261T0 | Línea 291 0 | Líneas agrupadas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| código 11 | 95,9 ± 0,7 | 91,0 ± 0,6 | 89,7 ± 1,6 | 92,5 ± 0,7 | 90,8 ± 1,2 | 90,8 ±1,5 |
| código 10 | 0,9 ± 0,4 | 0,6 ± 0,4 | 3,4 ± 1,1 | 1,6 ± 0,7 | 1,7 ± 1,5 | 1,8 ± 1,4 |
| código 01 | 3,2 ± 0,5 | 8,8 ± 0,9 | 6,9 ± 1,8 | 5,9 ± 1,1 | 7,5 ± 1,6 | 7,4 ± 1,8 |

(± corresponde a la desviación típica)

Si para el cálculo se tienen en cuenta únicamente a los marcadores obtenidos con *Kpn*I en cada planta (11+01), para evitar los problemas de interpretación de los patrones generados por *Acc65*I, en las plantas de la población los códigos 01 han oscilado entre el 2,2 % al 4,3 %, con un valor medio del 3,2 %, mientras que en las plantas regeneradas de las líneas celulares los valores han sido entre el 7,9 % y el 10,3 % con valor medio de 8,9 % para la línea 208R0, entre el 5,6 % y el 10,7 % con un valor medio de 7,1 % para la línea 211R0, entre el 4,6 % y el 8,0 % con un valor medio de 6,0 % para la línea 261T0 y entre el 5,9 % y el 10,0 % con un valor medio de 7,7 % para la línea 291T0. Considerando todas las plantas regeneradas en conjunto, el valor medio estimado de metilación de la citosina terminal, en éstas plantas, sería del 7,5 % de los motivos 5´-GGTACC-3'.

### 4.1.1 Polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Los distintos marcadores metAFLP detectados se clasificaron como monomórficos o polimórficos atendiendo a la presencia de los códigos 11, 01, 10 y 00, de tal forma que si todas las plantas del grupo de análisis (población o línea regenerada) mostraban el mismo código, se ha considerado al marcador como monomórfico y, en caso contrario, como polimórfico.

Se han mostrado como monomórficos el 50,1 % de los 887 marcadores totales detectados cuando se compararon el total de 31 plantas analizadas. En el grupo de la población control se han mostrado como monomórficos el 57,8 % (495) de los marcadores mientras que en las líneas de plantas regeneradas lo han sido el 89,1 % (550) para 208R0 y el 88,4% (574) para 211R0 y en las líneas de plantas transgénicas los valores fueron del 86,4 % (557) para 261T0 y del 87,6 % (556) para 291T0. Comparando los valores obtenidos en las plantas regeneradas y en las transgénicas no se observan diferencias estadísticamente significativas, por lo que estos datos revelan una distribución homogénea de polimorfismo en cada uno de los procesos de regeneración (Tabla 4.3). Por contra, en las líneas celulares los

valores de polimorfismo son significativamente muy inferiores al obtenido en la población control (Test *Z*; $p<0.01$).

**Tabla 4.3.** Polimorfismo de marcadores metAFLP en cada grupo de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

| | Marcadores totales | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletones* |
| P. control (COL) | 857 | 490 (57,2) | 5 (0,6) | 0 (0,0) | 362 (42,2) | 19 (2,2) | 131 (15,3) |
| Línea 208R0 | 617 | 513 (83,1) | 37 (6,0) | 0 (0,0) | 67 (10,9) | 25 (4,1) | 41 (6,6) |
| Línea 211R0 | 649 | 537 (82,7) | 30 (4,6) | 7 (1,1) | 75 (11,6) | 25 (3,9) | 38 (5,9) |
| Línea 261T0 | 645 | 538 (83,4) | 18 (2,8) | 1 (0,2) | 88 (13,6) | 27 (4,2) | 30 (4,7) |
| Línea 291T0 | 635 | 528 (83,1) | 27 (4,3) | 1 (0,2) | 79 (12,4) | 21 (3,3) | 37 (5,8) |
| Líneas agrupadas | 698 | 474 (67,9) | 13 (1,9) | 0 (0,0) | 211 (30,2) | 49 (7,0) | 39 (5,6) |

(Porcentajes entre paréntesis)

En cuanto a los marcadores polimórficos, hay que destacar que un gran número de ellos corresponden a diferencias presentes en una única planta del grupo analizado ("*singletones*"). Así, más de un tercio (36,2 %) de los marcadores polimórficos en la población control corresponden a este tipo y en las líneas celulares sus valores van desde poco más de un tercio a cerca de dos tercios (34,2 % al 61,2 %). Sin embargo, cuando se agrupan las plantas regeneradas de todas las líneas, los "*singletones*" representan solo el 18,5 % de los marcadores polimórficos, indicando la presencia de marcadores polimórficos comunes en procesos independientes de regeneración.

En los marcadores polimórficos, se ha diferenciado entre marcadores cuya variación se debe exclusivamente a diferencias en estado de metilación en la secuencia 5´-GGTACC-3' del resto de marcadores polimórficos, en los que también han podido ocurrir cambios a nivel de secuencia nucleotídica entre los individuos comparados. Dado el comportamiento de *Acc65*I y *Kpn*I en los distintos estados de metilación, los marcadores que se hayan mostrado únicamente como 11 ó 01 en todos los individuos comparados, deberán su polimorfismo exclusivamente a la diferencia en el estado de metilación. En la tabla 4.3 se puede observar que en la población control sólo el 2,2 % de los marcadores presentaron polimorfismo originado exclusivamente en diferencias de estado metilación, lo que corresponde a un 5,2 %

del total de marcadores polimórficos. En las plantas regeneradas, se observó un porcentaje de marcadores polimórficos significativamente inferior, como cabría esperar al comparar plantas clónicas, entre el 10,9 % y el 13,6 % y unos valores para los marcadores polimórficos por metilación del 3,3 % al 4,2 % pero que se corresponden con frecuencias del 26,6 % al 37,3 % de los marcadores polimórficos.

Al agrupar las plantas regeneradas de las distintas líneas, aumentó el porcentaje de marcadores polimórficos al 30,2 % que sigue siendo significativamente inferior al de la población control (Test *Z*; $p<0.01$), correspondiendo el 23,2 % de ellos a cambios exclusivamente de metilación. Estos datos apuntan a que las diferencias a nivel de secuencia nucleotídica son el principal componente del polimorfismo detectado entre la población control, con baja incidencia de los patrones de metilación, mientras que en las plantas regeneradas y transgénicas los polimorfismos de metilación representan una fracción mucho más importante en la variación observada en los patrones metAFLP. No se han encontrado diferencias significativas entre los valores obtenidos para las líneas de plantas regeneradas y las regeneradas transgénicas en este aspecto (Test *Z*; $p<0.01$).

Los datos de polimorfismo obtenidos cuando se agrupan los marcadores atendiendo a los contextos de metilación que detectan los cebadores con los que se han obtenido, los denominados grupos CCGN y CCWG, se presentan en la tabla 4.4. Cuando se compararon los valores se observó la existencia de diferencias significativas en cuanto al porcentaje de marcadores polimórficos detectados por estos dos grupos, presentando mayores niveles de polimorfismo los marcadores del grupo CCGN, tanto para la población como para las líneas celulares, lo que se ve reflejado directamente en un mayor porcentaje de los marcadores monomórficos de tipo 11 (dianas no metiladas) en el grupo CCWG y una mayor frecuencia de marcadores polimórficos exclusivamente por metilación en el grupo CCGN. También existe una menor tasa de marcadores polimórficos en un único individuo ("*singletones*") en el grupo CCWG.

**Tabla 4.4.** Polimorfismo de los marcadores metAFLP detectados con los grupos de cebadores CCGN (arriba) y CCWG (abajo) en *Arabidopsis thaliana*.

| | Marca-dores | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletones* |
| Pob. control (COL) | 578<br>279 | 312 (53,9)<br>178 (63,8)** | 5 (0,9)<br>0 (0,0) | 0 (0,0 )<br>0 (0,0) | 261 (45,2)<br>101 (36,2)* | 16 (2,8)<br>3 (1,1) | 100 (17,3)<br>31 (11,1)* |
| Línea 208 R0 | 416<br>201 | 330 (79,3)<br>183 (91,0)** | 30 (7,2)<br>7(3,5) | 0 (0,0)<br>0 (0,0) | 56 (13,5)<br>11 (5,5)** | 22 (5,3)<br>3 (1,5)* | 36 (8,7)<br>5 (2,5)** |
| Línea 211 R0 | 431<br>218 | 344(79,8)<br>193 (88,5)** | 26 (6,0)<br>4(1,8)* | 2 (0,5)<br>5 (2,3)* | 59 (13,7)<br>16 (7,3)* | 23 (5,3)<br>4 (1,8)* | 31 (7,2)<br>7 (3,2)* |
| Línea 261 T0 | 426<br>219 | 344 (80,8)<br>194 (88,6)* | 13 (3,1)<br>5 (2,3) | 1 (0,2)<br>0 (0,0) | 68 (16,0)<br>20 (9,1)* | 21(4,9)<br>5 (2,3) | 26 (6,1)<br>4 (1,8)* |
| Línea 291 T0 | 422<br>213 | 338 (80,1)<br>190 (89,2)** | 23(5,5)<br>4 (1,9)* | 1 (0,2)<br>0 (0,0) | 60 (14,2)<br>19 (8,9) | 14 (3,3)<br>6 (2,8) | 32 (7,6)<br>5 (2,3)** |
| Líneas agrupadas | 473<br>225 | 297 (62,8)<br>177 (78,7)** | 11 (2,3)<br>2 (0,9) | 0 (0,0)<br>0 (0,0) | 165 (34,9)<br>46 (20,4)** | 44 (9,3)<br>9 (4,0)* | 36 (7,6)<br>3 (1,3)** |

Diferencias significativas en las proporciones (test-*Z*): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; porcentajes entre paréntesis.

Empleando el total de marcadores detectados, se obtuvo el índice de identidad IRM para marcadores de tipo MSAP considerando todas las parejas de plantas analizadas. El índice osciló entre 0,673 y 0,969, mostrando un valor medio de 0,807 al comparar las plantas correspondientes a la población y de 0,950, 0,936, 0,921, y 0,930 dentro de las líneas celulares 208R0, 211R0, 261T0 y 291T0, respectivamente. Las relaciones de identidad entre el total de las 31 plantas analizadas se presentan gráficamente mediante un dendrograma en la figura 4.3 en la que se aprecia la agrupación de las plantas regeneradas de acuerdo a su línea celular de procedencia.

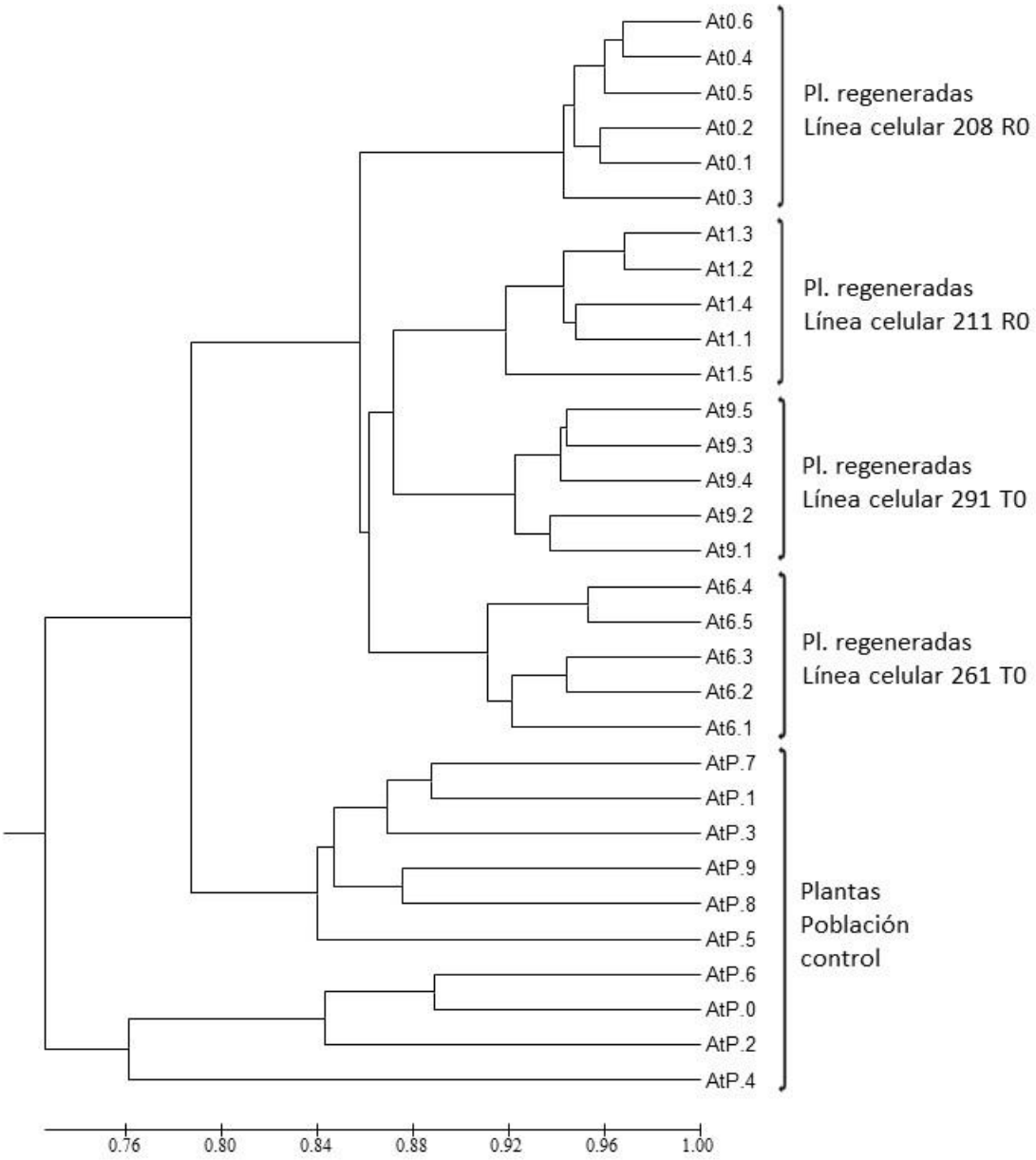


**Figura 4.3.** Fenograma obtenido usando el índice de identidad IRM y agrupamiento mediante UPGMA para *Arabidopsis thaliana*.

Para analizar la variación que se ha detectado entre las plantas regeneradas obtenidas de una misma línea celular, para cada marcador metAFLP se ha considerado como estado de partida original el que presentaba el mayor número de plantas regeneradas de la misma línea. En el caso de la línea 208R0, representada por seis plantas, cuando se obtuvo un empate entre dos códigos para un marcador se tomó el tipo 11 (desmetilado) como estado inicial dado que es el más frecuente y que, además, no se presentaron igualdades en las que no participara el tipo 11.

En la tabla 4.5 se puede observar que la frecuencia de marcadores polimórficos epigenéticos detectados en las plantas regeneradas para cada línea celular, mostró una variación que va desde 0,5 % al 4,3 % con unos valores medios del 1,5 %, 1,8 %, 1,9 % y 1,8 % en las líneas 208R0, 211R0, 261T0 y 291T0, respectivamente, y una valor medio total del 1,7 %. Por su parte las variaciones observadas en una sola planta ("*singletones*") para cada línea celular mostraron valores que oscilan de cero al 74,1 % en los marcadores polimórficos detectados, con unos valores medios del 26,7 %, 26,5 %, 20,5 % y 13,6 % en las líneas 208R0, 211R0, 261T0 y 291T0, respectivamente, y una media total del 22,1 %. Por lo tanto en todas las líneas celulares, las plantas regeneradas comparten gran parte de las variaciones que se han detectado.

Considerando los datos de las cuatro líneas celulares, se han encontrado todos los posibles tipos de variación posibles (Tabla 4.5), siendo el más frecuente en todas ellas el denominado 01(11) que implica un estado de metilación que impide el corte por *Acc65*I mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea celular muestran un estado no metilado, lo que se atribuye a un proceso de metilación en la diana. Sin embargo, a nivel individual se ha observado en siete de las 21 plantas, distribuidas en las cuatro líneas celulares, un mayor o igual número de cambios denominados 11(01) que implican un estado no metilado mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea presentan un estado de metilación que impide el corte por *Acc65*I, es decir un proceso de pérdida de metilación en la diana. Los cambios de tipo 10(11) son los terceros en frecuencia, siendo los más abundantes en dos plantas, en los que la ausencia del marcador en la digestión con *Kpn*I puede atribuirse a un proceso de metilación de la citosina interna (siempre que dicha metilación no afecte a *Acc65*I, lo que se desconoce) pero también a que aparezcan situaciones en las que existan dos puntos de corte en el rango de tamaños analizados y que se encuentren en distinto estado de metilación en la citosina externa (Figura 4.4).

**Tabla 4.5.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular en *Arabidopsis thaliana*.

| Línea celular | Planta | Marcadores totales | Tipo de variación [a] | | | | | | Total (%) | *Single-tones* [b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 01(11) | 10(11) | 11(01) | 11(10) | 10(01) | 01(10) | | |
| 208R0 | At0.1 | 596 | 3 | 1 | 2 | 0 | 1 | 0 | 7 (1,2) | 2 (28,6) |
| | At0.2 | 597 | 4 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 8 (1,3) | 2 (25,0) |
| | At0.3 | 593 | 2 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 8 (1,3) | 5 (62,5) |
| | At0.4 | 591 | 5 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 (1,0) | 0 (0,0) |
| | At0.5 | 586 | 11 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 11 (1,9) | 4 (36,4) |
| | At0.6 | 589 | 12 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 13 (2,2) | 1 (7,7) |
| 211R0 | At1.1 | 625 | 1 | 4 | 1 | 0 | 2 | 1 | 9 (1,4) | 0 (0,0) |
| | At1.2 | 630 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 6 (1,0) | 1 (16,1) |
| | At1.3 | 633 | 2 | 4 | 3 | 1 | 1 | 0 | 11 (1,7) | 1 (9,1) |
| | At1.4 | 621 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 (0,5) | 1 (33,3) |
| | At1.5 | 630 | 20 | 4 | 0 | 1 | 0 | 2 | 27 (4,3) | 20 (74,1) |
| 261T0 | At6.1 | 612 | 15 | 1 | 2 | 1 | 0 | 0 | 19 (3,1) | 7 (36,8) |
| | At6.2 | 615 | 5 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 9 (1,5) | 2 (22,2) |
| | At6.3 | 619 | 1 | 0 | 6 | 0 | 0 | 0 | 7 (1,1) | 1 (14,3) |
| | At6.4 | 605 | 7 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 14 (2,3) | 1 (7,1) |
| | At6.5 | 615 | 5 | 0 | 4 | 0 | 0 | 0 | 9 (1,5) | 2 (22,2) |
| 291T0 | At9.1 | 608 | 1 | 2 | 10 | 0 | 1 | 0 | 14 (2,3) | 5 (35,7) |
| | At9.2 | 611 | 1 | 4 | 4 | 0 | 1 | 0 | 10 (1,6) | 1 (10,0) |
| | At9.3 | 591 | 2 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 5 (0,8) | 0 (0,0) |
| | At9.4 | 600 | 7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 8 (1,3) | 0 (0,0) |
| | At9.5 | 604 | 13 | 3 | 0 | 1 | 0 | 1 | 18 (3,0) | 4 (22,2) |

[a] Código presente en cada planta y código presente más frecuente (entre paréntesis) para cada línea celular.
[b] Variaciones observadas únicamente en la planta correspondiente; el porcentaje respecto a los marcadores polimórficos en dicha planta aparece entre paréntesis.

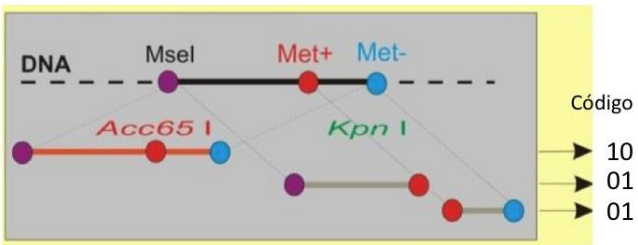


**Figura 4.4.** Origen de los marcadores metAFLP de tipo 10 por presencia de dos dianas para *Acc65*I/*Kpn*I con distinto estado de metilación (Met+ y Met-) en su citosina 3' terminal (Machczynska y col., 2014b).

Por lo tanto, analizando únicamente aquellos tipos de cambios que pueden atribuirse exclusivamente a modificaciones en el estado de metilación del motivo 5´-GGTACC-3', se han observado procesos tanto de metilación como de pérdida de metilación en las plantas regeneradas y en las transgénicas, siendo a nivel global más abundantes los procesos de metilación, principalmente como consecuencia de su acumulación en una o dos plantas en cada una de las líneas celulares.

También se ha empleado el método ampliado de Machczynska y col. (2014b) basado en el descrito por Bednarek y col. (2007) de análisis de marcadores metAFLP para describir las características cualitativas y cuantitativas de la variación inducida por el cultivo de tejidos. Esta metodología consiste en el análisis conjunto de la planta donadora y las plantas regeneradas obtenidas a partir de ella y en la interpretación estricta de que la actividad de la endonucleasa *Kpn*I no se ve afectada en modo alguno por ningún estado de metilación en las dos citosinas presentes en su secuencia diana mientras que la actividad de la endonucleasa *Acc65*I está siempre bloqueada por la presencia de citosinas metiladas.

Se han obtenido, para todos los marcadores y plantas regeneradas analizadas, los códigos binarios de cuatro dígitos propuestos por Bednarek y col. (2007) reemplazando el código que correspondería a la planta donadora por el código presente con mayor frecuencia en la línea celular correspondiente, tal y como se indicó anteriormente. En la tabla 4.6 se presentan las frecuencias absolutas correspondientes a los distintos códigos de cuatro dígitos que mostraron cada una de las plantas regeneradas de las distintas líneas celulares. El código binario indica, en este orden, la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Acc65*I seguido de la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Kpn*I.

A partir de los datos de la tabla 4.6 y aplicando las fórmulas y coeficientes de corrección propuestos por Machczynska y col. (2014b) se han calculado distintos parámetros que describen las características de la variación presente en las plantas regeneradas en cada línea celular, distinguiendo entre la variación correspondiente a cambios en la secuencia de nucleótidos y a procesos tanto de pérdida como de ganancia de metilación, así como una estimación del estado de metilación a nivel global del genoma (Tabla 4.7).

**Tabla 4.6.** Frecuencias absolutas de patrones metAFLP conservados y variables entre las plantas regeneradas obtenidas en cada línea celular de *Arabidopsis thaliana*, según los códigos binarios de cuatro dígitos propuestos por Bednarek y col. (2007).

| Línea celular | Planta | Códigos de patrones metAFLP | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Conservados | | | Correspondientes a variación | | | | | | | | | | | | |
| | | 1111 | 0011 | 1100 | 0001 | 0111 | 0101 | 0100 | 1011 | 1010 | 1001 | 1000 | 1110 | 1101 | 0010 | 0110 |
| 208R0 | At0.1 | 537 | 42 | 1 | 5 | 2 | 1 | 2 | 3 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| | At0.2 | 537 | 41 | 1 | 2 | 4 | 4 | 4 | 4 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | At0.3 | 533 | 41 | 1 | 5 | 3 | 2 | 3 | 2 | 3 | 0 | 1 | 3 | 0 | 1 | 0 |
| | At0.4 | 536 | 45 | 1 | 2 | 0 | 0 | 1 | 5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | At0.5 | 524 | 45 | 2 | 4 | 0 | 0 | 0 | 11 | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | At0.6 | 528 | 44 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 12 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| 211R0 | At1.1 | 563 | 34 | 12 | 3 | 1 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 5 | 4 | 0 | 3 | 2 |
| | At1.2 | 566 | 33 | 18 | 0 | 4 | 0 | 7 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 | 0 |
| | At1.3 | 563 | 33 | 17 | 0 | 3 | 1 | 8 | 2 | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | 3 | 1 |
| | At1.4 | 564 | 38 | 10 | 5 | 1 | 0 | 1 | 1 | 3 | 0 | 8 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | At1.5 | 542 | 40 | 14 | 3 | 0 | 2 | 2 | 20 | 3 | 2 | 1 | 4 | 1 | 0 | 0 |
| 261T0 | At6.1 | 550 | 30 | 1 | 4 | 2 | 7 | 1 | 15 | 6 | 0 | 2 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| | At6.2 | 562 | 29 | 2 | 2 | 3 | 1 | 10 | 5 | 4 | 0 | 2 | 1 | 0 | 1 | 0 |
| | At6.3 | 568 | 27 | 4 | 0 | 6 | 4 | 9 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | At6.4 | 553 | 26 | 4 | 0 | 3 | 3 | 5 | 7 | 8 | 0 | 0 | 4 | 0 | 4 | 0 |
| | At6.5 | 563 | 26 | 3 | 4 | 4 | 5 | 5 | 5 | 4 | 0 | 1 | 0 | 0 | 3 | 0 |
| 291T0 | At9.1 | 545 | 31 | 5 | 3 | 10 | 4 | 6 | 1 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 |
| | At9.2 | 543 | 34 | 5 | 1 | 4 | 3 | 15 | 1 | 2 | 0 | 0 | 4 | 0 | 3 | 1 |
| | At9.3 | 542 | 38 | 3 | 3 | 1 | 0 | 0 | 2 | 6 | 0 | 0 | 0 | 2 | 3 | 0 |
| | At9.4 | 540 | 41 | 2 | 5 | 1 | 3 | 1 | 7 | 3 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | At9.5 | 534 | 41 | 2 | 5 | 0 | 3 | 1 | 13 | 0 | 1 | 1 | 3 | 1 | 1 | 0 |

**Tabla 4.7.** Porcentaje medio de cambios inducidos durante el cultivo *in vitro* y estado de metilación en las plantas regeneradas en cada una de las líneas celulares de *Arabidopsis thaliana*.

| Características metAFLP | Línea 208 R0 | Línea 211 R0 | Línea 261 T0 | Línea 291 T0 | Promedio |
|---|---|---|---|---|---|
| Variación de secuencia | 1,24± 0,58 | 1,68± 0,60 | 2,19± 0,81 | 2,03± 0,20 | 1,79± 0,37 |
| Desmetilación | 0,27± 0,27 | 0,36± 0,24 | 0,56± 0,21 | 0,56± 0,64 | 0,44±0,13 |
| Metilación de *novo* | 1,00± 0,63 | 0,84± 1,23 | 1,02± 0,72 | 0,78± 0,79 | 0,91±0,10 |
| Variación compleja | 0,38± 0,29 | 1,02± 0,31 | 1,08± 0,49 | 0,84± 0,81 | 0,83±0,28 |
| Variación de secuencia corregida | 1,43± 0,70 | 2,28± 0,63 | 2,82± 0,63 | 2,54± 0,64 | 2,27±0,52 |
| Desmetilación corregida | 0,31± 0,36 | 0,49± 0,38 | 0,71± 0,40 | 0,70± 0,84 | 0,55±0,17 |
| Metilación de *novo* corregida | 1,15± 0,61 | 1,14± 1,29 | 1,31± 0,73 | 0,98± 0,84 | 1,14±0,12 |
| Variación total inducida por cultivo de tejidos | 2,88± 0,71 | 3,91± 1,18 | 4,85± 0,87 | 4,22± 0,98 | 3,97±0,71 |
| Sitios afectados por cambio en metilación | 1,46± 0,44 | 1,63± 1,05 | 2,03± 0,42 | 1,68± 0,69 | 1,70±0,21 |
| Sitios no afectados por el cultivo de tejidos | 97,12± 0,71 | 96,09± 1,18 | 95,15± 0,87 | 95,78± 0,98 | 96,03±0,71 |
| Metilación heredada | 7,14± 0,31 | 7,49± 0,39 | 4,69± 0,13 | 6,32±0,43 | 6,41±1,08 |
| Estado no metilado heredado | 86,31± 0,77 | 86,37± 1,40 | 86,76±1,04 | 85,18±0,61 | 86,16±0,59 |
| Genoma metilado | 8,59± 0,94 | 8,77± 1,62 | 6,14±0,83 | 7,65±1,22 | 7,78±1,04 |
| Genoma no metilado | 91,41± 0,94 | 91,23± 1,63 | 93,86± 0,83 | 92,35± 1,22 | 92,22±1,04 |

(± corresponde a la desviación típica)

Las cuatro primeras características de la tabla 4.7 (variación de secuencia, desmetilación, metilación de *novo* y variación compleja) corresponden a la interpretación inicial de Bednarek y col. (2007), mientras que los valores que se indican como corregidos son los obtenidos después de aplicar el método extendido de Machczynska y col. (2014b) que permite asignar específicamente a una de las otras tres categorías (variación de secuencia, desmetilación y metilación de *novo*) cada uno de los procesos englobados inicialmente dentro de la categoría denominada "variación compleja". Como consecuencia, los valores corregidos

de estos tres parámetros son superiores a los calculados sin aplicar los coeficientes correspondientes.

Para todas las características cuantitativas descritas en la tabla 4.7 se han obtenido unos valores muy próximos en las distintas líneas celulares, no existiendo diferencias significativas entre ellos (test-Z; $p < 0.01$), de tal forma que el porcentaje medio de motivos 5´-GGTACC-3' afectados por el cultivo de tejidos en las plantas analizadas de *Arabidopsis* fue del 3,97 %, correspondiendo un 2,27 % a cambios en su secuencia nucleotídica y un valor inferior, del 1,70 %, a modificaciones en el estado de metilación. Este valor medio global del 1,7 % coincide exactamente con el calculado anteriormente empleando únicamente los datos de los seis tipos de variación originados exclusivamente por cambios de metilación que figuran en la tabla 4.5. También los valores obtenidos para cada línea celular (1,46 %, 1,63 %, 2,03 % y 1,68 % en las líneas 208R0, 211R0, 261T0 y 291T0, respectivamente) son muy próximos a los calculados a partir de los datos de la tabla 4.5 (1,48 %, 1,78 %, 1,90 % y 1,80 % en las líneas 208R0, 211R0, 261T0 y 291T0, respectivamente).

En todas las líneas celulares se observa un porcentaje más elevado de procesos de metilación de *novo* frente a los procesos de desmetilación, con unos valores medios del 1,14 % y del 0,55 %. El porcentaje medio de sitios de restricción metilados que mantuvieron su estado fue del 6,41 % mientras que el de sitios que mantuvieron su estado no metilado fue del 86,16 %. La cuantificación del porcentaje de sitios metilados presentes en las plantas regeneradas, empleando esta metodología, implica que su genoma presentaría una tasa de metilación del 7,78 %. Este valor es muy próximo al valor de 7,50 % calculado anteriormente a partir de la frecuencia de los marcadores de distinto tipo obtenidos únicamente con *Kpn*I en cada planta, siendo ambos valores muy superiores al calculado para las plantas de la población control, del 3,2 %.

### 4. 2 Detección de marcadores moleculares metAFLP en *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variedad Nipponbare

Mediante el empleo de los isoesquizómeros *Acc*65I y *Kpn*I, que reconocen la secuencia diana palindrómica 5´-GGTACC-3' pero presentan un comportamiento diferente según el estado de metilación de las citosinas en cada una de las dos cadenas del ADN, se han obtenido marcadores metAFLP para un total de 28 plantas de arroz (*Oryza sativa* spp. Japónica) variedad Nipponbare. Las plantas analizadas correspondían a siete individuos de la población

control, once plantas regeneradas a partir de dos líneas celulares independientes (seis plantas de la línea R1 y cinco plantas de la línea R3) y diez plantas transgénicas obtenidas a partir de otras dos líneas celulares independientes (cinco plantas de la línea T2 y cinco plantas de la línea T4).

Se obtuvieron doce electroferogramas para cada una de estas 28 plantas, correspondientes a seis combinaciones de cebadores selectivos empleados tanto para la digestión con *Acc*65I como para la digestión con *Kpn*I. Usando el mismo procedimiento descrito anteriormente para *A. thaliana*, el análisis de los correspondientes 336 electroferogramas permitió identificar un total de 745 marcadores metAFLP (Tabla 4.8). El número de marcadores detectado implicó la realización de una matriz global de presencia-ausencia de 41.720 datos, al tener que considerarse la situación de cada uno de los marcadores en cada planta y reacción de digestión.

**Tabla 4.8.** Marcadores metAFLP detectados con cada combinación de cebadores selectivos en arroz.

| Combinación | Marcadores totales n=28 | P. control n=7 | Línea R1 n=6 | Línea R3 n=5 | Línea T2 n=5 | Línea T4 n=5 | Líneas agrupadas n=21 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| P1 [a] | 102 | 93 | 91 | 99 | 91 | 90 | 99 |
| P2 [a] | 121 | 116 | 117 | 115 | 120 | 119 | 121 |
| P3 [a] | 121 | 114 | 116 | 115 | 114 | 120 | 121 |
| P4 [a] | 119 | 117 | 117 | 111 | 113 | 115 | 117 |
| P5 [b] | 141 | 137 | 139 | 135 | 136 | 134 | 141 |
| P6 [b] | 141 | 139 | 135 | 138 | 134 | 137 | 139 |
| TOTAL | 745 | 716 | 715 | 713 | 708 | 715 | 738 |

[a] cebador del grupo CCGN; [b] cebador del grupo CCWG

El número de marcadores distintos detectados ha sido de 716 para la población control, que corresponden al 96,1 % del total de marcadores, y de 715 y 713 en las plantas regeneradas de las líneas celulares R1 y R3, así como de 708 y 715 en las plantas transgénicas de las líneas celulares T2 y T4 respectivamente (Tabla 4.8). Por otra parte, si se agrupan todas las plantas obtenidas en las cuatro líneas celulares, el número de marcadores distintos detectados es de 738 (99,1 % del total). Por lo tanto, el número de marcadores distintos detectados en los materiales de arroz de la variedad Nipponbare utilizados como población

control resultó ser muy similar al número de marcadores detectados en plantas regeneradas por embriogénesis somática o por transformación genética.

El número total de marcadores metAFLP detectado en cada una de las plantas se presenta gráficamente en la figura 4.5 y es proporcional al número de sitos 5´-GGTACC-3' que pueden ser cortados indistintamente por *Acc*65I y *Kpn*I. Teniendo en cuenta el código binario de dos dígitos (primer dígito para *Acc*65I y segundo dígito para *Kpn*I), la suma de marcadores de tipo 11 y 01 corresponde a los cortes por *Kpn*I y la suma de tipos 11 y 10 a los cortes por *Acc*65I. En todas las plantas el número de fragmentos generados por *Kpn*I ha sido superior al de *Acc*65I, como consecuencia de la presencia de distintos estados de metilación de la secuencia diana que afectan sobre todo a la actividad de *Acc*65I, tal y como se indicó anteriormente.

En la población control, el número total de marcadores por planta ha variado entre 665 y 691, que representan del 92,9 % al 96,5 % del total de marcadores detectado en dicha población, con un valor medio de 683,3. Por su parte, en cada una de las líneas celulares ha variado entre 647 y 700 (media de 684,2) en la línea R1, entre 653 y 696 (media de 679,2) en la línea R3, entre 668 y 692 (media de 682,2) en la línea T2 y entre 660 y 704 (media de 688,8) en la línea T4, que representan, los siguientes porcentajes del total de marcadores detectado en cada una de dichas líneas: del 90,5 % al 97,9 % en R1, del 91,6 % al 97,6 % en R3, del 94,4 % al 97,7 % en T2 y del 92,3 % al 98,5 % en T4. Considerando a las 21 plantas regeneradas como un único grupo, el número medio de marcadores por planta fue de 683,6, observándose que la distribución de la variación en la población control es muy similar a la observada en el grupo de regeneradas agrupadas. El valor medio de marcadores totales por planta no presentó diferencias significativas entre la población control y los agrupamientos de plantas regeneradas (R1+R3), regeneradas transgénicas (T2+T4) y total de regeneradas agrupadas. Tampoco se observaron diferencias significativas en la población control respecto al valor medio en cada una de las cuatro líneas celulares.

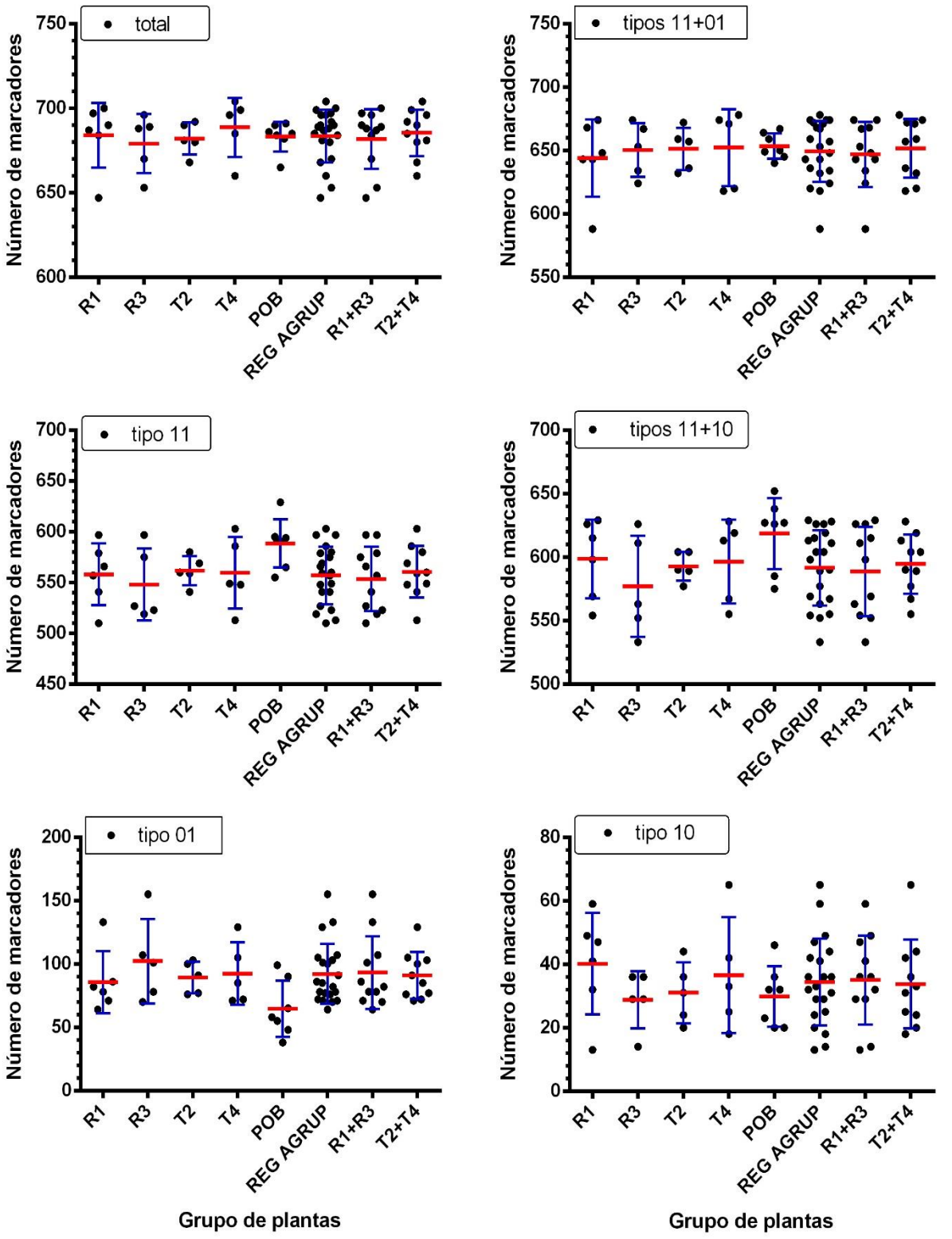


**Figura 4.5.** Número de marcadores metAFLP detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en arroz; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Cuando se consideran únicamente los marcadores generados por la endonucleasa *Kpn*I (tipo 11 + tipo 01) a la que no le afecta la metilación en la citosina en posición 3', se observa que los valores medios no son significativamente diferentes en la población control respecto a cualquiera de los agrupamientos de las plantas regeneradas ni en los valores medios obtenidos en cada línea celular (Figura 4.5). Cuando se analizan los marcadores generados por la endonucleasa *Acc*65I (tipo 11 + tipo 10) tampoco existen diferencias significativas entre los grupos analizados respecto al número total de marcadores por planta.

Al comparar independientemente cada uno de los tres tipos de marcadores se comprobó que los del tipo 11 son los de mayor presencia en todas las plantas, seguidos por los de tipo 01 y finalmente por los de tipo 10. El número medio de marcadores tipo 11 fue ligeramente superior en la población y el de tipo 01 ligeramente inferior, respecto a los valores obtenidos en cualquiera de las líneas celulares o sus agrupamientos para cada uno de estos tipos de marcadores, pero estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. Para estos dos tipos de marcadores, 11 y 01, tampoco se observaron diferencias significativas respecto a su número medio de marcadores por planta, entre los agrupamientos de las plantas regeneradas y las regeneradas transgénicas. Los valores medios de marcadores de tipo 10, los de menor abundancia, no presentaron diferencias significativas entre los obtenidos para la población control y los correspondientes a los agrupamientos de plantas regeneradas o a las líneas celulares. Tampoco se observaron diferencias significativas entre los agrupamientos de las plantas regeneradas y las regeneradas transgénicas para el valor medio de marcadores de tipo 10.

Cuando se analizaron de forma separada los marcadores obtenidos en cada una de las plantas con cada uno de los grupos de cebadores (grupo CCGN: P1, P2, P3 y P4; grupo CCWG: P5 y P6), se obtuvieron resultados similares a los descritos antes para el global de marcadores, no observándose diferencias significativas entre ninguno de los grupos de plantas comparados y grupo de cebadores analizado (Figura 4.6).

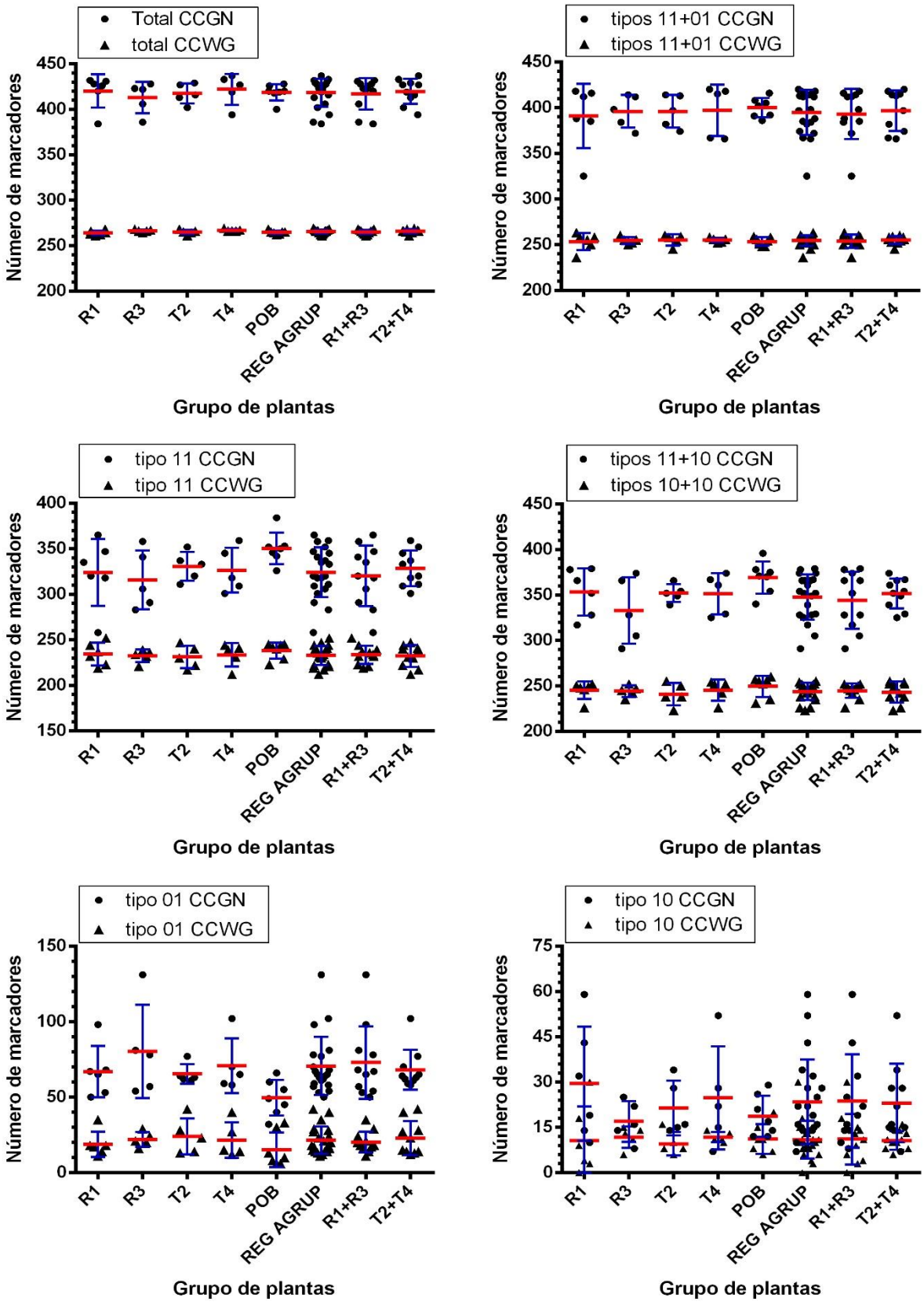


**Figura 4.6.** Número de marcadores metAFLP, totales y de distintos tipos, detectados en cada planta y grupo analizado en arroz con los grupos de cebadores CCGN y CCWG; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Cuando se compara la proporción media con la que aparecen los distintos tipos de marcadores (Tabla 4.9) sí que se observan diferencias significativas (Test *Z*; $p<0.05$) en la frecuencia relativa de los códigos 11 y 01 entre las plantas de la población control y las plantas regeneradas de cada una de las líneas celulares o su agrupamiento. Respecto a los marcadores tipo 11, correspondientes a secuencias diana no metiladas, fueron significativamente más frecuentes en la población control, mientras que los de tipo 01, que son proporcionales al número de sitos que presentan metilación, fueron significativamente más abundantes entre los marcadores detectados en las plantas regeneradas. Para los marcadores de tipo 10 no se observaron diferencias significativas al comparar la población con las líneas regeneradas o su agrupamiento.

**Tabla 4.9.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas de arroz.

| | Pobl. control | Línea R1 | Línea R3 | Línea T2 | Línea T4 | Líneas agrupadas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| código 11 | 86,1 ± 2,4 | 81,6 ± 2,4 | 80,7 ± 3,6 | 82,3 ± 1,5 | 81,2 ± 3,1 | 81,5 ± 2,8 |
| código 10 | 4,4 ± 1,2 | 5,9 ± 2,2 | 4,2 ± 1,2 | 4,6 ± 1,3 | 5,3 ± 2,4 | 5,1 ± 2,0 |
| código 01 | 9,5 ± 2,9 | 12,5 ± 3,3 | 15,1 ± 4,4 | 13,1 ± 1,6 | 13,4 ± 3,3 | 13,5 ± 3,4 |

(± corresponde a la desviación típica)

Si para el cálculo se tienen en cuenta únicamente a los marcadores obtenidos con *Kpn*I en cada planta (11+01), y de esta forma evitar los problemas que implica la interpretación de los patrones de *Acc65*I, en las plantas de la población los códigos 01 han oscilado entre el 5,7 % al 14,9 %, con un valor medio del 9,9 %, mientras que en las plantas regeneradas de las líneas celulares los valores han sido entre el 10,0 % y el 19,7 % con valor medio de 13,3 % para la línea R1, entre el 10,5 % y el 23,0 % con un valor medio de 15,7 % para la línea R3, entre el 11,7 % y el 15,3 % con un valor medio de 13,7 % para la línea T2 y entre el 10,5 % y el 19,0 % con un valor medio de 14,2 % para la línea T4. Considerando todas las plantas regeneradas en conjunto, el valor medio de metilación de la citosina terminal, en éstas plantas, sería del 14,2 % de los motivos 5´-GGTACC-3'.

### 4.2.1 Polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP en arroz *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variedad Nipponbare

Cada uno de los distintos marcadores metAFLP se clasificó como monomórfico o polimórfico atendiendo a la presencia de uno o de varios códigos 11, 01, 10 y 00, respectivamente, dentro del grupo de plantas a considerar. Al comparar las 28 plantas analizadas, se han mostrado como monomórficos el 48,6 % de los 745 marcadores totales detectados. Por su parte, se han mostrado como monomórficos el 74,4 % (533) de los marcadores en la población control, mientras que en las líneas de plantas regeneradas lo han sido el 65,6 % (469) para R1 y el 71,8 % (512) para R3 y en las líneas de plantas regeneradas transgénicas los valores fueron del 76,1 % (538) para T2 y del 75,9 % (542) para T4. Por lo tanto, no se han observado diferencias significativas en cuanto al polimorfismo observado al comparar la población control con las líneas celulares, excepto con la línea R1 (Test Z; $p<0.01$) que además ha presentado el mayor porcentaje de polimorfismo de todos los grupos analizados (Tabla 4.10). Al agrupar las plantas regeneradas de las distintas líneas, aumenta el porcentaje de marcadores polimórficos al 47,8 % siendo significativamente superior al de la población control (Test *Z*; $p<0.01$).

**Tabla 4.10.** Polimorfismo de marcadores metAFLP en cada grupo de plantas de arroz.

| | Marcadores | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletones* |
| P. control | 716 | 501 (70,0) | 26 (3,6) | 6 (0,8) | 183 (25,6) | 63 (8,8) | 87 (12,2) |
| Línea R1 | 715 | 430 (60,1) | 35 (4,9) | 4 (0,6) | 246 (34,4) | 62 (8,7) | 124 (17,3) |
| Línea R3 | 713 | 457 (64,1) | 47 (6,6) | 8 (1,1) | 201 (28,2) | 86 (12,1) | 102 (14,3) |
| Línea T2 | 708 | 482 (68,1) | 45 (6,4) | 11 (1,6) | 170 (24,0) | 67 (9,5) | 88 (12,4) |
| Línea T4 | 715 | 481 (67,3) | 49 (6,9) | 12 (1,7) | 173 (24,2) | 56 (7,8) | 65 (9,1) |
| Líneas agrupadas | 738 | 360 (48,8) | 23 (3,1) | 2 (0,3) | 353 (47,8) | 91 (12,3) | 103 (14,0) |

(Porcentajes entre paréntesis)

Un gran número de marcadores polimórficos han correspondido a diferencias presentes en una única planta del grupo analizado ("*singletones*"). Así, en la población control el 47,5 % corresponde a este tipo de marcador y en las líneas celulares, los valores van desde el 37,6 % al 51,8 %. Por su parte, cuando se agrupan las plantas regeneradas de todas las líneas, los "*singletones*" representan el 29,2 % de los marcadores polimórficos lo que indica la presencia de marcadores polimórficos comunes en procesos independientes de regeneración.

Se ha diferenciado entre los marcadores cuyo polimorfismo se debe exclusivamente a diferencias en el estado de metilación de la secuencia 5´-GGTACC-3' del resto de marcadores polimórficos en los que también han podido ocurrir cambios a nivel de secuencia nucleotídica entre los individuos comparados, dado que los marcadores que se hayan mostrado únicamente como 11 ó 01 en todos los individuos comparados, deberán su polimorfismo exclusivamente a la diferencia en el estado de metilación. En la tabla 4.10 se puede observar que en la población control el porcentaje de marcadores polimórficos que presentaron polimorfismo originado exclusivamente en diferencias de estado metilación fue del 8,8 % lo que corresponde a un 34,4 % del total de marcadores polimórficos. En las plantas regeneradas, no se observaron valores significativamente distintos para los marcadores polimórficos por metilación y que correspondieron al 25,2 %, 42,8 %, 39,4 % y 32,4 % del total de marcadores polimórficos detectados en las líneas R1, R3, T2 y T4, respectivamente.

**Tabla 4.11.** Resumen de los marcadores metAFLP detectados con los grupos de cebadores CCGN (arriba) y CCWG (abajo) en arroz.

| | Marca-dores | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletone* |
| Pob. | 440 | 304 (69,1) | 23 (5,2) | 3 (0,7 ) | 110 (25,0) | 35 (8,0) | 40 (9,1) |
| control | 276 | 197 (71,4) | 3 (1,1)** | 3 (1,1) | 73 (26,4) | 28(10,1) | 47(17,0)** |
| Línea | 441 | 242(54,9) | 33 (7,5) | 4 (0,9) | 162 (36,7) | 29 (6,6) | 73 (16,6) |
| R1 | 274 | 188 (68,6)** | 2(0,7)** | 0 (0,0) | 84 (30,7) | 33 (12,0)* | 51 (18,6) |
| Línea | 440 | 258(58,6) | 38 (8,6) | 5 (1,1) | 139 (31,6) | 60 (13,6) | 60 (13,6) |
| R3 | 273 | 199 (72,9)** | 9(3,3)** | 3 (1,1) | 62 (22,7)* | 27(9,9) | 42 (15,4) |
| Línea | 438 | 293 (66,9) | 37 (8,4) | 7 (1,6) | 101(23,1) | 29(6,6) | 38(8,7) |
| T2 | 270 | 189 (70,0) | 8 (3,0)** | 4 (1,5) | 69 (25,6) | 40 (14,8)** | 50 (18,5)** |
| Línea | 444 | 275 (61,9) | 39 (8,8) | 5 (1,1) | 125 (28,2) | 29 (6,5) | 41 (9,2) |
| T4 | 271 | 206 (76,0)** | 10 (3,7)** | 7 (2,6) | 48 (17,7)** | 30 (11,1)* | 24 (8,9) |
| Líneas agrupadas | 458 | 210 (45,9) | 21 (4,6) | 2 (0,4) | 225 (49,1) | 28 (6,1) | 69 (15,1) |
| | 280 | 150 (53.6)* | 2 (0,7)** | 0 (0,0) | 128 (45,7) | 46 (16,4)** | 34 (12,1) |

Diferencias significativas en las proporciones (test-*Z*): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; porcentajes entre paréntesis.

En la tabla 4.11 se presentan los datos de polimorfismo distribuidos en los grupos de cebadores CCGN y CCWG, que detectan distintos contextos de metilación. Cuando se compararon los valores en la población control no se encontraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de marcadores polimórficos detectados en estos dos grupos, ni tampoco en las líneas celulares R1 y T2. Sin embargo en las líneas celulares R3 y T4 se encontraron diferencias significativas observándose mayor polimorfismo en el grupo CCGN.

Empleando el total de marcadores detectados, se obtuvo el índice de identidad para marcadores de tipo MSAP (IRM) considerando todas las parejas de plantas analizadas, el cual osciló entre 0,722 y 0,931 con un valor medio de 0,838 comparando parejas de plantas de la población y de 0,826, 0,843, 0,869, y 0,856 dentro de las líneas celulares R1, R3, T2 y T4, respectivamente. Las relaciones de identidad entre el total de las 28 plantas analizadas se presentan gráficamente mediante un dendrograma, en la figura 4.7, donde se puede apreciar que las plantas de la población original quedan agrupadas, pero no así las plantas obtenidas de cada una de las líneas celulares.

Para analizar los distintos tipos variación detectados al comparar las plantas regeneradas obtenidas de una misma línea celular, se consideró como estado de partida original de cada marcador metAFLP a aquel que presentaba el mayor número de plantas regeneradas de la misma línea. En el caso de empate entre dos códigos para un marcador, se tomó el tipo 11 (desmetilado) como estado inicial dado que es el más frecuente y que no se presentaron igualdades en las que no participara el tipo 11.

En la tabla 4.12 se puede observar que la frecuencia de marcadores polimórficos epigenéticos detectados en las plantas regeneradas para cada línea celular, reveló una variación que va desde 1,9 a 14,8 % con unos valores medios del 8,2 %, 6,5 %, 5,3 % y 6,6 % en las líneas R1, R3, T2 y T4 respectivamente y un valor medio total del 6,7 %. Por su parte las variaciones observadas en una sola planta (“*singletones*”) para cada línea celular mostraron valores que oscilan de 5,3 a 55,2 % en los marcadores polimórficos detectados con unos valores medios del 27,1 %, 34,1 %, 34,2 % y 25,4% en las líneas R1, R3, T2 y T4 respectivamente y una media total del 30,1 %. Por lo tanto en todas las líneas celulares, las plantas comparten una gran proporción de las variaciones observadas.

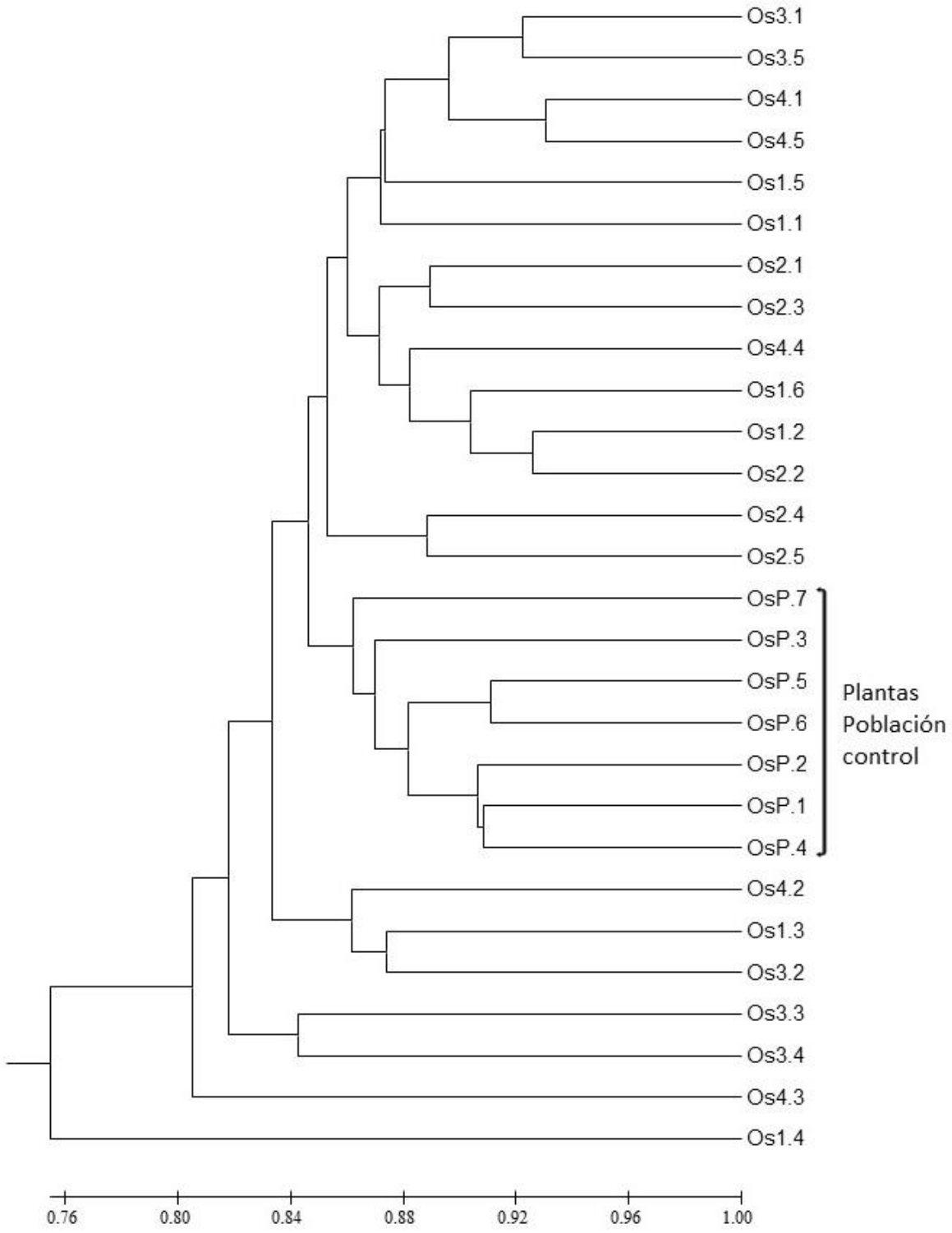


**Figura 4.7.** Fenograma obtenido usando el índice de identidad IRM y agrupamiento por el método UPGMA para arroz.

**Tabla 4.12.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular en arroz.

| Línea celular | Planta | Marcadores detectados | Tipo de variación [a] | | | | | | Total (%) | *Single-tone* [b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 01(11) | 10(11) | 11(01) | 11(10) | 10(01) | 01(10) | | |
| R1 | Os1.1 | 700 | 12 | 12 | 20 | 4 | 5 | 0 | 53 (7,6) | 8 (15,1) |
| | Os1.2 | 684 | 11 | 22 | 1 | 0 | 1 | 0 | 35 (5,1) | 4 (11,4) |
| | Os1.3 | 687 | 53 | 2 | 5 | 1 | 0 | 4 | 65 (9,5) | 16 (24,6) |
| | Os1.4 | 647 | 28 | 52 | 11 | 4 | 0 | 1 | 96 (14,8) | 53 (55,2) |
| | Os1.5 | 697 | 6 | 25 | 3 | 2 | 2 | 0 | 38 (5,5) | 18 (47,4) |
| | Os1.6 | 690 | 3 | 22 | 15 | 1 | 4 | 0 | 45 (6,5) | 4 (8,9) |
| R3 | Os3.1 | 689 | 8 | 7 | 7 | 0 | 1 | 0 | 23(3,3) | 8 (34,8) |
| | Os3.2 | 688 | 67 | 0 | 0 | 3 | 0 | 3 | 73 (10,6) | 16 (21,9) |
| | Os3.3 | 670 | 31 | 11 | 0 | 3 | 0 | 0 | 45 (6,7) | 17 (37,8) |
| | Os3.4 | 653 | 28 | 12 | 1 | 4 | 0 | 0 | 45 (6,9) | 21 (46,7) |
| | Os3.5 | 696 | 4 | 8 | 18 | 3 | 0 | 1 | 34 (4,9) | 10 (29,4) |
| T2 | Os2.1 | 668 | 26 | 15 | 1 | 2 | 2 | 0 | 46 (6,9) | 22 (47,8) |
| | Os2.2 | 680 | 13 | 11 | 5 | 0 | 8 | 0 | 37 (5,4) | 11 (29,7) |
| | Os2.3 | 681 | 8 | 2 | 7 | 1 | 1 | 0 | 19 (2,8) | 1 (5,3) |
| | Os2.4 | 692 | 28 | 1 | 11 | 0 | 1 | 0 | 41 (5,9) | 21 (51,2) |
| | Os2.5 | 690 | 18 | 13 | 5 | 1 | 1 | 0 | 38 (5,5) | 14 (36,8) |
| T4 | Os4.1 | 704 | 10 | 8 | 5 | 1 | 0 | 0 | 24 (3,4) | 9 (37,5) |
| | Os4.2 | 696 | 59 | 0 | 9 | 2 | 0 | 0 | 70 (10,1) | 8 (11,4) |
| | Os4.3 | 660 | 40 | 21 | 4 | 0 | 2 | 1 | 68 (10,3) | 20 (29,4) |
| | Os4.4 | 685 | 4 | 40 | 0 | 0 | 5 | 1 | 50 (7,3) | 9 (18,0) |
| | Os4.5 | 699 | 1 | 2 | 9 | 0 | 1 | 0 | 13 (1,9) | 4 (30,8) |

[a] Código presente en cada planta y código presente más frecuente (entre paréntesis) para cada línea celular
[b] Variaciones observadas únicamente en la planta correspondiente; el porcentaje respecto a los marcadores polimórficos en dicha planta aparece entre paréntesis

Considerando los datos de las cuatro líneas celulares, se han detectado todos los posibles tipos de variación (Tabla 4.12), siendo el más frecuente en tres de las líneas el denominado 01(11) que implica un estado de metilación que impide el corte por *Acc65*I mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea celular muestran un estado no metilado, lo que se atribuye a un proceso de metilación en la diana. En 13 de las 21 plantas se observó un mayor número de cambios de este tipo. Los cambios 10(11) fueron los segundos en frecuencia, siendo los más abundantes en cinco plantas, y en los que la ausencia del marcador en la digestión con *Kpn*I puede atribuirse a un proceso de metilación de la citosina interna (siempre que dicha metilación no afecte a *Acc65*I, lo que se desconoce) pero también a que aparezcan situaciones en las que existan dos puntos de corte en el rango de tamaños analizados y que la citosina externa se encuentren en distinto estado de metilación en la

citosina externa (Figura 4.4). Los cambios de tipo 11(01) fueron los terceros en frecuencia total pero siendo los más abundantes y con bastante diferencia en tres plantas distribuidas en distintas líneas celulares; este tipo implica un estado no metilado mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea presentan un estado de metilación que impide el corte por *Acc65*I, es decir un proceso de pérdida de metilación en la diana.

Por tanto, a nivel global se ha observado un mayor número de procesos de metilación respecto a los de pérdida de metilación, sin embargo es de destacar que el segundo tipo de cambio más frecuente no puede ser atribuido con precisión, de momento, a ninguno de los dos procesos dada la falta de información sobre la actividad de *Acc65*I en los posibles estados de metilación de la citosina interna del motivo 5´-GGTACC-3' y que se han encontrado en distintas líneas celulares plantas con una mayor frecuencia de pérdidas de metilación.

Empleando la metodología descrita por Bednarek y col., (2007) y por Machczynska y col. (2014b), se han obtenido los códigos binarios de cuatro dígitos necesarios para el análisis de todos los marcadores y plantas regeneradas, reemplazando el código que correspondería a la planta donadora por el código presente con mayor frecuencia en la línea celular correspondiente, tal y como se indicó anteriormente. En la tabla 4.13 se presentan las frecuencias absolutas correspondientes a los 16 códigos posibles para cada una de las plantas regeneradas de las dos líneas celulares, los cuales indican, en este orden, la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Acc65*I seguido de la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Kpn*I.

A partir de los datos de la tabla 4.13 y aplicando las fórmulas y coeficientes de corrección propuestos por Machczynska y col. (2014b) se han calculado distintos parámetros (Tabla 4.14) que describen las características de la variación presente en las plantas regeneradas en cada línea celular, distinguiendo entre la variación correspondiente a cambios en la secuencia de nucleótidos y a procesos tanto de pérdida como de ganancia de metilación, así como una estimación del estado de metilación a nivel global del genoma.

**Tabla 4.13.** Frecuencias absolutas de patrones metAFLP conservados y variables entre las plantas regeneradas obtenidas en cada línea celular de arroz, según los códigos binarios de cuatro dígitos propuestos por Bednarek y col. (2007).

| Línea celular | Planta | Códigos de patrones metAFLP | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Conservados | | | Correspondientes a variación | | | | | | | | | | | |
| | | 1111 | 0011 | 1100 | 0001 | 0111 | 0101 | 0100 | 1011 | 1010 | 1001 | 1000 | 1110 | 1101 | 0010 | 0110 |
| R1J | Os1.1 | 567 | 53 | 10 | 6 | 20 | 6 | 5 | 12 | 0 | 0 | 2 | 12 | 4 | 1 | 5 |
| | Os1.2 | 556 | 73 | 15 | 2 | 1 | 0 | 3 | 11 | 2 | 0 | 1 | 22 | 0 | 4 | 1 |
| | Os1.3 | 535 | 72 | 10 | 4 | 5 | 0 | 1 | 53 | 1 | 4 | 1 | 2 | 1 | 2 | 0 |
| | Os1.4 | 494 | 47 | 7 | 2 | 11 | 1 | 0 | 28 | 17 | 1 | 4 | 52 | 4 | 21 | 0 |
| | Os1.5 | 560 | 71 | 14 | 5 | 3 | 1 | 8 | 6 | 0 | 0 | 0 | 25 | 2 | 3 | 2 |
| | Os1.6 | 562 | 60 | 15 | 1 | 15 | 1 | 6 | 3 | 4 | 0 | 0 | 22 | 1 | 0 | 4 |
| R3A | Os3.1 | 567 | 69 | 21 | 1 | 7 | 1 | 7 | 8 | 1 | 0 | 1 | 7 | 0 | 4 | 1 |
| | Os3.2 | 516 | 80 | 13 | 5 | 0 | 0 | 1 | 67 | 0 | 3 | 3 | 0 | 3 | 1 | 0 |
| | Os3.3 | 524 | 72 | 18 | 4 | 0 | 0 | 7 | 31 | 17 | 0 | 1 | 11 | 3 | 9 | 0 |
| | Os3.4 | 518 | 69 | 17 | 4 | 1 | 0 | 0 | 28 | 25 | 0 | 1 | 12 | 4 | 11 | 0 |
| | Os3.5 | 571 | 63 | 18 | 2 | 18 | 5 | 3 | 4 | 0 | 1 | 0 | 8 | 3 | 0 | 0 |
| T2 | Os2.1 | 537 | 63 | 18 | 2 | 1 | 1 | 1 | 26 | 6 | 0 | 0 | 15 | 2 | 16 | 2 |
| | Os2.2 | 555 | 62 | 19 | 1 | 5 | 0 | 6 | 13 | 5 | 0 | 1 | 11 | 0 | 7 | 8 |
| | Os2.3 | 572 | 68 | 17 | 1 | 7 | 0 | 4 | 8 | 2 | 0 | 2 | 2 | 1 | 6 | 1 |
| | Os2.4 | 554 | 68 | 17 | 7 | 11 | 4 | 1 | 28 | 1 | 0 | 3 | 1 | 0 | 2 | 1 |
| | Os2.5 | 553 | 73 | 15 | 9 | 5 | 0 | 2 | 18 | 0 | 0 | 4 | 13 | 1 | 3 | 1 |
| T4 | Os4.1 | 580 | 72 | 19 | 3 | 5 | 0 | 6 | 10 | 0 | 0 | 0 | 8 | 1 | 0 | 0 |
| | Os4.2 | 538 | 67 | 15 | 3 | 9 | 0 | 3 | 59 | 1 | 0 | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| | Os4.3 | 508 | 62 | 15 | 2 | 4 | 1 | 4 | 40 | 29 | 1 | 4 | 21 | 0 | 9 | 2 |
| | Os4.4 | 548 | 66 | 19 | 1 | 0 | 0 | 1 | 4 | 6 | 1 | 0 | 40 | 0 | 6 | 5 |
| | Os4.5 | 594 | 66 | 19 | 4 | 9 | 0 | 3 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 1 | 1 |

**Tabla 4.14.** Porcentaje medio de cambios inducidos durante el cultivo *in vitro* y estado de metilación en las plantas regeneradas en cada una de las líneas celulares de arroz.

| Características metAFLP | Línea R1J | Línea R3A | Línea T2 | Línea T4 | Promedio |
|---|---|---|---|---|---|
| Variación de secuencia | 5,65± 3,65 | 3,98± 2,39 | 3,62± 1,53 | 4,14± 3,52 | 4,35± 0,77 |
| Desmetilación | 1,53± 1,13 | 0,74± 0,95 | 1,15± 0,51 | 0,95± 0,29 | 1,09± 0,29 |
| Metilación de *novo* | 2,69± 2,55 | 3,87± 3,18 | 2,55± 1,04 | 3,16± 3,11 | 3,07± 0,51 |
| Variación compleja | 0,71± 0,28 | 0,65± 0,38 | 0,66± 0,29 | 0,68± 0,32 | 0,67± 0,02 |
| Variación de secuencia corregida | 6,05± 3,69 | 4,28± 2,41 | 3,95± 1,50 | 4,48± 3,61 | 4,69± 0,81 |
| Desmetilación corregida | 1,64± 1,25 | 0,79± 1,04 | 1,26± 0,57 | 1,03± 0,35 | 1,18± 0,31 |
| Metilación de *novo* corregida | 2,88± 2,59 | 4,16± 3,30 | 2,78± 1,03 | 3,42± 3,34 | 3,31± 0,55 |
| Variación total inducida por cultivo de tejidos | 10,57± 4,27 | 9,24± 2,89 | 7,99± 1,76 | 8,93± 4,73 | 9,18± 0,92 |
| Sitios afectados por cambio en metilación | 4,52± 2,44 | 4,96± 2,62 | 4,04± 1,05 | 4,45± 3,39 | 4,49± 0,33 |
| Sitios no afectados por el cultivo de tejidos | 89,43± 4,27 | 90,76± 2,89 | 92,01± 1,76 | 91,07± 4,73 | 90,82± 0,92 |
| Metilación heredada | 10,18± 1,67 | 11,99± 0,58 | 11,53± 0,42 | 11,43± 0,61 | 11,28± 0,67 |
| Estado no metilado heredado | 76,47± 3,44 | 76,19± 3,38 | 78,53± 1,55 | 77,77± 4,31 | 77,24± 0,96 |
| Genoma metilado | 14,16± 2,98 | 17,09± 3,82 | 15,02± 1,16 | 15,63± 2,97 | 15,48± 10,7 |
| Genoma no metilado | 85,84± 2,98 | 82,91± 3,82 | 84,98± 1,16 | 84,37± 2,97 | 84,52± 1,07 |

(± corresponde al error estándar)

Al igual que en los resultados para *Arabidopsis*, los valores correspondientes a la variación de secuencia, desmetilación, metilación de *novo* y variación compleja descritas en la tabla 4.14 corresponden a la interpretación inicial de Bednarek y col., (2007) y los valores que se indican como corregidos son los obtenidos después de aplicar el método extendido de Machczynska y col. (2014b) que permite asignar específicamente a la variación de secuencia, desmetilación y metilación de *novo*, cada uno de los procesos englobados inicialmente dentro de la "variación compleja".

Para todas las características cuantitativas descritas en la tabla 4.14 se han obtenido valores muy próximos en las distintas líneas celulares, no existiendo diferencias significativas entre ellos (test-Z; $p < 0.01$), de tal forma que el porcentaje medio de motivos 5´-GGTACC-3' afectados por el cultivo de tejidos en las plantas analizadas de arroz fue del 9,18 %, correspondiendo un 4,69 % a cambios en su secuencia nucleotídica y un valor casi idéntico, del 4,49 %, a modificaciones en el estado de metilación. Este valor medio global del 4,49 % es próximo al 6,7 % calculado anteriormente empleando únicamente los datos de los seis tipos de variación originados exclusivamente por cambios de metilación (Tabla 4.12); también los valores obtenidos para cada línea celular (4,52 %, 4,96 %, 4,04 % y 4,45 % en las líneas R1J, R3A, T2 y T4, respectivamente) son próximos a los calculados a partir de los datos de la tabla 4.12 (5,1 %, 4,9 %, 5,4 % y 3,0 % en las líneas R1J, R3A, T2 y T4, respectivamente).

En todas las líneas celulares se observa un porcentaje más elevado de procesos de metilación de *novo* frente a los procesos de desmetilación, con unos valores medios del 3,31 % y del 1,18 %. El porcentaje medio de sitios de restricción metilados que mantuvieron su estado fue del 11,28 % mientras que el de sitios que mantuvieron su estado no metilado fue del 77,24 %. La cuantificación del porcentaje de sitios metilados presentes en las plantas regeneradas, empleando esta metodología, implica que su genoma presentaría una tasa de metilación del 15.48 %. Este valor es próximo al valor de 14,2 % calculado anteriormente empleando la frecuencia de los marcadores de distinto tipo obtenidos únicamente con *Kpn*I en cada planta y ambos valores muy superiores al calculado para las plantas de la población control, del 9,9 %.

### 4.3 Detección de marcadores moleculares metAFLP en *Secale cereale* L. cv. Ailés

A partir del análisis de un total de 24 plantas de centeno (*Secale cereale* L. cv. Ailés), se han obtenido marcadores metAFLP mediante el empleo de los isoesquizómeros *Acc*65I y *Kpn*I, como se mencionó anteriormente, dado que estas endonucleasas presentan un comportamiento diferente según el estado de metilación de las citosinas en cada una de las dos cadenas del ADN de su secuencia diana 5´-GGTACC-3'. Las plantas analizadas correspondían a doce individuos de la población control y doce plantas regeneradas a partir de dos líneas celulares independientes, seis plantas de la línea K(1A1C) y seis plantas de la línea M(7A1). No se utilizaron líneas celulares transformadas ya que es una especie recalcitrante a la transformación genética.

Para cada una de estas 24 plantas, se han obtenido doce electroferogramas al usar seis combinaciones de cebadores selectivos con cada una de las dos reacciones de digestión realizadas independientemente con *Acc*65I y *Kpn*I. El análisis de estos 288 electroferogramas totales permitió obtener un total de 1191 marcadores metAFLP (Tabla 4.15). El análisis de dicho número de marcadores implicó la realización de una matriz global de presencia-ausencia de 57.168 datos, al considerar la situación de cada uno de los marcadores en cada planta y reacción de digestión.

**Tabla 4.15.** Marcadores metAFLP detectados con cada combinación de cebadores selectivos en centeno.

| Combinación de cebadores | Marcadores totales n= 24 | P. control n= 12 | Línea K (1A1C) n= 6 | Línea M (7A1) n= 6 | Líneas agrupadas n= 12 |
|---|---|---|---|---|---|
| P1 [a] | 186 | 183 | 111 | 105 | 119 |
| P2 [a] | 202 | 195 | 118 | 101 | 158 |
| P3 [a] | 229 | 225 | 130 | 124 | 149 |
| P4 [a] | 219 | 210 | 130 | 123 | 149 |
| P5 [b] | 189 | 186 | 131 | 126 | 138 |
| P6 [b] | 166 | 165 | 121 | 120 | 126 |
| TOTAL | 1191 | 1164 | 741 | 699 | 839 |

[a] cebador del grupo CCGN; [b] cebador del grupo CCWG

El número de marcadores distintos detectados ha sido de 1164 para la población control, que corresponden al 97,7 % del total de marcadores, mientras que fue claramente inferior y de 741 y 699 en las plantas regeneradas de las líneas celulares K y M, respectivamente (Tabla 4.15); cuando se agrupan las 12 plantas analizadas de las dos líneas celulares, el número de marcadores distintos detectados fue de 839, el 70,4 % del total. Este mayor número de marcadores distintos detectados en la población control puede deberse tanto a la presencia de un mayor polimorfismo de marcadores metAFLP entre los individuos de la población control respecto al que presentan las plantas clónicas obtenidas de las líneas celulares como a la existencia de un mayor número de motivos que pueden ser cortados por las endonucleasas empleadas a nivel individual.

Siguiendo el mismo método indicado en las especies anteriores, los marcadores metAFLP detectados fueron clasificados en cada planta analizada con un código de dos dígitos de acuerdo a su patrón de presencia-ausencia en las dos dobles digestiones. Aquellos que aparecen en ambas reacciones se les denominó marcadores 11, a los que aparecen únicamente en la reacción con *Acc*65I se les catalogó como 10 y a los presentes exclusivamente en la reacción con *Kpn*I se les nombró como 01. Se asignó el código 00 a los marcadores ausentes en las dos reacciones de alguna de las plantas comparadas, cuando se realizaron los análisis de variabilidad.

El número total de marcadores metAFLP detectado en cada una de las plantas se representa gráficamente en la figura 4.8 y es proporcional al número de sitos diana que pueden ser cortados indistintamente por *Acc*65I y *Kpn*I. Teniendo en cuenta el código binario de dos dígitos (primer dígito para *Acc*65I y segundo dígito para *Kpn*I), la suma de marcadores de tipo 11 y 01 corresponde a los cortes por *Kpn*I y la suma de tipos 11 y 10 a los cortes por *Acc*65I. En todas las plantas el número de fragmentos generados por *Kpn*I ha sido superior al de *Acc*65I, debido a la presencia de distintos estados de metilación de la secuencia diana que afectan principalmente, según los datos disponibles actualmente, a la actividad de *Acc*65I.

En la población control, el número total de marcadores por planta ha oscilado entre 774 y 853, que representan del 66,5 % al 73,3 % del total de marcadores detectado en dicha población, con un valor medio de 820,6. Por su parte, en cada una de las líneas celulares el número fue inferior y ha variado entre 663 y 673 (media de 669,8) en la línea 1A1C y entre 600 y 634 (media de 622,3) en la línea 7A1, que representan, los siguientes porcentajes del total de marcadores detectado en cada una de dichas líneas: del 89,5 % al 90,8 % en 1A1C y del 85,8 % al 90,7 % en 7A1. Considerando a todas las 12 plantas regeneradas como un único grupo, el número medio de marcadores por planta fue de 646,1. Las diferencias de los valores medios obtenidos para la población control y cada una de las dos líneas celulares o su agrupamiento fueron muy significativas (*t* de Student; $p<0,0001$).

Cuando se consideran únicamente los marcadores generados por la endonucleasa *Kpn*I (tipo 11 + tipo 01), a la que no le afecta la metilación en la citosina en posición 3', también se observa (Figura 4.8) un valor medio significativamente más elevado en la población control respecto al agrupamiento de las plantas regeneradas y a los valores medios obtenidos en cada línea celular (*t* de Student; $p<0,0001$). Por lo tanto, las plantas regeneradas presentan un menor número de secuencias diana 5´-GGTACC-3' que puedan ser cortadas por *Kpn*I que las

plantas de la población de la que proceden. Este menor número puede atribuirse tanto a pérdidas de secuencia diana por cambios nucleotídicos como a una mayor presencia de citosinas internas metiladas en la secuencia diana.

Cuando se analizan los marcadores generados por la endonucleasa *Acc65*I (tipo 11 + tipo 10), también se observa un valor medio significativamente más elevado en la población control respecto al agrupamientos de las plantas regeneradas y a los valores medios obtenidos en cada línea celular (*t* de Student; $p<0,0001$).

Al comparar independientemente cada uno de los tres tipos de marcadores se observó que los tipo 11 son los de mayor presencia en todas las plantas, seguidos por los de tipo 01 y finalmente por los de tipo 10 (Figura 4.8). Respecto al número medio de marcadores de tipo 11, que corresponden a secuencias diana no metiladas, la población control no mostró diferencias significativas con el agrupamiento de las líneas ni con la línea 1A1C, aunque sí con la línea 7A1 dado que esta última línea también presentó valores significativamente más bajos que 1A1C (*t* de Student; $p<0,0001$).

En cuanto al número medio de marcadores de tipo 01, que se corresponden con secuencias diana metiladas en la citosina externa, estos fueron significativamente superiores en la población control respecto a los valores obtenidos en las líneas celulares regeneradas y su agrupamiento (*t* de Student; $p<0,0001$), no observándose diferencias significativas respecto al número medio por planta de este tipo de marcadores entre las dos líneas celulares regeneradas.

Por último, los valores medios de marcadores tipo 10, los de menor abundancia y que no pueden atribuirse a un estado específico de metilación, fueron significativamente superiores en la población control respecto a cada una de las líneas celulares así como también con su agrupamiento (*t* de Student; $p<0,0001$), sin embargo no se observaron diferencias significativas entre la línea celular 1A1C y la línea celular 7A1.

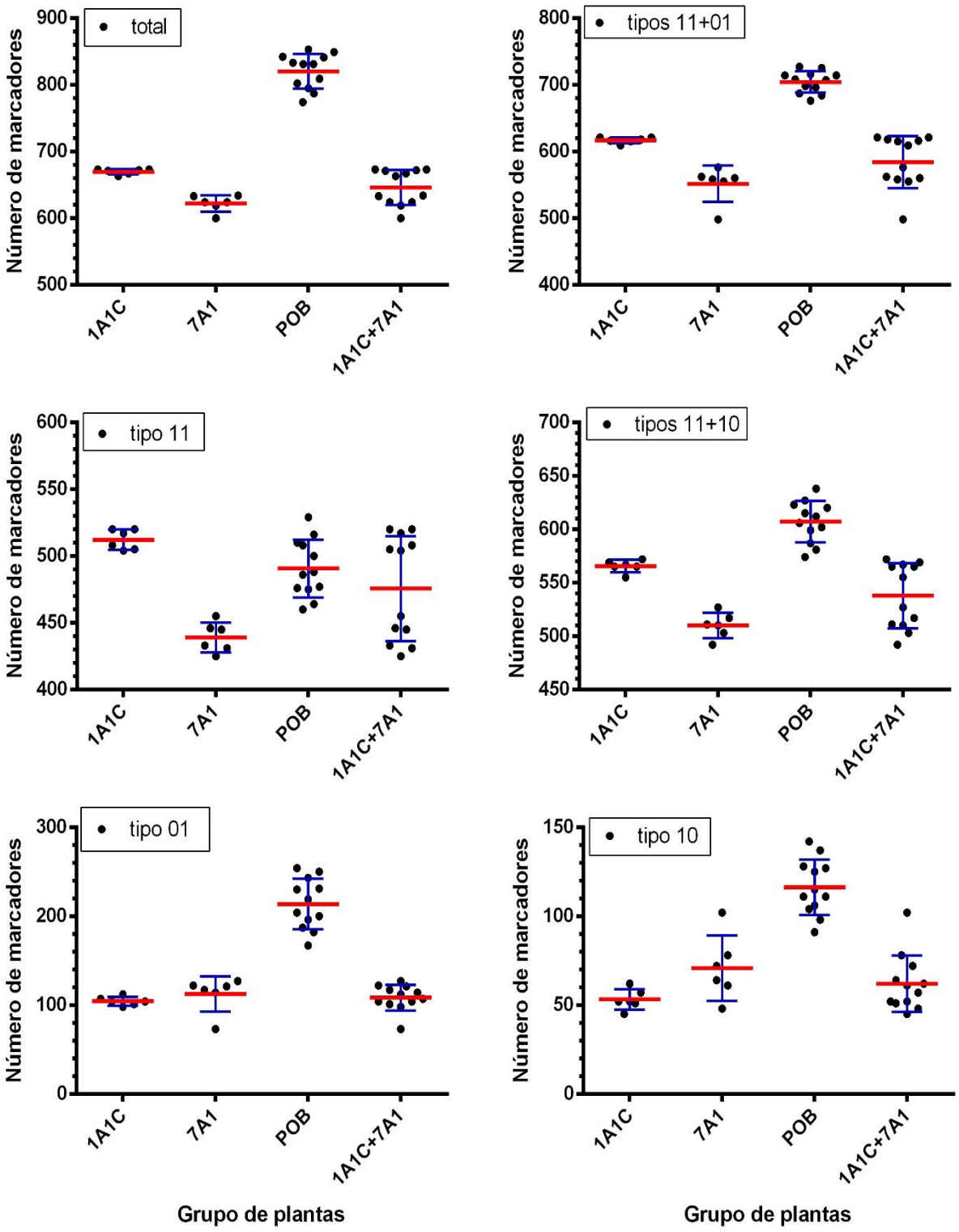


**Figura 4.8.** Número de marcadores metAFLP detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en centeno; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Como ya se mencionó anteriormente, los marcadores metAFLP pueden separarse en dos grupos teniendo en cuenta el contexto de metilación que pueden detectar cada uno de los cebadores selectivos. Así, el grupo CCGN está formado por los cebadores P1, P2, P3 y P4 que permiten detectar cambios en los patrones por metilación de la citosina externa en el contexto CG y metilación de la citosina interna en el contexto CHG y el grupo CCWG incluye a los cebadores P5 y P6 que permiten detectar la metilación de la citosina externa en el contexto CHG y la metilación de la citosina interna en el contexto CHH.

Cuando se analizaron de forma separada los marcadores obtenidos con cada uno de los grupos de cebadores en cada una de las plantas (Figura 4.9), se observaron resultados similares a los descritos antes para el global de marcadores en cada uno de los grupos de cebadores. Así, fueron significativamente mayores los valores obtenidos en la población respecto a los valores obtenidos en las líneas y los agrupamiento de las plantas regeneradas, tanto para el número de marcadores total, marcadores de los tipos 11+01 y de tipo 10, con los dos grupos de cebadores (*t* de Student; $p<0,0001$).

Por su parte, el número de marcadores 01 también fue significativamente mayor en la población que en el agrupamiento de plantas regeneradas para los grupos CCNG y CCWG (*t* de Student; $p<0,0001$). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre la población control y la línea celular 1A1C respecto al número medio de marcadores del tipo 11 en los dos contextos de metilación CCNG y CCWG, tampoco entre la población control y la línea celular 7A1 en el contexto CCWG. Cuando se hizo la comparación entre las líneas celulares regeneradas se observaron diferencias significativas (*t* de Student; $p<0,0001$) para los marcadores de tipo 11 en ambos contextos de metilación, pero no en los marcadores de tipo 10 y de tipo 01, tanto para el contexto CCNG como para el contexto CCWG. Por lo tanto, los marcadores obtenidos con los dos grupos de cebadores revelaron un mayor número total, de marcadores correspondientes a sitios cortados por *Kpn*I y de tipo 01 (correspondientes a sitios metilados) en las plantas de la población que en las plantas regeneradas.

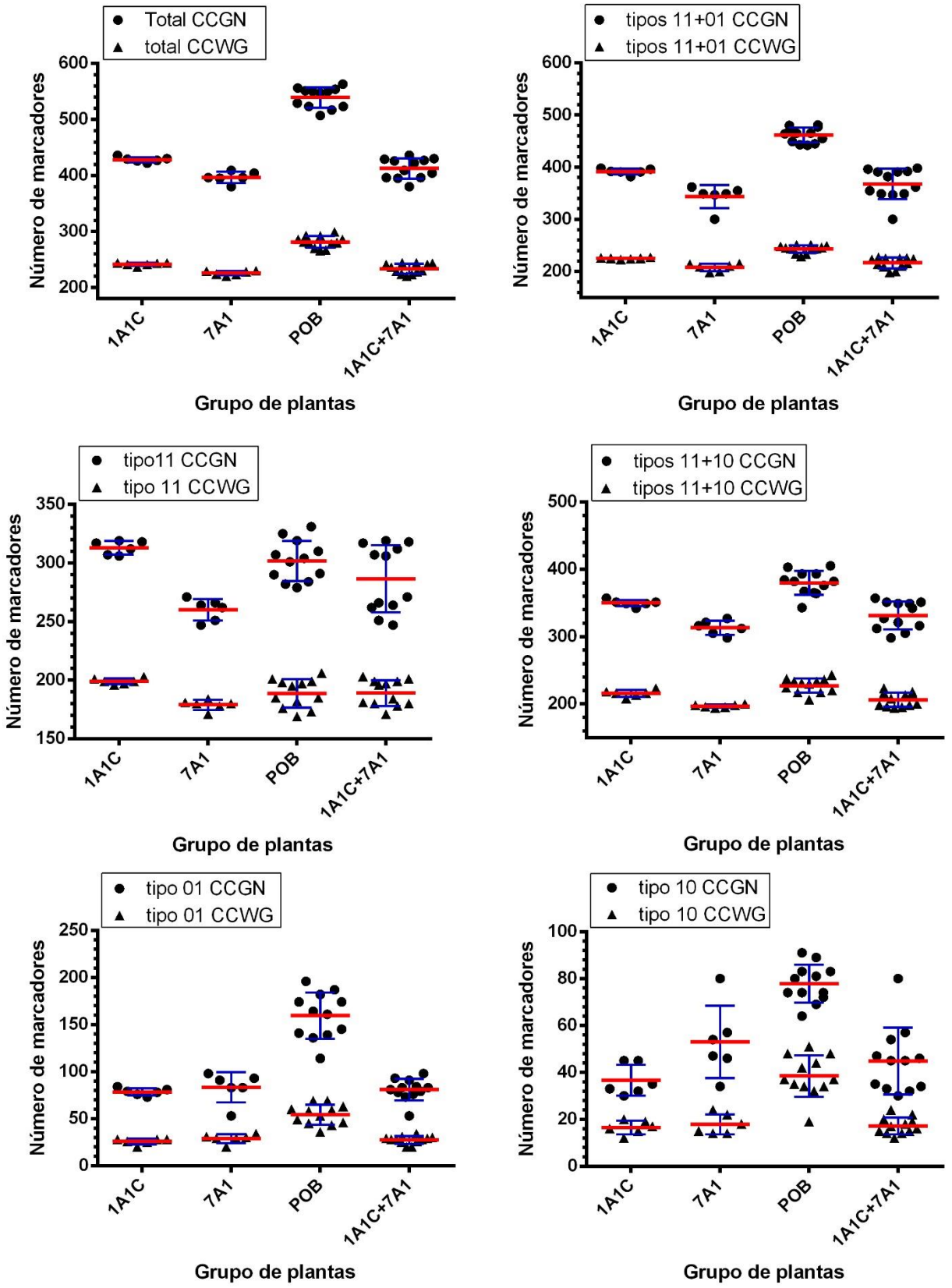


**Figura 4.9.** Número de marcadores metAFLP, totales y de distintos tipos, detectados en cada planta y grupo analizado en centeno con los grupos de cebadores CCGN y CCWG; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Cuando se compara la proporción media con la que aparecen los distintos tipos de marcadores (Tabla 4.16) se observaron diferencias significativas en la frecuencia relativa de los códigos 11, 10 y 01, entre las plantas de la población control y las plantas de las líneas celulares regeneradas o su agrupamiento (Test *Z*; $p<0.01$). Los marcadores tipo 11, que corresponden a secuencias diana no metiladas, fueron significativamente más frecuentes entre los marcadores detectados en las plantas regeneradas, mientras que los de tipo 01, que son proporcionales al número de sitos que presentan metilación, fueron significativamente más abundantes en la población control. Para los de tipo 10 no se observaron diferencias significativas al comparar la población con las líneas agrupadas o la línea 7A1, pero si con la línea 1A1C (Test *Z*; $p<0.01$).

**Tabla 4.16.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas de centeno.

| | Pobl. control | Línea K( 1A1C) | Línea M (7A1) | Líneas agrupadas |
|---|---|---|---|---|
| código 11 | 59,9 ± 3,6 | 76,5 ± 1,1 | 70,6 ± 1,4 | 73,5± 3,2 |
| código 10 | 14,1 ± 1,5 | 7,9 ± 0,8 | 11,4 ± 2,9 | 9,7 ± 2,7 |
| código 01 | 26,0 ± 2,8 | 18,0 ± 0,7 | 18,0 ± 2,7 | 16,8± 2,3 |

(± corresponde a la desviación típica)

Si para el cálculo se tienen en cuenta únicamente a los marcadores obtenidos con *Kpn*I en cada planta (11+01), evitando los problemas de interpretación de los patrones generados por *Acc65*I, en las plantas de la población los códigos 01 han oscilado entre el 24,0 % al 35,6 %, con un valor medio del 30,3 %, mientras que en las plantas regeneradas de las líneas celulares los valores han sido entre el 17,3 % y el 20,2 % con valor medio de 18,5 % para la línea 1A1C y entre el 14,7 % y el 22,8 % con un valor medio de 20,3 % para la línea 7A1. Considerando las plantas regeneradas en conjunto, el valor medio de metilación de la citosina terminal sería del 18,6 % de los motivos 5´-GGTACC-3'.

### 4.3.1 Polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP en *Secale cereale* L. cv. Ailés

Atendiendo a la presencia de los códigos 11, 01, 10 y 00 en el grupo de plantas a considerar, cada uno de los distintos marcadores metAFLP detectados fue clasificado como monomórfico o polimórfico. Comparando las 24 plantas analizadas, se han mostrado como

monomórficos el 13,0 % de los 1191 marcadores totales detectados. Atendiendo a cada uno de los grupos, se han mostrado como monomórficos el 19,1 % (223) de los marcadores en la población control, mientras que en las líneas de plantas regeneradas lo han sido el 71,2 % (527) para K y el 64,4% (450) para M. Comparando los valores obtenidos en cada una de las líneas de plantas regeneradas (Tabla 4.17), no se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al número de marcadores monomórficos de tipo 01 y 10 pero si para los marcadores tipo 11 (Test *Z*; $p<0.01$). Por otro lado en las líneas celulares y su agrupamiento, los valores de polimorfismo son significativamente muy inferiores al obtenido en la población control (Test *Z*; $p<0.01$), observándose también diferencias significativas (Test *Z*; $p<0.01$) entre las dos líneas de plantas regeneradas aunque con valores no muy distantes.

**Tabla 4.17.** Polimorfismo de marcadores metAFLP en cada grupo de plantas de centeno.

| | Marcadores totales | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletones* |
| P. control | 1164 | 201 (17,3) | 18 (1,5) | 4 (0,3) | 941 (80,8) | 97 (8,3) | 122 (10,5) |
| Línea K (1A1C) | 741 | 452 (61,0) | 56 (7,6) | 19 (2,6) | 214 (28,9) | 62 (8,4) | 101 (13,6) |
| Línea M (7A1) | 699 | 377 (53,9) | 50 (7,2) | 23 (3,3) | 249 (35,6) | 45 (6,4) | 126 (18,0) |
| Líneas agrupadas | 839 | 321 (38,3) | 26 (3,1) | 3 (0,4) | 489 (58,3) | 57 (6,8) | 84 (10,0) |

(Porcentajes entre paréntesis)

Los polimorfismos denominados como "*singletones*" fueron el 13,0 % de los marcadores polimórficos detectados en la población control mientras que en las líneas celulares estos polimorfismos correspondían a prácticamente la mitad de los marcadores polimórficos (47,2 % y 50,6 %). Sin embargo, cuando se agrupan las plantas regeneradas de las dos líneas, los "*singletones*" representan solo el 17,2 % de los marcadores polimórficos, indicando la presencia de marcadores polimórficos comunes en los procesos de regeneración ocurridos en cada una de las líneas celulares.

En los marcadores variables se ha podido diferenciar entre marcadores cuyo polimorfismo se debe exclusivamente a diferencias en estado de metilación en la secuencia

5´-GGTACC-3' del resto de marcadores polimórficos, en los que también han podido ocurrir cambios a nivel de secuencia nucleotídica entre los individuos comparados. En la tabla 4.17 se puede observar que mientras en la población control el número de marcadores polimórficos representó el 80,8 %, sólo el 8,3 % de los marcadores presentaron polimorfismo originado exclusivamente en diferencias de estado metilación, lo que corresponde a un 10,3 % de los polimórficos.

En las plantas regeneradas, se observó un porcentaje de marcadores polimórficos significativamente inferior, como cabría esperar comparando plantas clónicas, con valores del 28,9 % y el 35,6 % en las líneas 1A1C y 7A1, respectivamente, y de marcadores polimórficos por metilación del 6,4 % y 8,4 % pero que correspondieron al 29,0 % y 18,1 % de los marcadores polimórficos. También se han encontrado diferencias significativas entre los valores obtenidos para las dos líneas celulares (Test *Z*; $p<0.01$). Al agrupar las plantas regeneradas de las dos líneas celulares, aumentó el porcentaje de marcadores polimórficos al 58,3 % que sigue siendo significativamente inferior al de la población control (Test *Z*; $p<0.01$), y de tal forma que el 11,7 % lo fue por cambios exclusivamente de metilación. Estos datos apuntan a que las diferencias a nivel de secuencia nucleotídica son el principal componente del polimorfismo detectado entre la población control, con baja incidencia de los patrones de metilación, mientras que en las plantas regeneradas los polimorfismos de metilación son un componente con más peso en la variación observada entre las plantas de la misma línea celular.

En la tabla 4.18 se presentan los datos de polimorfismo distribuidos en los grupos de cebadores CCGN y CCWG, que detectan distintos contextos de metilación. Se obtuvieron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de marcadores polimórficos detectados por estos dos grupos, presentando mayores niveles de polimorfismo los marcadores del grupo CCGN tanto para la población como para las líneas celulares, como consecuencia de una mayor frecuencia de los marcadores monomórficos de tipo 11 (dianas no metiladas) en el grupo CCWG. También se observó una mayor tasa de marcadores polimórficos en un único individuo ("*singletones*") en el grupo CCWG para la población control, mientras que en las líneas celulares 1A1C y 7A1 y su agrupamiento, fue significativamente menor en dicho grupo CCWG.

**Tabla 4.18.** Resumen de los marcadores metAFLP detectados con los grupos de cebadores CCGN (arriba) y CCWG (abajo) en centeno.

| | Marca-dores | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletone* |
| Pob. control (COL) | 813<br>351 | 117 (14,4)<br>84 (23,9)** | 14 (1,7)<br>4 (1,1) | 4 (0,5 )<br>0 (0,0) | 678 (83,4)<br>263 (74,9)** | 70 (8,6)<br>27 (7,7) | 80(9,8)<br>42 (12,0) |
| Línea K (1A1C) | 489<br>252 | 268 (54,8)<br>184 (73,0)** | 41 (8,4)<br>15 (6,0) | 13 (2,7)<br>6 (2,4) | 167 (34,2)<br>47(18,7)** | 41 (8,4)<br>21 (8,3) | 75 (15,3)<br>26 (10,3)* |
| Línea M (7A1) | 453<br>246 | 219 (48,3)<br>158 (64,2)** | 37 (8,2)<br>13 (5,3) | 19 (4,2)<br>4 (1,6) | 178 (39,3)<br>71 (28,9)** | 25 (5,5)<br>20(8,1) | 94 (20,8)<br>32 (13,0)* |
| Líneas agrupadas | 575<br>264 | 174 (30,3)<br>147 (55,7)** | 21 (3,7)<br>5 (1,9) | 3 (0,5)<br>0 (0,0) | 377 (65,6)<br>112 (42,4)** | 29 (5,0)<br>28 (10,6)** | 66 (11,5)<br>18(6,8)* |

Diferencias significativas en las proporciones (test-*Z*): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; porcentajes entre paréntesis.

Empleando el total de marcadores detectados, se obtuvo el índice de identidad IRM para marcadores de tipo MSAP considerando todas las parejas de plantas analizadas. Este índice osciló entre 0,295 y 0,919, con un valor medio de 0,469 comparando parejas de plantas de la población y de 0,858 y 0,824 para las líneas celulares 1A1 y 7A1, respectivamente. Las relaciones de identidad entre el total de las 24 plantas analizadas se presentan gráficamente mediante un dendrograma, en la Figura 4.10, en el que las plantas regeneradas quedan agrupadas de acuerdo a la línea celular de procedencia y separadas de las plantas de la población de origen.

Como ya se mencionó en las especies analizadas anteriormente, para el análisis de la variación mostrada por las plantas regeneradas obtenidas de una misma línea celular, se ha considerado como estado de partida de cada uno de los marcadores metAFLP a aquel que presentaron el mayor número de plantas. Cuando se obtuvo un empate entre dos códigos para un marcador se tomó el tipo 11 (desmetilado) como estado inicial dado que es el más frecuente y que, además, no se presentaron igualdades en las que no participara el tipo 11.

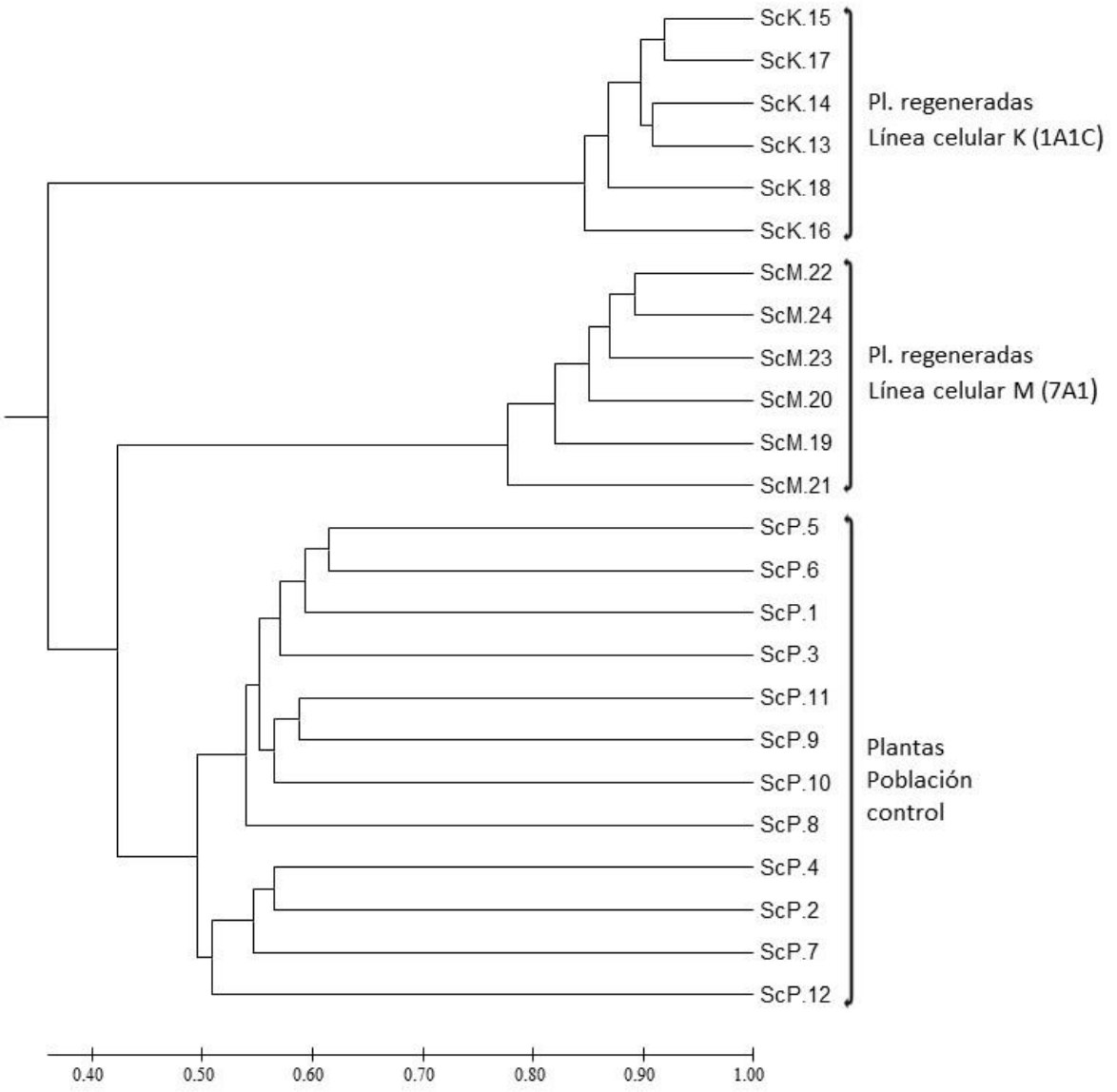


**Figura 4.10.** Fenograma obtenido usando el índice de identidad IRM y agrupamiento por el método UPGMA para centeno.

En la tabla 4.19 se puede observar que la frecuencia de marcadores polimórficos epigenéticos detectados en las plantas regeneradas para cada línea celular, osciló entre el 2,4 % y el 9,8 %, con unos valores medios de 4,4 % y 5,2 % en las líneas 1A1C y 7A1 respectivamente y un valor medio total de 4,8 %. Por su parte las variaciones observadas en una sola planta ("*singletone"*) para cada línea celular mostraron valores que oscilan del 5,3 % al 46,9 % en los marcadores polimórficos detectados, con unos valores medios del 19,0 % y 22,8% en las líneas 1A1C y 7A1 respectivamente, y una media total del 20,9 %. Por lo tanto en las dos líneas celulares, las plantas comparten gran parte de las variaciones observadas.

**Tabla 4.19.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular de centeno.

| Línea celular | Planta | Marcadores totales | Tipo de variación [a] | | | | | | Total (%) | *Singletones* [b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 01(11) | 10(11) | 11(01) | 11(10) | 10(01) | 01(10) | | |
| K (1A1C) | ScK.1 | 671 | 15 | 10 | 4 | 4 | 1 | 0 | 34 (5,1) | 5 (14,7) |
| | ScK.2 | 663 | 9 | 5 | 5 | 6 | 0 | 0 | 25 (3,8) | 3 (12,0) |
| | ScK.3 | 673 | 8 | 5 | 2 | 1 | 0 | 0 | 16 (2,4) | 2 (12,5) |
| | ScK.4 | 672 | 23 | 10 | 11 | 3 | 0 | 2 | 49 (7,3) | 23 (46,9) |
| | ScK.5 | 673 | 7 | 5 | 6 | 0 | 1 | 0 | 19 (2,8) | 1 (5,3) |
| | ScK.6 | 667 | 17 | 11 | 1 | 5 | 0 | 1 | 35 (5,2) | 8 (22,9) |
| M (7A1) | ScM.1 | 624 | 11 | 1 | 11 | 7 | 0 | 2 | 32 (5,1) | 10(31,3) |
| | ScM.2 | 634 | 12 | 3 | 7 | 4 | 1 | 0 | 27 (4,3) | 4 (14,8) |
| | ScM.3 | 600 | 4 | 32 | 14 | 2 | 7 | 0 | 59 (9,8) | 23 (39,0) |
| | ScM.4 | 624 | 8 | 1 | 3 | 2 | 0 | 1 | 15 (2,4) | 2 (13,3) |
| | ScM.5 | 619 | 9 | 10 | 3 | 3 | 1 | 0 | 26 (4,2) | 6 (23,1) |
| | ScM.6 | 633 | 12 | 11 | 5 | 4 | 1 | 0 | 33 (5,2) | 5 (15,2) |

[a] Código presente en cada planta y código presente más frecuente (entre paréntesis) para cada línea celular.
[b] Variaciones observadas únicamente en la planta correspondiente; el porcentaje respecto a los marcadores polimórficos en dicha planta aparece entre paréntesis.

Considerando los datos obtenidos en las dos líneas celulares, se han detectado todos los posibles tipos de variación (Tabla 4.19), siendo el más frecuente el denominado 01(11) que implica un estado de metilación que impide el corte por *Acc65*I mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea celular muestran un estado no metilado, lo que se atribuye a un proceso de metilación en la diana. Los cambios de tipo 10(11) son los segundos en frecuencia como consecuencia de su acumulación en una de las plantas; en ellos la ausencia del marcador en la digestión con *Kpn*I puede atribuirse a un proceso de metilación de la citosina interna (siempre que dicha metilación no afecte a *Acc65*I, lo que se desconoce) pero también a que existan dos puntos de corte en el rango de tamaños analizados y que se encuentren en distinto estado de metilación en la citosina externa (ver Figura 4.4). Los cambios de tipo 11(01) son los terceros en frecuencia e implican un estado no metilado mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea presentan un estado de metilación que impide el corte por *Acc65*I, es decir un proceso de pérdida de metilación en la diana.

**Tabla 4.20.** Frecuencias absolutas de patrones metAFLP conservados y variables entre las plantas regeneradas obtenidas en cada línea celular de centeno, según los códigos binarios de cuatro dígitos propuestos por Bednarek y col. (2007).

| Línea celular | Planta | Códigos de patrones metAFLP | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Conservados | | | Correspondientes a variación | | | | | | | | | | | | |
| | | 1111 | 0011 | 1100 | 0001 | 0111 | 0101 | 0100 | 1011 | 1010 | 1001 | 1000 | 1110 | 1101 | 0010 | 0110 |
| K (1A1C) | ScK.1 | 497 | 82 | 34 | 7 | 4 | 0 | 17 | 15 | 4 | 0 | 2 | 10 | 4 | 12 | 1 |
| | ScK.2 | 509 | 83 | 32 | 6 | 5 | 0 | 8 | 9 | 3 | 0 | 2 | 5 | 6 | 11 | 0 |
| | ScK.3 | 512 | 90 | 39 | 6 | 2 | 2 | 8 | 8 | 1 | 0 | 0 | 5 | 1 | 7 | 0 |
| | ScK.4 | 491 | 79 | 26 | 3 | 11 | 3 | 21 | 23 | 2 | 2 | 9 | 10 | 3 | 9 | 0 |
| | ScK.5 | 512 | 84 | 40 | 10 | 6 | 2 | 6 | 7 | 2 | 0 | 0 | 5 | 0 | 8 | 1 |
| | ScK.6 | 495 | 89 | 33 | 5 | 1 | 3 | 7 | 17 | 3 | 1 | 1 | 11 | 5 | 9 | 0 |
| M (7A1) | ScM.1 | 433 | 96 | 35 | 12 | 11 | 4 | 12 | 11 | 3 | 2 | 10 | 1 | 7 | 6 | 0 |
| | ScM.2 | 433 | 99 | 48 | 6 | 7 | 1 | 20 | 12 | 0 | 0 | 2 | 3 | 4 | 6 | 1 |
| | ScM.3 | 409 | 66 | 43 | 3 | 14 | 0 | 20 | 4 | 3 | 0 | 9 | 32 | 2 | 26 | 7 |
| | ScM.4 | 439 | 101 | 51 | 4 | 3 | 2 | 12 | 8 | 0 | 1 | 0 | 1 | 2 | 9 | 0 |
| | ScM.5 | 425 | 105 | 44 | 13 | 3 | 0 | 6 | 9 | 4 | 0 | 7 | 10 | 3 | 4 | 1 |
| | ScM.5 | 424 | 102 | 50 | 8 | 5 | 0 | 16 | 12 | 1 | 0 | 0 | 11 | 4 | 5 | 1 |

A nivel global se observa, por tanto, una mayor abundancia de procesos de metilación respecto a los de pérdida de metilación, pero hay que tener en cuenta que el segundo tipo de cambio más frecuente no puede ser atribuido con precisión, de momento, a ninguno de los dos procesos dada la falta de información sobre la actividad de *Acc65*I en los posibles estados de metilación de la citosina interna del motivo 5´-GGTACC-3'.

Empleando la metodología de análisis de marcadores metAFLP de Bednarek y col., (2007) y Machczynska y col. (2014b), se han obtenido los códigos binarios de cuatro dígitos necesarios para todos los marcadores y plantas regeneradas analizadas, reemplazado el código que correspondería a la planta donadora por el código presente con mayor frecuencia en la línea celular correspondiente, como ya se indicó anteriormente. En la tabla 4.20 se presentan las frecuencias absolutas correspondientes a los distintos códigos que mostraron cada una de las plantas regeneradas de las distintas líneas celulares. Dicho código binario indica, en este orden, la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Acc65*I seguido de la presencia o ausencia del fragmento en el estado original y en la planta regenerada con *Kpn*I.

A partir de los datos de la tabla 4.20 y aplicando las fórmulas y coeficientes de corrección propuestos por Machczynska y col. (2014b) se han calculado distintos parámetros (Tabla 4.21) que describen las características de la variación presente en las plantas regeneradas en cada línea celular, distinguiendo entre la variación correspondiente a cambios en la secuencia de nucleótidos y a procesos tanto de pérdida como de ganancia de metilación, así como una estimación del estado de metilación a nivel global del genoma.

Como ya se ha indicado para las especies analizadas en los apartados anteriores, las cuatro primeras características de la tabla 4.21 corresponden a la interpretación inicial de Bednarek y col. (2007) y los valores que se indican como corregidos son los obtenidos después de aplicar el método extendido de Machczynska y col. (2014b).

**Tabla 4.21.** Porcentaje medio de cambios inducidos durante el cultivo *in vitro* y estado de metilación en las plantas regeneradas en cada una de las líneas celulares de centeno.

| Características metAFLP | 1A1C | 7A1 | Promedio |
|---|---|---|---|
| Variación de secuencia | 4,02± 0,7 | 4,73± 2,4 | 4,38± 0,4 |
| Desmetilación | 0,66± 0,4 | 1,18± 0,8 | 0,92± 0,3 |
| Metilación de novo | 1,75± 0,8 | 1,31± 0,4 | 1,53± 0,2 |
| Variación compleja | 1,73± 1,1 | 2,53± 0,8 | 2,13± 0,4 |
| Variación de secuencia corregida | 5,10± 1,0 | 6,39± 3,0 | 5,75± 0,6 |
| Desmetilación corregida | 0,84± 0,6 | 1,59± 1,0 | 1,22± 0,4 |
| Metilación de *novo* corregida | 2,23± 1,2 | 1,77± 0,6 | 2,00± 0,2 |
| Variación total inducida por cultivo de tejidos | 8,17± 2,5 | 9,76± 3,5 | 8,96± 0,8 |
| Sitios afectados por cambios en metilación | 3,07± 1,7 | 3,36± 0,9 | 3,22± 0,1 |
| Sitios no afectados por el cultivo de tejidos | 91,83± 2,5 | 90,24± 3,5 | 91,04± 0,8 |
| Metilación heredada | 15,21± 0,9 | 18,67± 2,1 | 16,94± 1,7 |
| Estado no metilado heredado | 69,30± 1,3 | 63,47± 1,5 | 66,38± 2,9 |
| Genoma metilado | 19,52± 0,7 | 23,61± 2,1 | 21,56± 2,0 |
| Genoma no metilado | 80,48± 0,7 | 76,39± 2,1 | 78,44± 2,0 |

(± corresponde a la desviación típica)

Para todas las características cuantitativas descritas en la tabla 4.21 se han obtenido valores no muy diferentes en las distintas líneas celulares, no existiendo diferencias significativas entre ellos (test-Z; $p < 0.01$), de tal forma que el porcentaje medio de motivos 5´-GGTACC-3' afectados por el cultivo de tejidos en las plantas analizadas de centeno fue del 8,96 %, correspondiendo un 5,75 % a cambios en su secuencia nucleotídica y un valor inferior, del 3,22 %, a modificaciones en el estado de metilación. Este valor medio global es menor que el calculado anteriormente (4,80 %), empleando únicamente los datos de los seis tipos de variación originados exclusivamente por cambios de metilación presentados en la

tabla 4.19; también los valores obtenidos para cada línea celular (3,07 %, y 3,36 % en las líneas 1A1C y 7A1, respectivamente) son inferiores a los calculados a partir de los datos de la tabla 4.19 (4,43 % y 5,17 % en las líneas 1A1C y 7A1, respectivamente).

En todas las líneas celulares se observa un mayor porcentaje en los procesos de metilación de *novo* frente a los procesos de desmetilación, con unos valores medios del 2,0 % y del 1,22 %. El porcentaje medio de sitios de restricción metilados que mantuvieron su estado fue del 16,94 %, mientras que el de sitios que mantuvieron su estado no metilado fue del 66,38 %. La cuantificación del porcentaje de sitios metilados presentes en las plantas regeneradas, empleando esta metodología, implica que su genoma presentaría una tasa de metilación del 21,56 %. Este valor es ligeramente superior al valor de 18,6 % calculado anteriormente empleando la frecuencia de los marcadores de distinto tipo obtenidos únicamente con *Kpn*I en cada planta y ambos muy inferiores al calculado para las plantas de la población control, del 30,3 %.

### 4.4 Detección de marcadores moleculares TMD en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Los marcadores obtenidos con la técnica TMD (*transposon methylation display*) permiten analizar el estado de metilación en secuencias próximas a elementos transponibles (TE). Se ha empleado esta metodología para estudiar el patrón de metilación de los motivos 5'-CCGG-3' que flanquean a cuatro tipos de retrotransposones (TE) de clase I (*gypsy, copia, TRIM y SINE*) en un total de 28 plantas de *Arabidopsis thaliana*. Para ello se han utilizado los isoesquizómeros *Hpa*II *y Msp*I, endonucleasas que reconocen la misma secuencia diana palindrómica 5'-CCGG-3' y que tienen un comportamiento distinto según su estado de metilación. Ambas enzimas están bloqueadas por la metilación completa de las dos citosinas en las dos cadenas del ADN y ambas cortan cuando no existe metilación en ninguna de las citosinas. *Hpa*II (pero no *Msp*I) también corta si únicamente la citosina externa está hemimetilada y *Msp*I (pero no *Hpa*II) también corta si solo la citosina interna está hemimetilada o metilada en las dos cadenas, es decir, que estas endonucleasas cortan de forma diferencial únicamente en distintos estados de metilación parcial de su secuencia diana.

Las plantas analizadas correspondieron a nueve individuos de la población control Columbia, nueve plantas regeneradas a partir de dos líneas celulares independientes (cuatro plantas de 208R0 y cinco plantas de 211R0) y diez plantas transgénicas obtenidas a partir de otras dos líneas celulares independientes (cinco plantas de 261T0 y cinco plantas de 291T0).

Para cada una de estas 28 plantas, se han obtenido ocho electroferogramas correspondientes a la amplificación con las parejas de cebadores específicos para los cuatro tipos de TE analizados (*gypsy*, *copia*, *TRIM* y *SINE*) a partir de cada una de las dos reacciones de digestión realizadas independientemente, con *Hpa*II *y Msp*I respectivamente. El procedimiento se repitió al menos una vez para todas las muestras. Por tanto, se generaron 224 electroferogramas que fueron comparados inicialmente con la ayuda del software GeneMapper v.4.0 y sometidos a una revisión manual de la que se obtuvieron un total de 111 marcadores TMD (Tabla 4.22). Cada fragmento amplificado obtenido en al menos una planta y en una de las reacciones dobles de digestión (*Hpa*II+*Eco*RI o *Msp*I+*Eco*RI) se consideró como un marcador TMD que indica la presencia de un motivo 5'-CCGG-3' que no se encuentra completamente metilado. Dicho número de marcadores implicó la realización de una matriz global de presencia-ausencia de 6.216 datos, al considerar la situación de cada uno de los marcadores en cada planta y reacción de digestión, codificados con un 1 cuando estaban presentes y un 0 cuando estaban ausentes.

**Tabla 4.22.** Marcadores TMD detectados en *Arabidopsis thaliana* para cada tipo de retrotransposones.

| | Marcadores totales n = 28 | P. control (COL) n = 9 | Línea 208R0 n = 4 | Línea 211R0 n = 5 | Línea 261T0 n = 5 | Línea 291T0 n = 5 | Líneas agrupadas n = 19 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *gypsy* | 8 | 3 | 3 | 2 | 3 | 5 | 6 |
| *copia* | 51 | 23 | 27 | 21 | 28 | 31 | 46 |
| *SINE* | 17 | 6 | 10 | 6 | 12 | 5 | 15 |
| *TRIM* | 35 | 22 | 28 | 25 | 30 | 24 | 33 |
| TOTAL | 111 | 54 | 68 | 54 | 73 | 65 | 100 |

El número de marcadores obtenido a partir de los TE de tipo *copia* y *TRIM* ha sido muy similar en todos los grupos de plantas, aunque ha sido muy superior al detectado a partir de los TE de tipo *gypsy* y de tipo *SINE* (Tabla 4.22). El número total de marcadores detectado en cada una de las plantas analizadas se representa gráficamente en la figura 4.11 siendo proporcional al número de sitos 5´-GGCC-3' próximos a los citados TE que pueden ser cortados indistintamente por *Hpa*II *y Msp*I y que, por tanto, corresponde al número de sitios que no se encuentran completamente metilados.

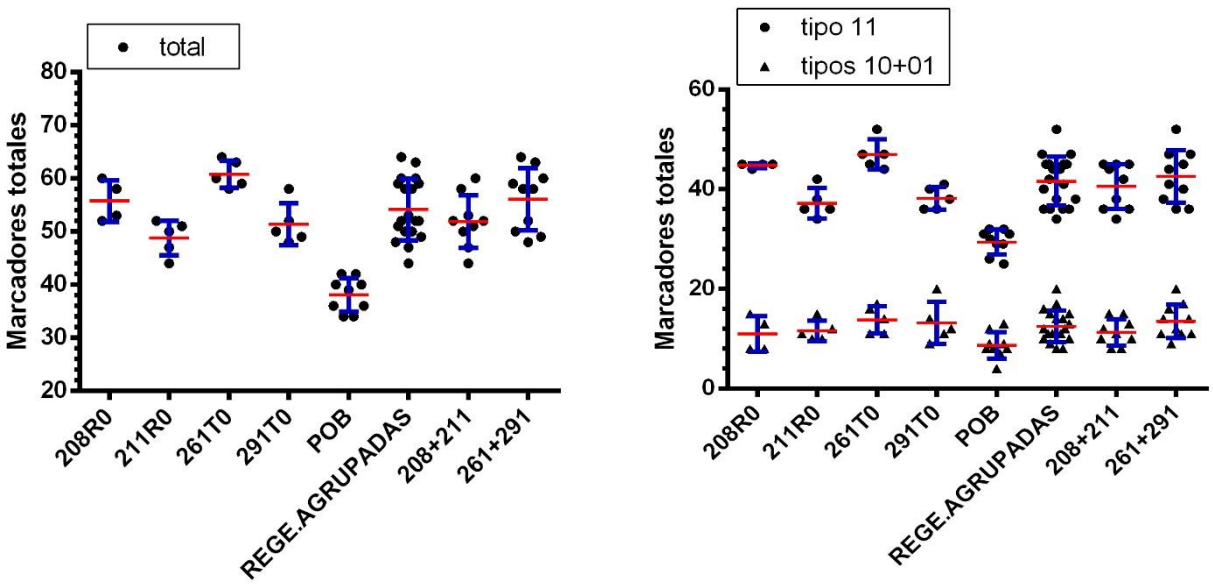


**Figura 4.11.** Número de marcadores TMD detectados, totales y de distintos tipos, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana*; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

El valor medio de dichos sitios por planta fue significativamente superior (*t* de Student; p<0,0001) en el agrupamiento de plantas regeneradas (51,8) y de regeneradas transgénicas (56,1), así como en el total de regeneradas agrupadas (54,1), que en la población control (38,1). También lo fue comparando el valor medio en cada una de las cuatro líneas celulares con el de la población (*t* de Student; p<0,0001). Por su parte, no se observaron diferencias significativas entre los valores medios de los agrupamientos de las plantas regeneradas y de las regeneradas transgénicas.

Los marcadores que fueron clasificados como tipo 11 (fragmentos detectados en ambas reacciones de restricción) revelan la presencia de sitios diana no metilados y fueron los más frecuentes en todas las plantas analizadas, mientras que varios tipos de dianas parcialmente metiladas son detectadas por los marcadores clasificados como tipo 10 (los que aparecen únicamente en la reacción con *Hpa*II) o como tipo 01 (los presentes exclusivamente en la reacción con *Msp*I). Los de tipo 01, que implican metilación o hemimetilación únicamente de la citosina interna de la secuencia diana, fueron más abundantes en todas las plantas que los de tipo 10, que implican hemimetilación de la citosina externa.

Cuando se comparó la frecuencia media con la que aparecen los distintos tipos de marcadores (Tabla 4.23) no se observaron diferencias significativas entre la población control y cada una de las líneas celulares regeneradas o sus agrupamientos.

**Tabla 4.23.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas en *Arabidopsis thaliana*.

| Marcadores | Pobl. control (COL) | Línea 208R0 | Línea 211R0 | Línea 261T0 | Línea 291T0 | Líneas agrupadas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| código 11 | 77,4 ± 5,5 | 80,5 ± 4,3 | 76,2 ± 3,3 | 77,3 ± 3,8 | 74,6 ± 5,6 | 77,0 ± 4,8 |
| código 10 | 6,2 ± 5,1 | 3,6 ± 1,1 | 3,7 ± 0,7 | 8,3 ± 2,8 | 6,3 ± 2,1 | 5,5 ± 2,7 |
| código 01 | 16,4± 3,8 | 15,9 ± 3,6 | 20,1 ± 3,2 | 14,4 ± 2,4 | 19,1 ± 6,4 | 17,5 ± 4,8 |

(± corresponde a la desviación típica)

En la figura 4.12 también se representan de forma independiente el número total de sitios no metilados (tipo 11) y de parcialmente metilados (tipo 10 + tipo 01) que fue detectado en cada una de las plantas analizadas. Todas las plantas regeneradas y regeneradas transgénicas presentaron un mayor número de sitios no metilados (tipo 11) que las plantas de la población de origen, con valores medios significativamente diferentes (*t* de Student; p<0,001) cuando se comparó la población (29,4) con cada una de las líneas celulares (de 37,2 a 47,0) o bien con el agrupamiento de plantas regeneradas (40,5), transgénicas (42,6) o regeneradas más transgénicas (41,6). No se observaron diferencias significativas respecto a su número medio por planta, entre los agrupamientos de las plantas regeneradas y las regeneradas transgénicas. Comparando el número medio de sitos parcialmente metilados (tipos 10+01) también se observaron diferencias significativas (*t* de Student; p<0,05) siendo menor su valor en la población (8,7) que en el agrupamiento de regeneradas (11,3), transgénicas (13,5) o regeneradas más transgénicas (12,5).

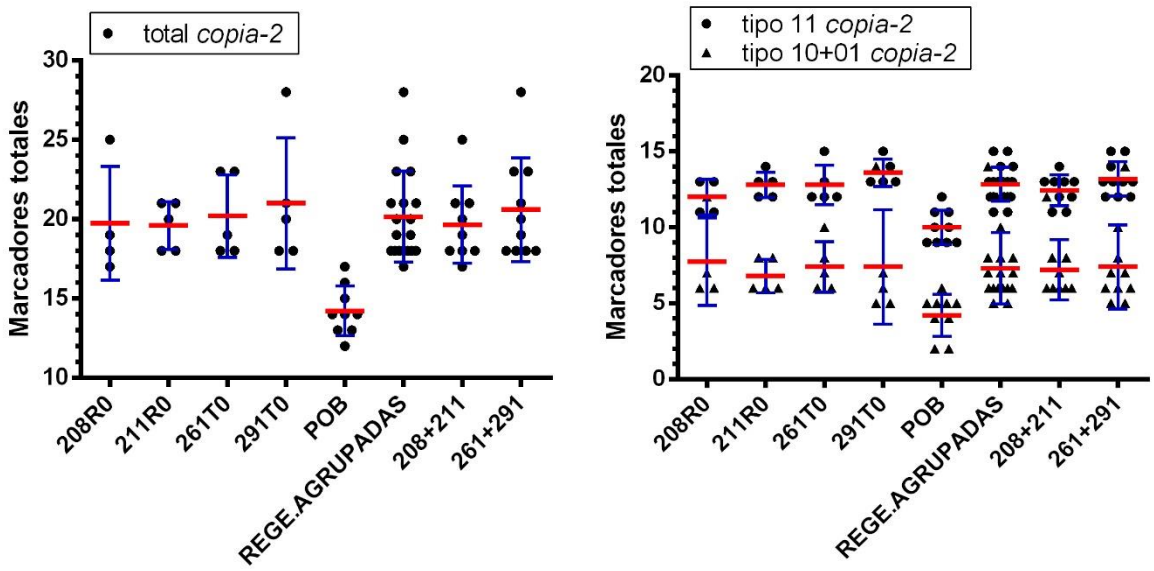


**Figura 4.12.** Número de marcadores TMD detectados asociados a elementos *copia*, totales y de distintos tipos, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana*; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica

Estas diferencias observadas para el total de marcadores TMD entre las plantas obtenidas por regeneración y las plantas de la población de origen también se detectaron al analizar de forma independiente los marcadores obtenidos con los TE *copia* (Figura 4.12) y *TRIM* (Figura 4.13). En el caso de *gypsy* y *SINE* el número de marcadores obtenido fue muy bajo, por lo que no se consideró su análisis individualizado.

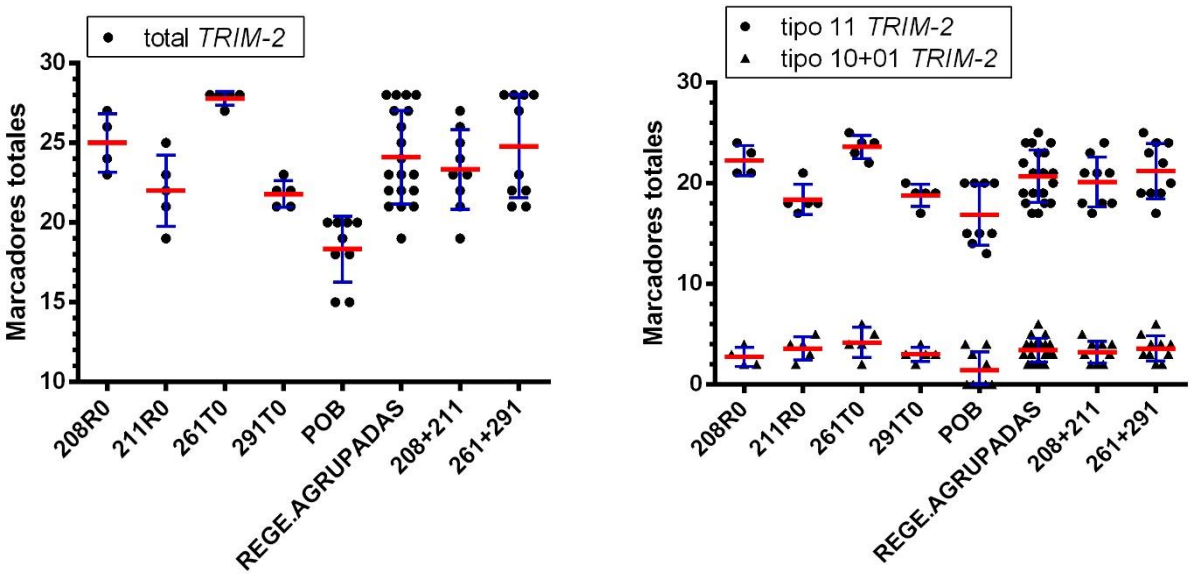


**Figura 4.13.** Número de marcadores TMD detectados asociados a elementos *TRIM*, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en *Arabidopsis thaliana*; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

### 4.4.1 Polimorfismo de marcadores moleculares TMD en *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh

Para analizar la variabilidad de cada uno de los marcadores TMD detectados, se compararon sus correspondientes códigos de presencia entre las plantas de una misma línea celular o grupo de plantas (población, regeneradas o transgénicas). En consecuencia, si todas las plantas del grupo de análisis mostraban el mismo código, se ha considerado al marcador como monomórfico y, en caso contrario, como polimórfico. Se han tenido en cuenta dos tipos de marcadores polimórficos, aquellos que siempre se detectaron en al menos una de las reacciones de digestión (tipos 11, 10 o 01) para todas las plantas del grupo de análisis y aquellos que en al menos una de las plantas no fueron detectados (tipo 00). La ausencia de un fragmento en ambas digestiones puede ser debido tanto a diferencias en la secuencia

nucleotídica como a un estado de metilación completa de la diana, mientras que el primer tipo de marcadores polimórficos se deben exclusivamente a diferencias en el estado de metilación.

Comparando conjuntamente las 28 plantas analizadas, se han mostrado como monomórficos el 13,5 % de los 111 marcadores totales detectados. En cada uno de los grupos (Tabla 4.24), se han mostrado como monomórficos el 35,2 % de los marcadores presentes en la población control, mientras que en las líneas de plantas regeneradas lo han sido el 63,2 % para 208R0 y el 70,4 % para 211R0 y en las líneas de plantas transgénicas los valores fueron del 58,9 % para 261T0 y del 55,4 % para 291T0. Comparando los valores obtenidos entre las líneas celulares regeneradas y las regeneradas transgénicas no se observan diferencias estadísticamente significativas, por lo que estos datos revelan una distribución homogénea de polimorfismo en cada uno de los procesos de regeneración. Sin embargo, en las plantas de cada una de las líneas celulares regeneradas los valores de polimorfismo son significativamente inferiores al obtenido en la población control (Test *Z*; $p<0.05$).

**Tabla 4.24.** Polimorfismo de marcadores TMD en cada grupo de plantas de *Arabidopsis thaliana*.

| | Marcadores totales | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletones* |
| P. control (COL) | 54 | 19 (35,2) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 35 (64,8) | 2 (3,7) | 6 (11,1) |
| Línea 208R0 | 68 | 40 (58,8) | 3 (4,4) | 0 (0,0) | 25 (36,8) | 3 (4,4) | 17 (25,0) |
| Línea 211R0 | 54 | 33 (61,1) | 5 (9,3) | 0 (0,0) | 16 (29,6) | 4 (7,4) | 9 (16,7) |
| Línea 261T0 | 73 | 38 (52,1) | 4 (5,5) | 1 (1,4) | 30 (41,2) | 2 (2,7) | 22 (30,1) |
| Línea 291T0 | 65 | 33 (50,8) | 2 (3,1) | 1 (1,5) | 29 (44,6) | 10 (15,4) | 17 (26,2) |
| Líneas agrupadas | 100 | 24 (24,0) | 2 (2) | 0 (0,0) | 74 (74,0) | 4 (4,0) | 28 (28,0) |

(Porcentajes entre paréntesis)

En cuanto a los marcadores polimórficos, hay que destacar que cierto número de ellos se deben a diferencias presentes en una única planta del grupo analizado ("*singletones*"). En la población control el 17,1 % de los marcadores polimórficos correspondieron a este tipo y en las líneas celulares, los valores oscilaron entre el 56,3 % y 73,3 %, indicando la presencia de marcadores polimórficos comunes en el proceso de regeneración de cada línea celular. Así,

cuando se agrupan las plantas regeneradas, los "*singletones*" descienden hasta el 37,8 % de los marcadores polimórficos.

En la Tabla 4.24 también se puede observar que solo una pequeña parte de los marcadores polimórficos puede ser asignada específicamente a cambios de metilación. Mientras en la población el número de marcadores polimórficos representa el 64,8 %, sólo el 3,7 % de los marcadores presentan polimorfismo originado exclusivamente por diferencias de estado metilación, lo que corresponde a un 5,71 % de los polimórficos. En las plantas regeneradas, se observa un porcentaje de marcadores polimórficos significativamente inferior, como cabría esperar comparando plantas clónicas, entre el 29,6 % y el 44,6 %, sin embargo los marcadores polimórficos por metilación oscilan del 2,7 % al 15,4 % correspondiendo a entre el 6,7 % y 34,5 % de los marcadores polimórficos. Al agrupar las plantas de todas las líneas, aumentó el porcentaje de marcadores polimórficos al 74,0 %, correspondiendo el 5,4 % de ellos a cambios exclusivamente de metilación. A este respecto cabe recordar que las endonucleasas *Hpa*II *y Msp*I no permiten distinguir entre polimorfismos generados por cambios de secuencia y los generados por metilación completa de su diana. Aun así, se ha observado una mayor variabilidad en los marcadores debida a cambios de metilación en las plantas obtenidas por regeneración que en las de la población original.

La frecuencia de marcadores polimórficos epigenéticos detectados en cada una de las plantas regeneradas de cada línea celular (Tabla 4.25) mostró una variación que va desde cero al 11,7 % con unos valores medios del 2,6 %, 3,7 %, 5,2 % y 6,5 % en las líneas 208R0, 211R0, 261T0 y 291T0, respectivamente, y una valor medio total del 4,6 %. Por su parte las variaciones observadas en una sola planta ("*singletones*") dentro de cada línea celular mostraron valores que varían de cero al 100,0 % en los marcadores polimórficos detectados en cada individuo, con unos valores medios del 50,0 %, 0,0 %, 17,7 % y 38,8 % en las líneas 208R0, 211R0, 261T0 y 291T0, respectivamente, y una media total del 25,3 %. Por lo tanto en todas las líneas celulares las plantas comparten una gran parte de las variaciones encontradas.

Considerando los datos de las cuatro líneas celulares, se han detectado todos los posibles tipos de variación (Tabla 4.25), siendo más frecuente en todas las líneas el tipo 01(11) que implica un estado de ganancia de grupos metilo en la citosina interna, mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea celular muestran un estado no metilado.

También se ha observado en cuatro de las 19 plantas, distribuidas en las cuatro líneas celulares, un mayor o igual número de cambios de tipo 11(01) que implica pérdida de grupos metilo en la citosina interna, dado que la mayoría de las plantas de la misma línea presentan metilación de la citosina interna. Los cambios de tipo 10(11) que implica ganancia de hemimetilación en la citosina externa, han sido los terceros en frecuencia, siendo los más abundantes en dos plantas. Así mismo se ha podido observar que los cambios menos frecuentes corresponden a los tipos 10(01) y 01(10) que son ambos resultado tanto de pérdidas como de ganancia de grupos metilo en cada una de las citosinas y al tipo 11(10) que implica la pérdida de hemimetilación de la citosina externa.

**Tabla 4.25.** Número y tipo de marcadores TMD polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular de *Arabidopsis thaliana*.

| Línea celular | Planta | Marca-dores totales | Tipo de variación [a] | | | | | | Total (%) | *Single-tones* [b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 01(11) | 10(11) | 11(01) | 11(10) | 10(01) | 01(10) | | |
| 208R0 | At0.1 | 53 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (1,9) | 0 (0,0) |
| | At0.2 | 58 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3,4) | 1 (50,0) |
| | At0.3 | 60 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 (3,3) | 1 (50,0) |
| | At0.4 | 52 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (1,9) | 1 (100,0) |
| 211R0 | At1.1 | 52 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 (3,8) | 0 (0,0) |
| | At1.2 | 47 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 (2,1) | 0 (0,0) |
| | At1.3 | 44 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (4,5) | 0 (0,0) |
| | At1.4 | 51 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3,9) | 0 (0,0) |
| | At1.5 | 50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 (4,0) | 0 (0,0) |
| 261T0 | At6.1 | 63 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 5 (7,9) | 3 (60,0) |
| | At6.2 | 60 | 2 | 3 | 1 | 0 | 1 | 0 | 7 (11,7) | 2 (28,6) |
| | At6.3 | 59 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3,4) | 0 (0,0) |
| | At6.4 | 64 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (3,1) | 0 (0,0) |
| | At6.5 | 58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| 291T0 | At9.1 | 58 | 3 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 6 (10,3) | 1 (16,7) |
| | At9.2 | 49 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 (2,0) | 0 (0,0) |
| | At9.3 | 50 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (4,0) | 2(100,0) |
| | At9.4 | 48 | 3 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 (8,3) | 0 (0,0) |
| | At9.5 | 52 | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 4 (7,7) | 3 (75,0) |

[a] Código presente en cada planta y código presente más frecuente (entre paréntesis) para cada línea celular.
[b] Variaciones observadas únicamente en la planta correspondiente; el porcentaje respecto a los marcadores polimórficos en dicha planta aparece entre paréntesis.

### 4.5 Detección de marcadores moleculares TMD en arroz *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variedad Nipponbare

Se ha empleado la técnica TMD (*transposon methylation display*) con las endonucleasas *Hpa*II *y Msp*I, al igual que en el apartado anterior, para analizar el patrón de metilación de los motivos 5'-CCGG-3' que flanquean, en este caso, a los retrotransposones de clase I *Tos17* (*copia*) y *Karma* (*LINE*) y a los transposones de clase II *mPing* (MITE) y *nDart* en un total de 28 plantas de arroz.

Las plantas analizadas correspondían a siete individuos de la población control, once plantas regeneradas a partir de dos líneas celulares independientes (seis plantas de R1 y cinco plantas de R3) y diez plantas transgénicas obtenidas a partir de otras dos líneas celulares independientes (cinco plantas de T2 y cinco plantas de T4). Para cada una de estas 28 plantas, se han obtenido ocho electroferogramas mediante el uso de los cebadores específicos para cada uno de los citados elementos transponibles (TE) activos de arroz en cada una de las dos reacciones de digestión realizadas independientemente, con *Hpa*II *y Msp*I respectivamente. Se repitió el procedimiento al menos una vez para cada una de las muestras y los electroferogramas fueron comparados inicialmente con la ayuda del software GeneMapper v.4.0 y posteriormente sometidos a una revisión manual de la que se obtuvieron un total de 152 marcadores TMD (Tabla 4.26). Como ya se indicó en el apartado anterior, se consideró como marcador a cada uno de los fragmentos de ADN detectados en al menos una de las plantas analizadas y en al menos una de las dos dobles reacciones de digestión (*Hpa*II+*Eco*RI o *Msp*I+*Eco*RI) por lo que se corresponde con la presencia de un sitio 5'-CCGG-3' que no se encuentre completamente metilado. La matriz global de presencia-ausencia incluyó un total de 8.512 datos, al considerar la situación de cada uno de los 152 marcadores en cada planta y reacción de digestión, que fueron codificados con un 1 cuando estaban presentes y un 0 cuando estaban ausentes.

El número total de marcadores detectado asociado a cada uno de los TE analizados ha variado entre 30 y 46 presentando, aquellos obtenidos a partir de *Karma* y *mPing*, un número muy similar en todos los grupos de plantas mientras que se ha observado una mayor variación entre los grupos para los obtenidos a partir de *Tos17* y *nDart*. El número total de marcadores detectado en cada una de la plantas analizadas, que se corresponde con el número de sitios que no se encuentran completamente metilados en proximidad a estos TE, se muestra de forma gráfica en la Figura 4.14. El valor medio en las plantas de la población original (84,3)

no mostró diferencias significativas con los agrupamientos de plantas regeneradas (84,1), de regeneradas transgénicas (78,6) ni con el total de regeneradas agrupadas (81,5). Tampoco hubo diferencias significativas entre los valores medios de los agrupamientos de las plantas regeneradas y las regeneradas transgénicas.

**Tabla 4.26.** Marcadores TMD detectados en arroz asociados a cada tipo de elemento transponible.

| | Marcadores totales n=28 | P. control n=7 | Línea R1 n=6 | Línea R3 n=5 | Línea T2 n=5 | Línea T4 n=5 | Líneas agrupadas n=21 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Tos17* | 30 | 19 | 30 | 9 | 19 | 11 | 30 |
| *Karma* | 35 | 32 | 35 | 35 | 31 | 29 | 35 |
| *nDart* | 46 | 19 | 41 | 14 | 19 | 7 | 44 |
| *mPing* | 41 | 40 | 36 | 35 | 36 | 37 | 37 |
| TOTAL | 152 | 110 | 142 | 93 | 105 | 84 | 146 |

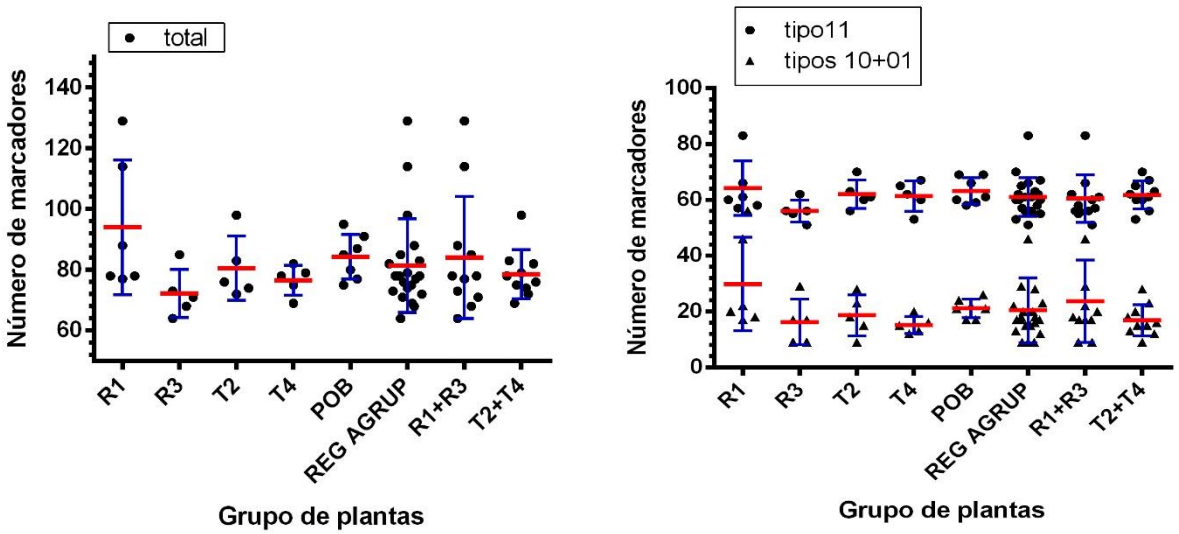


**Figura 4.14.** Número de marcadores TMD detectados, totales y de cada tipo, en cada planta y grupo analizado en arroz; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior para *A. thaliana*, cada uno de los marcadores TMD detectado fue clasificado en cada planta analizada con un código de dos dígitos de acuerdo a su patrón de presencia-ausencia en las dos dobles digestiones. Los marcadores que fueron clasificados como tipo 11 (fragmentos detectados en ambas reacciones de restricción) revelan la presencia de sitios diana no metilados y fueron los más frecuentes en todas las plantas analizadas, mientras que varios tipos de dianas

parcialmente metiladas son detectadas por los marcadores clasificados como tipo 10 (los que aparecen únicamente en la reacción con *Hpa*II) o como tipo 01 (los presentes exclusivamente en la reacción con *Msp*I). Los de tipo 01, que implican metilación o hemimetilación únicamente de la citosina interna de la secuencia diana, fueron más abundantes que los de tipo 10, que implican hemimetilación de la citosina externa, excepto en tres plantas de la población y en tres plantas de la línea R1. Dos de dichas plantas de la línea R1 mostraron un número muy elevado de marcadores totales, una por su alto número de tipo 11 y de 10 y la otra por el elevado valor de tipo 10, comparado con el resto de plantas regeneradas. Por ello, al comparar la frecuencia media con la que aparecen los distintos tipos de marcadores (Tabla 4.27) únicamente se observan diferencias significativas (Test *Z*; $p<0.01$) para los de tipo 10 entre la población y las distintas líneas y su agrupamiento, excepto con la línea R1.

**Tabla 4.27.** Porcentaje medio de los distintos tipos de marcadores detectados en cada grupo de plantas en arroz.

| Marcadores | Pobl. control | Línea R1 | Línea R3 | Línea T2 | Línea T40 | Líneas agrupadas |
|---|---|---|---|---|---|---|
| código 11 | 75,0 ± 2,2 | 69,9 ± 9,6 | 78,2 ± 7,8 | 77,4 ± 5,9 | 80,1± 3,6 | 76,1 ±8,3 |
| código 10 | 12,9 ± 4,2 | 18,7 ± 15,0 | 3,7 ± 2,0 | 6,5± 6,1 | 3,7 ± 2,0 | 8,7 ± 10,8 |
| código 01 | 12,1± 5,0 | 11,4 ± 7,1 | 18,1 ± 8,3 | 16,1 ± 5,9 | 16,2 ± 3,3 | 15,3 ± 6,9 |

(± corresponde a la desviación típica)

En la figura 4.14 también se representan de forma separada el número total de sitios no metilados (tipo 11) y de parcialmente metilados (tipo 10 + tipo 01) que fue detectado en cada una de las plantas analizadas. Respecto a los sitios no metilados, no se observaron diferencias significativas entre los valores medios obtenidos para la población de origen y los agrupamientos de plantas regeneradas, regeneradas transgénicas, o regeneradas más transgénicas, a pesar de que la línea celular R3 si presentó un valor significativamente inferior al mostrado tanto por la población como por las otras líneas celulares (*t* de Student; $p<0,01$). Por su parte, cuando se analizan los sitios parcialmente metilados (tipo 10 + tipo 01), tampoco se observan diferencias significativas entre la población control respecto al valor obtenido en los agrupamientos de las plantas regeneradas y de regeneradas transgénicas.

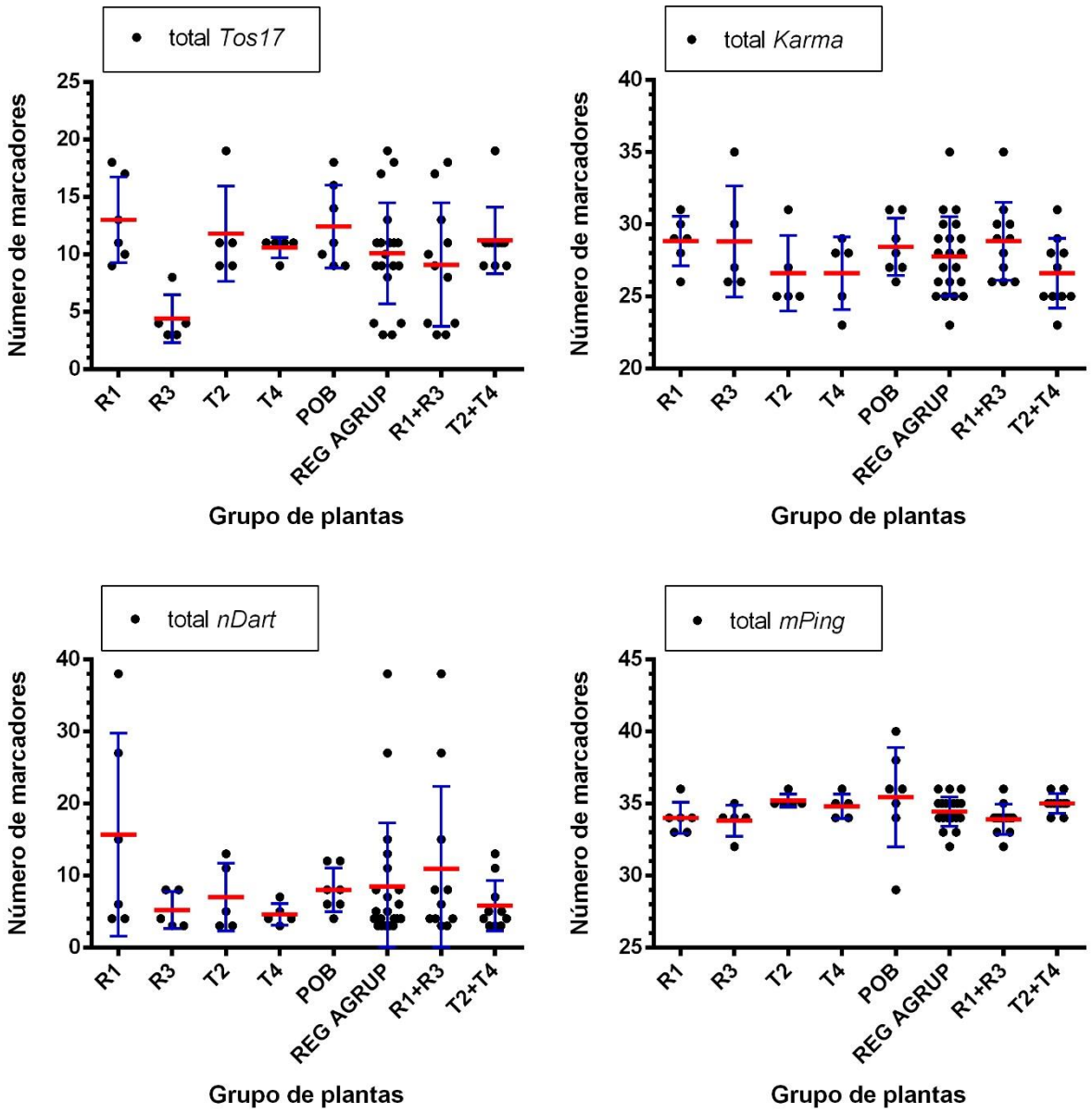


**Figura 4.15.** Número de marcadores TMD detectados asociados a cada uno de los elementos *Tos17*, *Karma*, *nDart y mPing*, en cada planta y grupo analizado en arroz; las líneas rojas indican el valor medio y las azules la desviación típica.

Al analizar de forma independiente los marcadores obtenidos para cada uno de los TE empleados (*Tos17*, *Karma*, *mPing* y *nDart*) tampoco se observaron diferencias significativas entre las plantas pertenecientes a la población de origen y los distintos grupos de plantas regeneradas y transgénicas, con la excepción de los casos ya comentados de la línea celular R3, cuyo inferior número total de marcadores se debió a la menor presencia de marcadores asociados a retrotransposones *Tos17* (Figura 4.15), y de la línea celular R1 que presentó dos plantas con un elevado número de marcadores correspondientes a retrotransposones *nDart* .

### 4.5.1 Polimorfismo de marcadores moleculares TMD en *Oryza sativa* L. spp. *japonica* variedad Nipponbare

Atendiendo a la presencia de los códigos 11, 01, 10 y 00 en el grupo de plantas a considerar, cada uno de los distintos marcadores TMD detectados fueron clasificados como monomórfico o polimórfico. En consecuencia, si todas las plantas del grupo de análisis (población o línea regenerada) mostraban el mismo código, se ha considerado al marcador como monomórfico y, en caso contrario, como polimórfico. Al igual que en apartado anterior, se han tenido en cuenta dos tipos de marcadores polimórficos, los que mostraron únicamente códigos 11, 10 o 01 en todas las plantas del grupo analizado y aquellos marcadores que también presentaron el código 00 en al menos una de las plantas. Los primeros deben su polimorfismo exclusivamente a diferencias en el estado de metilación, mientras que en los segundos la ausencia de un marcador puede deberse tanto a un cambio a nivel de secuencia nucleotídica como a un estado de metilación en ambas cadenas de las dos citosinas de la secuencia diana 5'-CCGG-3'.

Comparando conjuntamente las 28 plantas analizadas, se han mostrado como monomórficos el 27,0 % de los 152 marcadores totales detectados. En cada uno de los grupos (Tabla 4.28), se han mostrado como monomórficos el 48,2 % de los marcadores presentes en la población control, mientras que en las líneas de plantas regeneradas lo han sido el 31,7 % para R1 y el 57,0 % para R3 y en las líneas de plantas transgénicas los valores fueron del 55,2 % para T2 y del 66,7 % para T4. Comparando los valores obtenidos para la población y para cada una de las líneas celulares se observan diferencias significativas únicamente (Test *Z*; $p<0.01$) con la línea R1 de plantas regeneradas que presentó una mayor tasa de polimorfismo y también con la línea T4 que presentó una menor tasa de polimorfismo. Las líneas R3 y T2 mostraron unos porcentajes de marcadores polimórficos muy parecidos, ligeramente

inferiores al de la población, que fueron significativamente menores que el de la línea R1 (Test *Z*; $p<0.01$). La línea T4 también presentó un valor significativamente inferior al de la línea R1. Estos resultados apuntan a una distribución muy heterogénea del polimorfismo en cada uno de los procesos de regeneración analizados.

**Tabla 4.28.** Polimorfismo de marcadores TMD en cada grupo de plantas de arroz.

| | Marcadores totales | Marcadores monomórficos | | | Marcadores polimórficos | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Tipo 11 | Tipo 01 | Tipo 10 | Totales | Metilación | *Singletones* |
| P. control | 110 | 51 (46,4) | 0 (0,0) | 2 (1,8) | 57 (51,8) | 5 (4,5) | 22 (20,0) |
| Línea R1 | 142 | 45 (31,7) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 97 (68,3) | 10 (7,0) | 35 (24,6) |
| Línea R3 | 93 | 50 (53,8) | 3 (3,2) | 0 (0,0) | 40 (43,0) | 7 (7,5) | 22 (23,7) |
| Línea T2 | 105 | 52 (49,5) | 6 (5,7) | 0 (0,0 | 47 (44,8) | 9 (8,57) | 32 (30,5) |
| Línea T4 | 84 | 53 (63,1) | 3 (3,6) | 0 (0,0) | 28 (33,3) | 8 (9,5) | 11 (13,1) |
| Líneas agrupadas | 146 | 41 (28,1) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 105 (71,9) | 8 (5,5) | 20 (13,7) |

(Porcentajes entre paréntesis)

En la población control el 38,6 % de los marcadores polimórficos corresponden a los definidos como "*singletones*" (diferencias presentes en una única planta del grupo analizado) y en las líneas celulares, los valores oscilan entre el 36,1 % y 68,1 % indicando la presencia de marcadores polimórficos comunes en el proceso de regeneración de cada línea celular. Por ello, cuando se agrupan las plantas regeneradas los "*singletones*" representan únicamente el 19,0 % de los marcadores polimórficos.

En la tabla 4.28 también se puede observar que solo una pequeña parte de los marcadores polimórficos puede ser asignada específicamente a cambios de metilación. Mientras en la población control el número de marcadores polimórficos representa el 51,8 %, sólo el 4,5 % de los marcadores presentan polimorfismo originado exclusivamente por diferencias de estado metilación, lo que corresponde a un 8,7 % de los polimórficos. En tres de las líneas celulares regeneradas y regeneradas transgénicas, los valores de polimorfismo fueron inferiores al obtenido en la población control, oscilando entre el 33,3 % y el 44,8 % y en la línea R1 fue superior del 68,3 %, mientras que los marcadores polimórficos por

metilación fueron del 7,0 % al 9,5 %, correspondiendo a entre el 10,3 % y el 28,6 % de los polimórficos en dichas líneas. Al agrupar las plantas de todas las líneas, el porcentaje de marcadores polimórficos aumentó al 71,9 % correspondiendo el 7,6 % de ellos a cambios exclusivamente de metilación. Por lo tanto, se ha observado un mayor porcentaje de variabilidad debida a cambios de metilación en las plantas obtenidas por regeneración que en las plantas de la población de origen.

La frecuencia de marcadores polimórficos epigenéticos detectados en cada una de las plantas regeneradas de cada línea celular (Tabla 4.29) mostró una variación que va desde cero al 16,9 % con unos valores medios del 10,9 %, 6,9 %, 5,8 % y 6,4 % en las líneas R1, R3, T2 y T4, respectivamente, y una valor medio total del 7,7 %. Por su parte las variaciones observadas en una sola planta ("*singletones*") dentro de cada línea celular mostraron valores que varían de cero al 57,1 % en los marcadores polimórficos detectados, con unos valores medios del 7,4 %, 4,0 %, 21,4 % y 18,9 % en las líneas R1, R3, T2 y T4, respectivamente, y una media total del 12,7 %. Por lo tanto en todas las líneas celulares las plantas comparten gran parte de las variaciones encontradas.

Considerando los datos de las cuatro líneas celulares, se han detectado casi todos los posibles tipos de variación epigenética (Tabla 4.29) con la única excepción del tipo 01(10). El más frecuente fue el tipo 01(11) que implica un estado de ganancia de grupos metilo en la citosina interna, mientras que la mayoría de las plantas de la misma línea celular muestran un estado no metilado. Los cambios de tipo 10(11), que implica ganancia de hemimetilación en la citosina externa, fueron los segundos en frecuencia global aunque en tres plantas se mostraron como los más abundantes. Los cambios de tipo 11(01), que implica pérdida de grupos metilo en la citosina interna, han sido los terceros en frecuencia global pero los más abundantes en ocho de las plantas. En menor medida se han presentado cambios de tipo 11(10) que implica la pérdida de hemimetilación de la citosina externa y de tipo 10(01) que implica tanto pérdidas como ganancia de grupos metilo en cada una de las citosinas.

**Tabla 4.29.** Número y tipo de marcadores polimórficos epigenéticos obtenidos en las plantas regeneradas de cada línea celular de arroz.

| Línea celular | Planta | Marcadores totales | Tipo de variación [a] | | | | | | Total (%) | *Singletones* [b] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 01(11) | 10(11) | 11(01) | 11(10) | 10(01) | 01(10) | | |
| R1 | Os1.1 | 114 | 1 | 13 | 1 | 1 | 3 | 0 | 19 (16,7) | 7 (36,8) |
| | Os1.2 | 129 | 5 | 0 | 3 | 4 | 0 | 0 | 12 (9,3) | 0 (0,0) |
| | Os1.3 | 88 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 3 (3,4) | 0 (0,0) |
| | Os1.4 | 78 | 7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 (10,3) | 0 (0,0) |
| | Os1.5 | 77 | 11 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 13 (16,9) | 1 (7,7) |
| | Os1.6 | 78 | 5 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 (9,0) | 0 (0,0) |
| R3 | Os3.1 | 71 | 0 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 5 (7,0) | 0 (0,0) |
| | Os3.2 | 68 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 7 (10,3) | 0 (0,0) |
| | Os3.3 | 64 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 5 (7,8) | 0 (0,0) |
| | Os3.4 | 73 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 5 (6,8) | 1 (20,0) |
| | Os3.5 | 85 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 (2,4) | 0 (0,0) |
| T2 | Os2.1 | 98 | 1 | 1 | 4 | 0 | 0 | 0 | 6 (6,1) | 1 (16,7) |
| | Os2.2 | 72 | 0 | 2 | 4 | 0 | 1 | 0 | 7 (9,7) | 0 (0,0) |
| | Os2.3 | 74 | 5 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 7 (9,5) | 4 (57,1) |
| | Os2.4 | 83 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 3 (3,6) | 1 (33,3) |
| | Os2.5 | 76 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| T4 | Os4.1 | 79 | 1 | 0 | 6 | 1 | 0 | 0 | 8 (10,1) | 3 (37,5) |
| | Os4.2 | 78 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 (3,8) | 0 (0,0) |
| | Os4.3 | 82 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 (0,0) | 0 (0,0) |
| | Os4.4 | 75 | 4 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6 (8,0) | 0 (0,0) |
| | Os4.5 | 69 | 3 | 4 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 (10,1) | 4 (57,1) |

[a] Código presente en cada planta y código presente más frecuente (entre paréntesis) para cada línea celular.
[b] Variaciones observadas únicamente en la planta correspondiente; el porcentaje respecto a los marcadores polimórficos en dicha planta aparece entre paréntesis.

# DISCUSIÓN

## 5. Discusión

El estudio de especies vegetales consideradas como modelos biológicos, ha sido utilizado frecuentemente para investigar diversos aspectos relacionados con la variación somaclonal y, adicionalmente, la disponibilidad de diferentes metodologías de cultivo *in vitro* y transformación completamente estandarizadas para estas especies, ha permitido obtener organismos modificados genéticamente de forma eficiente. Las especies *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh, *Oryza sativa* L. y *Secale cereale* L. poseen excelentes características para el análisis de la variación somaclonal y de sus componentes epigenéticos. Diversos estudios previos han demostrado que el uso de estas especies, empleando diferentes técnicas de cultivo *in vitro* y marcadores moleculares, ha resultado muy eficaz para detectar distintos aspectos relacionados con la inestabilidad genética y epigenética, como indican los trabajos realizados hasta ahora en *Arabidopsis* (Polanco y Ruiz, 2002; Fras y col., 2007; Jiang y col., 2011; Barkla y col., 2014; Ito y Tarutani, 2014; Wickramasuriya y Dunwell, 2015), en arroz (Gao y col., 2009; La y col., 2011; Park y col., 2011; Miyao y col., 2012; Kantama y col., 2013; Stroud y col., 2013; Wang y col., 2013; Main y col., 2015) y en centeno (Rakoczy-Trojanowska, 2002; de la Puente y col., 2008; Ballesteros y col., 2009; Linacero y col., 2011; González y col., 2013; Targonska y col., 2013).

La variación somaclonal se ha relacionado con mutaciones puntuales, reordenaciones cromosómicos y cambios en el nivel de ploidía, que causan inestabilidad genética (Azman y col., 2014). Ahora se sabe que la variación inducida a través de las técnicas *in vitro*, no solo se relaciona con cambios en las secuencias nucleotídicas, sino que también se relaciona con los cambios que inducen variación a otro nivel como la metilación del ADN y activación de elementos móviles, dando lugar a cambios heredables en la expresión génica que no dependen de modificaciones a nivel nucleotídica y que conducen a la variación epigenética. La epigenética hace referencia a la variación hereditaria en la regulación y la función de los genes que no puede ser explicada por cambios en la secuencia de ADN.

La inestabilidad genómica inducida por el cultivo de tejidos se puede analizar mediante el estudio de las alteraciones que se observan en los patrones de fragmentos obtenidos por digestión con endonucleasas del genoma de plantas regeneradas. En este trabajo se describen los resultados obtenidos de dicho análisis en las especies mencionadas que presentan unas características genómicas diferentes. Para ello, se han empleado dos tipos de marcadores moleculares altamente reproducibles, metAFLP (Bednarek y col., 2007) y TMD (Kashkush y Khasdan, 2007) por primera vez en dichas especies, que a diferencia de la mayoría de

estudios en los que se han empleado anteriormente, han sido analizados mediante separación por electroforesis capilar empleando marcaje con fluorocromos en lugar de electroforesis en gel.

Se ha seleccionado la separación en capilar porque permite obtener la máxima resolución (un par de bases) en la identificación de los marcadores y por tanto evita, en la mayor medida posible, tanto la coincidencia de tamaños de fragmentos diferentes dentro de una muestra como la homoplasia (misma migración de fragmentos no homólogos) cuando se comparan distintas muestras, problemas que pueden afectar al análisis de los citados tipos de marcadores (Meudt y Clarke, 2007). Además, se comprobaron individualmente todos los marcadores detectados inicialmente como polimórficos, mediante el análisis de forma manual de todas las réplicas de los electroferogramas correspondientes tratando de reducir los posibles errores de la anotación primaria por software.

Los marcadores metAFLP y TMD son particularmente útiles en el estudio de la variación somaclonal y su componente epigenético en plantas regeneradas a través de técnicas de cultivo *in vitro*. Son marcadores evolucionados a partir de las técnicas AFLP y TD, respectivamente, en las que se han sustituido las endonucleasas de restricción originales por otras que puedan tener bloqueada su actividad como consecuencia de la presencia de 5-metil citosinas en su secuencia diana. De esta forma y dependiendo de las endonucleasas elegidas se habla de unos tipos u otros de marcadores que hacen posible la detección y discriminación de polimorfismos entre individuos tanto a nivel de secuencia nucleotídica (variabilidad genética) como a nivel de estado de metilación del ADN (variabilidad epigenética). Así, mientras los marcadores AFLP y TD únicamente permiten detectar cambios a nivel de secuencia, los marcadores MSAP (derivado de AFLP) y TMD permiten la detección de cambios a nivel de metilación y los denominados como metAFLP permiten identificar tanto cambios a nivel de secuencia como alteraciones en el patrón de metilación, permitiendo la evaluación de numerosas características cuantitativas de la variación observada en individuos obtenidos por el cultivo de tejidos in vitro (Machczynska y col. 2014b).

## 5.1 Endonucleasas de restricción utilizadas para el estudio de la inestabilidad genética y epigenética.

Los isoesquizómeros *Hpa*II y *Msp*I, que reconocen la misma secuencia diana 5'-CCGG-3', han sido y continúan siendo la pareja de endonucleasas más empleada para el análisis de cambios a nivel de metilación con distintas metodologías, entre las que se incluyen la obtención de marcadores MSAP y TMD. Sin embargo, la elección de las endonucleasas *Hpa*II y *Msp*I puede conducir a una interpretación ambigua de los datos obtenidos y algunas conclusiones pueden ser inconsistentes con el estado de conocimiento actual de la metilación del ADN de animales y plantas (Fulneček y Kovařík, 2014). Por un lado, la secuencia diana 5'-CCGG-3' puede presentar teóricamente hasta 10 formas de metilación distintas y no se han realizado los ensayos de actividad para todas ellas. Además, *Hpa*II y *Msp*I generan patrones idénticos de digestión frente a distintas formas de metilación de su secuencia diana, lo que no permite detectar todos los cambios de metilación en ese motivo, y también existe una controversia respecto a la especificidad de *Hpa*II para digerir secuencias hemimetiladas en la citosina externa, que podría depender tanto de la concentración de enzima usada como de los tiempos de incubación (Schulz y col., 2013; Fulneček y Kovařík, 2014).

Ambas endonucleasas, *Hpa*II y *Msp*I, están bloqueadas por la metilación completa de ambas citosinas en las dos cadenas del ADN, por lo que no permiten una estimación precisa de los niveles de metilación ni tampoco diferenciar polimorfismos originados por metilación completa de aquellos originados por cambio de secuencia nucleotídica. Ambas cortan cuando no hay ninguna citosina metilada, mientras que *Hpa*II (pero no *Msp*I) también corta si solo está hemimetilada la citosina externa y *Msp*I (pero no *Hpa*II) también corta si solo la citosina interna está hemimetilada o metilada por completo, como demuestran los estudios de Butkus y col. (1987), Ben-Hattar y Jiricny (1988), McClelland y col. (1994) y de Hou et al. (2004). A pesar de las conclusiones de los citados trabajos, algunos autores consideran que *Msp*I no corta cuando la citosina interna está hemimetilada (Baurens y col., 2003; Guo y col., 2007; Li y col., 2007; Salmon y col., 2008) o bien que *Hpa*II también corta cuando la citosina interna está hemimetilada (Li y col., 2002; Bardini y col., 2003; Chakrabarty y col., 2003; Portis y col., 2004; Hao y col., 2004; Hanai y col., 2010) generando interpretaciones contradictorias.

Además, en el caso concreto de los marcadores MSAP en los que se emplea como enzima de corte poco frecuente a *Eco*RI, también puede verse comprometida la actividad cuando las citosinas de su secuencia diana 5'-GAATTC-3' están metiladas en ambas cadenas

y, por lo tanto, no todos los cambios en los patrones de MSAP reflejan cambios en sitios *Msp*I/*Hpa*II (Fulnecek y Kovarik, 2014).

Como alternativa a los inconvenientes que plantea el uso de *Hpa*II y *Msp*I junto a *Eco*RI para obtener marcadores MSAP, Bednarek y col. (2007) utilizaron por primera vez la variante metAFLP de la técnica MSAP empleando la combinación de endonucleasas *Acc*65I y *Kpn*I (como enzimas de corte poco frecuente que reconocen la secuencia diana 5'-GGTACC-3 que puede verse afectada por metilación) y a la endonucleasa *Mse*I como enzima de corte frecuente que reconoce la secuencia 5'-TTAA-3'. Según Bednarek y col. (2007), estas endonucleasas permiten analizar tanto los cambios a nivel de secuencia nucleotídica como los cambios por metilación en plantas regeneradas porque *Acc*65I es sensible a la presencia de 5metil-citosina en su secuencia de reconocimiento mientras que *Kpn*I no está afectada por el estado de metilación. En los distintos trabajos publicados hasta la fecha en los que se han empleado marcadores metAFLP se indica esta misma interpretación (Fiuk y col., 2010; Lu et al., 2012; Chwedorzewska and Bednarek, 2012; Machczynska y col. 2014b; Machczynska y col. 2015). Sin embargo, la información disponible en la base de datos de referencia sobre endonucleasas de restricción, REBASE (Roberts y col. 2015; The Restriction Enzyme Database, http://rebase.neb.com), aporta detalles concretos respecto la sensibilidad de *Acc*65I y contradice, en parte, la interpretación como no sensible de *Kpn*I.

Actualmente, en REBASE se señala que el estado metilado de la citosina terminal en la doble cadena (5' GGTAC5mC 3' / 3' 5mCCATGG 5') impide el corte por *Acc*65I, mientras que cuando está hemimetilada se presenta una tasa del 20 % de sitios digeridos. Dichos datos están avalados por observaciones de la empresa Fermentas UAB (Vilnius, Lituania) no publicadas. No existe información disponible respecto a cómo afecta la metilación de la citosina interior (en la doble cadena o en estado hemimetilado) a la actividad de *Acc*65I.

Para *Kpn*I, se indica que tanto el estado metilado de la citosina terminal en la doble cadena (5' GGTAC5mC 3' / 3' 5mCCATGG 5') como su estado hemimetilado no afectan al corte, según datos no publicados de la empresa New England Biolabs (Ipswich, MA, EE.UU.). También se señala que el estado hemimetilado de la citosina interior tampoco impide el corte, según datos no publicados de la empresa Megabase Research Products (Lincoln, NE, EE.UU.). Por otra parte, se ha descrito que el estado hemimetilado simultáneo en las dos citosinas de la secuencia de reconocimiento impide parcialmente la digestión por *Kpn*I, siendo necesarias altas concentraciones de la endonucleasa para conseguir la digestión

del 100% de los sitios (Nelson y col., 1992) y que el estado metilado de la citosina interior en la doble cadena (5' GGTA5mCC 3' / 3' C5mCATGG 5') impide totalmente la digestión por *Kpn*I (Korch y Hagblom, 1986; Gunn y col., 1992).

En resumen, las enzimas *Acc*65I y *Kpn*I se comportan de manera diferente y concreta respecto al estado de metilación de la citosina terminal y se desconoce actualmente cómo le afectan a *Acc*65I los posibles estados de metilación de la citosina interior mientras que si existen datos sobre sensibilidad de *Kpn*I en dicha situación, pero estos últimos no han sido tenidos en cuenta en la interpretación propuesta por Bednarek y col. (2007) ni en la modificación de Machczynska y col. (2014b) para marcadores metAFLP. Por lo tanto, el empleo de esta pareja de isoesquizómeros para el análisis del cambio de estado de metilación a nivel genómico implica asumir un posible desajuste en la interpretación de los resultados que se obtienen, si para ello se tiene en cuenta únicamente el estado de metilación de la citosina externa.

En este trabajo se han empleado las endonucleasas *Acc*65I y *Kpn*I para la obtención de marcadores metAFLP y se han interpretado los resultados obtenidos tanto empleando la metodología publicada por Machczynska y col. (2014b) basada en la inicial de Bednarek y col. (2007), como considerando los estados de metilación que afectan a *Kpn*I. Además, se trató de adaptar los marcadores TMD a las endonucleasas *Acc*65I y *Kpn*I, para aprovechar las ventajas de análisis que permitirían discriminar entre cambios nucleotídicos y cambios en los patrones de metilación. Sin embargo, la frecuencia de su secuencia diana es baja dado que son seis pares de bases, por lo que se originaban pocos marcadores y de un tamaño superior al de resolución en el equipo de análisis empleado. Por ello, se desestimó el análisis de las muestras con dichas endonucleasas, realizando la obtención de marcadores TMD con las enzimas descritas originalmente para esta metodología, *Hpa*II y *Msp*I.

Los resultados obtenidos con la pareja de isoesquizómeros *Acc*65I y *Kpn*I (marcadores metAFLP) que reconocen la secuencia 5' GGTACC 3' no deben ser comparados directamente con los que se hayan obtenido con marcadores MSAP en los que se hayan empleado los isoesquizómeros *Hpa*II y *Msp*I como enzimas sensibles a la metilación y que reconocen la secuencia 5' CCGG 3'. Ello es debido a que las citosinas que presentan las secuencias de reconocimiento de unas y otras enzimas se presentarán en estado metilado como consecuencia de la actuación de distintas rutas y actividades enzimáticas. En las plantas se ha encontrado 5-metil citosina en tres contextos de secuencia: CG, CHG y CHH, siendo H cualquiera de los

nucleótidos A, T o C. La metilación en mCG se mantiene por MET1 pero también está controlada por VIM1 y por DDM1, la metilación en mCHG es mantenida por CMT3 y por KYP y en algunos loci está también controlada por CMT3 y DRM2, la metilación mCHH se mantiene por la ruta RdDM (small RNA-directed DNA methylation) y la metilación de *novo* en los tres contextos se establece generalmente por DRM2 (Miguel y Marum, 2011).

Por lo tanto, el contexto CG implica, para *Hpa*II/*Msp*I, la posibilidad de metilación de la citosina interna en todas sus dianas en cualquiera de las dos cadenas mientras que para *Acc*65I/*Kpn*I se metilaría la citosina externa pero solo cuando exista una guanina siguiendo a su secuencia diana en posición 3' o bien su secuencia diana esté precedida por una citosina en su posición 5', siendo necesario que ocurran ambas situaciones para presentar metiladas las dos cadenas. El contexto CHG implica, para *Hpa*II/*Msp*I, la posibilidad de metilación de la citosina externa en sus dianas en cualquiera de las dos cadenas mientras que para *Acc*65I/*Kpn*I se pueden metilar tanto la citosina interna como la externa según las secuencias situadas en los extremos 5' y 3' de sus secuencias diana, bien en una o en las dos cadenas. Finalmente, el contexto CHH no genera metilación en las secuencias diana para *Hpa*II/*Msp*I mientras que para *Acc*65I/*Kpn*I se pueden metilar tanto la citosina interna como la externa según las secuencias situadas en los extremos 5' y 3' de sus secuencias diana, bien en una o en las dos cadenas. En resumen, los procesos que regulan la metilación de la citosina en los contextos CG y CHG afectan a las secuencias diana de ambas parejas de isoesquizómeros, mientras que el contexto CHH únicamente afecta a las secuencia diana de la pareja *Acc*65I/*Kpn*I.

### 5.2 Detección y polimorfismo de marcadores moleculares metAFLP

El empleo de marcadores metAFLP ha resultado eficaz en este estudio tanto para comparar los niveles de metilación y polimorfismo presentes en los individuos de la población control y en plantas regeneradas obtenidas a partir de individuos de esas mismas poblaciones, como para analizar la variación somaclonal presente en las plantas clónicas obtenidas en las distintas líneas celulares de las tres especies estudiadas. Los marcadores metAFLP son altamente reproducibles y también han sido utilizados en la identificación de cambios a nivel de secuencia nucleotídica y cambios en los patrones de metilación del ADN en plantas regeneradas por cultivo de tejidos de cebada (Bednarek y col, 2007), de *Gentiana pannonica* (Fiuk y col., 2010) y de triticale (Machzczynska y col., 2014b; Machzczynska y col., 2015).

En cuanto al primero de los aspectos, hay que resaltar que en dos de las especies estudiadas, *Arabidopsis* y centeno, el número total de marcadores distintos observados fue claramente superior en la población control que en las plantas regeneradas, mientras que en arroz se obtuvieron valores no significativamente diferentes en ambos grupos. Estas diferencias tuvieron como causa el número de motivos que pueden ser cortados por las endonucleasas a nivel individual, de tal forma que el número total de marcadores por planta fue inferior en las plantas obtenidas por regeneración tanto de *Arabidopsis* como de centeno. Ambas endonucleasas, *Acc65*I y *Kpn*I, individualmente generaron un menor número de fragmentos lo que apunta a que se han producido cambios nucleotídicos que implican la pérdida de dianas, además de cambios hacia estados de metilación que impiden la actuación de estas enzimas.

Al analizar la presencia a nivel individual de los distintos tipos de marcadores metAFLP (11, 01 y 10) queda patente que las diferencias observadas en *Arabidopsis* y centeno tienen un origen diferente en cuanto a los cambios a nivel de metilación. En *Arabidopsis* mostraron diferencias significativas los sitios no metilados (11) y metilados (01) de tal forma que las plantas regeneradas presentaron más sitios metilados y menos sitios no metilados que las plantas de la población original. Este mismo patrón también se observó en los dos grupos de cebadores analizados que diferencian contextos de metilación. Los valores medios estimados de metilación en las plantas regeneradas fueron del 7,50 % usando los marcadores de *Kpn*I y del 7,78 % con el método de Machzczynska y col. (2014 b), frente al 3,2 % en las plantas de la población calculado usando los marcadores de *Kpn*I.

Las plantas regeneradas y transgénicas de *Arabidopsis* se obtuvieron mediante un proceso de organogénesis en dos pasos, pre-incubando explantes de raíz durante poco tiempo en un medio de inducción de callo rico en auxina (CIM) seguido por el cultivo prolongado en un medio de inducción de tallos rico en citoquinina (SIM). Che y col. (2007) identificaron un grupo de genes que son esenciales para la organogénesis de *novo* y que están sobreexpresándose en el medio SIM únicamente si el explante se incubó previamente en CIM. Recientemente, Shemer y col. (2015) han propuesto que la presencia de citoquinina lleva a una dilución en el nivel de metilación del DNA que permite que estos genes respondan en el medio SIM, al comprobar que explantes de raíz de plantas mutantes incapaces de metilar los sitios CHG y CHH e incubados directamente en medio SIM son capaces de regenerar tallos. Proponen que ello es debido a que en el medio SIM la expresión del gen *CMT3,* que codifica para la metiltransferasa que mantiene metilados los sitios CHG durante la replicación del ADN, se reduce a menos de la mitad, por lo que Shemer y col. (2015) consideran que la competencia para la regeneración en *Arabidopsis* está regulada por la metilación en los sitios CHG. Después la metilación del DNA en los sitios CHG debe restablecerse para reprimir los genes que han permitido la organogénesis.

Nuestros resultados indican que los niveles de metilación global presentes en las plantas regeneradas de *Arabidopsis* obtenidas directamente de los explantes son superiores a los que presentan las plantas control de la población. Una posible explicación podría radicar en la presencia en altas concentraciones de auxinas en el medio de enraizamiento usado, en el que las plantas permanecen 30 días después de la obtención de los tallos regenerados, puesto que Shemer y col. (2015) también comprobaron que el gen *CMT3* se sobreexpresa en explantes de *Arabidopsis* hasta tres veces más en presencia de medio rico en auxina. La metilación en el contexto CHG, que es mantenida por *CMT3* (Law y Jacobsen, 2010), sería detectada por los dos grupos de cebadores usados, afectando en uno a la citosina interna (grupo CCGN) y en el otro a la externa (grupo CCWG) por lo que en ambos grupos se esperarían resultados similares, como ha ocurrido en los resultados obtenidos.

En centeno mostraron diferencias significativas los marcadores de tipo 01, correspondientes a sitios metilados, y los de tipo 10, que podrían estar asociados a estados de metilación de la citosina interna de la secuencia diana, presentando las plantas regeneradas, menos sitios metilados que las plantas de la población de origen, al contrario de lo observado en *Arabidopsis.* El análisis de los contextos de metilación también presentó el mismo el mismo patrón de diferencias significativas. El valor medio estimado de metilación para la

plantas regeneradas fue del 18,6 % usando los marcadores de *Kpn*I y de 21,56 % con el método de Machzczynska y col., (2014 b) frente al 30,3 % de las plantas de la población obtenido con los marcadores de *Kpn*I. Hay que resaltar que estos porcentajes medios de metilación son muy similares a los obtenidos por González y col. (2013) para los motivos 5'-CCGG-3' en el mismo cultivar de centeno empleando marcadores MSAP, que fueron del 20,19 % en plantas regeneradas y del 30,28 % para las plantas control, coincidiendo los resultados en cuanto al estado de menor metilación global en la plantas regeneradas respecto a las de la población de origen.

Por su parte, en arroz se observó un menor número medio fragmentos generado por *Acc65*I en las plantas regeneradas que apunta a una mayor presencia de sitios metilados, pero la diferencia con la población control no fue estadísticamente significativa. El valor medio de metilación estimado para las plantas regeneradas fue del 14,2 % (con un rango de variación entre el 10,0 % y el 23,0 %) usando los marcadores de *Kpn*I y del 15,48 % con el método de Machzczynska y col. (2014 b) frente al 9,9 % (con un rango de variación entre el 7,5 y el 14,9 %) de las plantas de la población, lo que indica un aumento global de sitios metilados, al igual que en *Arabidopsis*. Wang y col. (2013) obtuvieron la tasa de metilación con marcadores MSAP para la misma variedad Nipponbare de arroz en plantas obtenidas de semilla, callos y plantas regeneradas, siendo del 14 % en los dos primeros casos y oscilando entre el 13 % y el 15 % en las cuatro plantas regeneradas que analizaron, por lo que apenas detectaron diferencias entre estos grupos.

Las plantas regeneradas de arroz y centeno, a diferencia de las de *Arabidopsis,* fueron obtenidas por embriogénesis somática a partir de embriones cigóticos inmaduros. En ambos casos se obtuvieron callos embriogénicos en medios suplementados con la auxina 2,4-D como paso intermedio, pero los callos de arroz fueron incubados posteriormente durante 5 días en medio RE-III rico en la citoquinina quinetina para la regeneración de plántulas antes de ser pasados a medios de cultivo de enraizamietno libres de reguladores. Por lo tanto el tratamiento con distintos reguladores podría ser una de las causas de los distintos resultados obtenidos ya que Shemer y col. (2015) demostraron los diferentes niveles de expresión de la metiltransferasa *CMT3* de *Arabidopsis* en presencia de auxinas y citoquininas. En este sentido, Xiao y col. (2007) proponen que la metilación del DNA puede estar directa o indirectamente involucrada en la regulación del transporte polar de auxinas durante la embriogénesis temprana, y también Wickramasuriya y Dunwell (2015) sugieren que los niveles elevados de expresión de los genes relacionados con la metilación de citosinas que

observaron en embriones somáticos de *Arabidopsis* pueden estar ligados a las rutas de señalización que tienen lugar durante la embriogénesis in vitro.

Stroud y col. (2013) realizaron una secuenciación con bisulfito (BS-seq) del genoma completo de arroz en varias líneas regeneradas y en plantas control, para obtener la medida de su metilación con una resolución a nivel de nucleótido, que además permite diferenciarla en sus distintos contextos. Sus resultados indican una pérdida significativa de metilación en las plantas regeneradas respecto a las no regeneradas que además fue ampliamente estable a lo largo de las generaciones, siendo una pequeña proporción de sitios del genoma los que son particularmente susceptibles a la pérdida de metilación. Dicho nivel de resolución a nivel genómico no es comparable al obtenido en este trabajo con varios cientos de marcadores metAFLP y quizá la diferencia en los resultados obtenidos en arroz se deba a que no exista una distribución genómica aleatoria de los motivos detectados por metAFLP y no se hayan detectado un número considerable de las regiones caracterizadas por Stroud y col (2013) donde se acumula la pérdida de metilación.

En este sentido Machczynska y col. (2015) observan en triticale que los valores de las estimaciones de metilación global en plantas regeneradas y donantes con marcadores metAFLP son alrededor de la mitad del valor obtenido con análisis por cromatografía líquida de alta resolución RP-HPLC para la 5-metildeoxicitidina, por lo que proponen que es posible que los marcadores metAFLP reflejen diferencias en regiones genómicas particulares en vez de estar distribuidos regularmente a largo del genoma completo. Bednarek y col. (2003) realizaron, en centeno, un mapeo de marcadores AFLP descubriendo que no se distribuían regularmente por los cromosomas, sino que formaban clusters de marcadores estrechamente ligados. Sin embargo, Wang et al. (2013) comprobaron que las alteraciones genéticas detectadas con marcadores AFLP y epigenéticas detectadas con marcadores MSAP en plantas regeneradas de arroz se distribuyen aleatoriamente entre los cromosomas de esta especie. En cualquier caso, la estimación de metilación global con marcadores metAFLP puede estar además afectada por potenciales imprecisiones en la interpretación del comportamiento de las endonucleasas utilizadas, como se discutió anteriormente.

Una mayor tasa de metilación como consecuencia del cultivo de tejidos se ha descrito en tomate (Smulders y col., 1995), mirto (Parra y col., 2001), guisante Smykal y col. 2007), en banano (Peraza-Echeverría y col., 2001) y en *Gentiana pannonica* (Fiuk y col., 2010). En otras especies no se han observado diferencias en los niveles de metilación como en

*Codonopsis lanceolata* (Guo y col., 2007), guisante (Smykal y col. 2007) o *Gardenia jasminoides* (Wu y col., 2012). Por el contrario, se ha descrito un descenso en los niveles de metilación asociado al cultivo de tejidos en otras plantas como soja (Quemada y col., 1987), maíz (Kaeppler y Phillips 1993), palma (Matthes y col., 2001), rosa (Xu y col., 2004), cebada silvestre (Li y col., 2007) y triticale (Machczynska y col., 2015). En *Arabidopsis* también se ha descrito un descenso de metilación en callos desdiferenciados analizando el motivo 5'-CCGG-3', descenso que se ha visto incrementado por la presencia de kanamicina y dependiente de su dosis (Bardini y col., 2003). En nuestro caso hemos observado en *Arabidopsis* y arroz una mayor metilación pero en un motivo distinto (5´-GGTACC-3') y en plantas regeneradas y no se ha observado diferencias significativas entre las plantas regeneradas y las pantas transgénicas que han pasado por cultivo con kanamicina. Por lo tanto, el comportamiento del estado de metilación a nivel global es diferente en distintas especies y pude estar influida tanto la técnica de cultivo empleada como el fondo genético de las plantas empleadas (Wang y col. 2013; Machczynska y col. 2015).

El análisis separado de las diferencias en los patrones de metilación según el contexto es particularmente interesante porque las alteraciones en su estado de metilación dependen de diferentes familias de metiltransferasas y, por tanto, podrían ser reguladas de forma independiente (Finnegan 2010). Dependiendo de la especie, la ocurrencia de la metilación según el contexto puede variar. Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana*, respecto a los niveles de metilación de ADN a escala genómica revelaron que aproximadamente el 24%, 6,7% y 1,7% de las secuencias CG, CHG y CHH presentan metilación, respectivamente (Cokus y col., 2008). Estos valores son muy próximos a los que fueron calculados posteriormente por Feng y col. (2010) de 22,3 %, 55,92 % y 1,51 % de las secuencias CG, CHG y CHH metiladas. En el arroz, el ADN está metilado en los tres contextos (CG, CHG, CHH), con niveles muy altos de metilación CG (59,4 %), moderados en CHG (20,7 %) y niveles muy bajos (2,18 %) en CHH (Feng y col., 2010).

En nuestro estudio, los cambios en el contexto CG se verán reflejados en los marcadores metAFLP que hemos obtenido con los cebadores del grupo CCNG y los cambios en el contexto CHH en los marcadores del grupo CCWG, pero los cambios en el contexto CHG afectan a ambos grupos (en distintas citosinas de la secuencia diana de las endonucleasas utilizadas) por lo que no pueden cuantificarse y además pueden compensar los que ocurran en los otros dos contextos. Por ello, en este trabajo no se ha asignado la variación observada en los marcadores de cada grupo de cebadores a contextos de metilación específicos. En

cualquier caso, nuestros resultados revelaron diferencias entre la población control y las líneas celulares regeneradas en ambos grupos de cebadores usados, tanto en *Arabidopsis* como en centeno, mientras que en arroz las diferencias no fueron significativas. También se observó un mayor porcentaje de polimorfismo en los marcadores del grupo CCGN tanto entre plantas control como en las líneas celulares, que se corresponde con la detección de los contextos CG y CHG que son los que acumulan la mayor frecuencia de sitios metilados en Arabidopsis y arroz (Feng y col., 2010). Las pérdidas de metilación observadas en plantas regeneradas de arroz por Stroud y col. (2013) se localizaron en los tres contextos, estando asociada la pérdida en CG con la pérdida en el contexto CHG y en menor medida en el contexto CHH.

En cuanto a la variación somaclonal presente en las plantas clónicas obtenidas en las distintas líneas celulares de las tres especies estudiadas, hay que destacar que el principal componente es genético más que epigenético. Esta conclusión está avalada tanto por el porcentaje de marcadores metAFLP polimórficos que pueden ser asignados específicamente a cambios de metilación, como por los porcentajes de cada tipo de variación calculados con la metodología de Machzczynska y col., (2014 b). Este resultado coincide con el obtenido en arroz por Wang y col. (2013) quienes analizaron en las mismas muestras marcadores AFLP para el componente genético y marcadores MSAP para el epigenético. Sin embargo, en otras especies estudiadas con AFLP y MSAP se encontraron frecuencias similares para ambos tipos de variaciones, como en sorgo (Zhang y col., 2009) y maíz (Yu y col, 2011) por lo que Wang y col. (2013) proponen que las alteraciones genéticas y epigenéticas no están acopladas y, por tanto, están controladas por distintos mecanismos, como también corroboraron los análisis de expresión de genes involucrados en la reparación y metilación del ADN que realizaron en dicho estudio.

Los valores medios de porcentaje de motivos 5´-GGTACC-3’ afectados por el cultivo de tejidos, calculados con la metodología de Machzczynska y col. (2014 b), fueron similares en arroz (9,18 %) y centeno (8,96 %) y bastante menor en *Arabidopsis* (3,97 %). Los valores en arroz y centeno fueron próximos al obtenido por Bednarek y col. (2007) en cebada (7,0 %) aunque todos ellos son inferiores a los obtenidos en *Gentiana pannonica* (15,7 %, Fiuk y col., 2010) y en triticale (19,0 %, Machczynska y col. 2014b; 29,1 %, Machczynska y col. 2015), valores que fueron calculados con la misma metodología empleando marcadores metAFLP. En plantas regeneradas de centeno, se ha descrito un porcentaje del 2,90 % de marcadores ISSR polimórficos en (Linacero y col. 2011) y del 9,01 % de marcadores MSAP (González y

col. 2013) que es un valor prácticamente idéntico al obtenido con metAFLP en centeno y arroz.

En las distintas especies que han sido analizadas con marcadores metAFLP hasta la fecha existen diferencias, en cuanto al reparto de la variación detectada, entre cambios de secuencia y sitios afectados por cambios de metilación. Nuestros resultados respectivos son en *Arabidopsis* de 2,3 % frente a 1,7 %, en arroz de 4,7 % frente a 4,5 % y en centeno de 5,7 % frente a 3,2 %. En triticale también se ha observado mayor frecuencia de cambios de secuencia (11, 4 % frente a 7, 6 %, Machczynska y col. 2014b; 19,2 % frente a 10,6 %, Machczynska y col. 2015) mientras que en cebada ha sido al contrario (1,7 % frente a 3,5 %, Bednarek y col., 2007) y en *Gentiana pannonica* la diferencia ha sido muy pequeña (3,3 % frente a 3,5 %, Fiuk y col., 2010). Wang y col. (2013) comprobaron en arroz que las alteraciones genéticas detectadas con marcadores AFLP fueron prevalentes respecto a las alteraciones epigenéticas detectadas con marcadores MSAP. Sin embargo, en centeno la gran mayoría de las variaciones observadas con marcadores MSAP se atribuyeron a cambios en el estado de metilación (González y col. 2013).

En todas las líneas celulares de las tres especies analizadas en este trabajo, se han observado cambios en las plantas regeneradas que implican tanto ganancias como pérdidas de grupos metilo, respecto al estado más frecuente de las plantas clónicas de la misma línea, y aunque a nivel de planta individual se presentaron todas las situaciones posibles, al considerarlas en conjunto fue mayor la proporción de ganancias respecto a la de pérdidas de metilación. En concreto en *Arabidopsis* el valor medio de sitios que perdieron metilación fue del 0,55 % frente al 1,14 % de sitios metilados *de novo*, en arroz fue del 1,18 %% frente al 3,31 % y en centeno fue del 1,22 % frente al 2,00 %, respectivamente. También se había detectado con marcadores MSAP en centeno un mayor número de cambios que implican ganancia de metilación que de cambios de pérdida de metilación comparando individuos de la misma línea celular (González y col. 29013), a pesar de que las plantas regeneradas presentaban una tasa global de metilación menor que las plantas control. A este respecto hay que tener en cuenta que se ha comparando entre plantas ya regeneradas de una misma línea celular y no directamente con el explante del que proceden cada una de ellas, por lo que es posible que exista una distribución heterogénea de las citosinas metiladas en una de las cada planta regeneradas que daría lugar a los resultados obtenidos. Así, Stroud y col. (2013) indican que los resultados de su mapeo de secuenciación con bisulfito del genoma de arroz sugieren que cada planta regenerada presenta un patrón distinto de metilación del ADN a

pesar de provenir de un mismo origen y que el cultivo de tejidos induce cambios de metilación de forma estocástica afectado a cada planta individual de manera diferente.

A pesar de estas diferencias a nivel de planta individual, también se ha descrito un comportamiento no aleatorio de la variación somaclonal a lo largo de los genomas en distintas especies, existiendo regiones que son más propensas a acumular los cambios. Esa distribución no aleatoria se ha descrito en estudios con marcadores moleculares en centeno (Linacero y col., 2011; González y col., 2013), cebada (Bednarek y col. 2007), lúpulo (Peredo y col. 2006), sorgo (Zhang y col. 2009), Gentiana pannonica (Fiuk y col. 2010) y arroz (Shan y col. 2012) y también en estudios de secuenciación masiva del genoma de plantas regeneradas de *Arabidopsis* (Jiang y col. 2011) y arroz (Stroud y col., 2013). Los resultados obtenidos en el presente trabajo indican la presencia en las tres especies estudiadas de una alta frecuencia de marcadores polimórficos compartidos entre las plantas regeneradas de una misma línea celular y una baja frecuencia de marcadores que se presentaron como polimórficos en una única planta regenerada. Por lo tanto, aunque cada planta presenta un patrón distinto de variación como proponen Stroud y col. (2013), también poseen zonas genómicas donde se acumulan cambios que comparten varias plantas regeneradas incluso procedentes de distintas líneas celulares.

Es de destacar que en ninguna de las especies analizadas en este trabajo se observaron diferencias significativas entre las plantas regeneradas y transgénicas en cuanto al análisis de sus marcadores metAFLP. De forma similar Stroud y col. (2013) proponen que los cambios en la metilación del ADN que observan en plantas regeneradas no transformadas y en regeneradas transgénicas de arroz están causadas por el paso del cultivo *in vitro* y no se deben al proceso de transformación. En estudios previos Labra y col. (2004) empleando marcadores AFLP y RAMP (Random Amplified Microsatellite Polymorphism), detectaron que los cambios a nivel de ADN en plantas control y plantas transgénicas de *Arabidopsis*, obtenidas sin usar procesos de cultivo *in vitro*, resultaron similares y con una frecuencia baja, pero que en las plantas regeneradas resultaron más frecuentes. Sin embargo, Bednarek y col. (2007) indican que el modo de regeneración no tiene efecto significativo respecto a los cambios de secuencias y cambio en el estado de metilación inducida por el cultivo de tejidos, comparando los resultados obtenidos con marcadores metAFLP en plantas de cebada regeneradas por androgénesis y por embriogénesis somática. De esta forma sugieren que dicho planteamiento contradice la afirmación de que las plantas regeneradas que no pasen por una fase de callo son menos propensos a la variación somaclonal en comparación con las obtenidas después de una

fase de callo, necesaria en la obtención de plantas transformadas con *Agrobacterium*. También en *Freesia hybrida* (Gao y col., 2010) y en triticale (Machczynska y col. 2015) se han observado valores similares en los cambios de secuencia y de metilación para procesos de regeneración directa y de regeneración indirecta pasando por un estado de callo.

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan nuevas evidencias respecto a que se producen cambios a nivel de secuencia nucleotídica y de estado de metilación en los genomas de *Arabidopsis*, arroz y centeno durante el cultivo *in vitro* de tejidos con una frecuencia lo suficientemente alta como para ser una fuente importante de variación en estas especies.

### 5.3 Detección y polimorfismo de marcadores moleculares TMD

El empleo de marcadores TMD (*transposon methylation display*) basados en la metodología descrita por Takata y col. (2007), resultó eficaz para analizar el estado de metilación de secuencias cercanas a elementos transponibles (TE) de la población control y en plantas regeneradas y transformadas en *Arabidopsis* y arroz. Estos marcadores han sido utilizados anteriormente con éxito para el análisis de elementos transponibles (TE) y cambios en los patrones de metilación del ADN (Takagi y col., 2007; Gao y col., 2009; Kantama y col., 2013; Azman y col., 2014).

El número total de marcadores detectado es proporcional al de sitios 5´-GGCC-3´ que no se encuentran completamente metilados flanqueando a los TE en estudio. Este valor mostró una tendencia diferente en *Arabidopsis* y arroz. Mientras que en *Arabidopsis* las plantas regeneradas presentaron un mayor número de sitios no completamente metilados que la plantas control, en arroz no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos. En ninguna de las dos especies analizadas se observaron diferencias significativas entre las plantas regeneradas y transgénicas en cuanto al número de marcadores TMD o el polimorfismo que presentaron cada uno de estos grupos de plantas.

En *Arabidopsis* se obtuvo un considerable mayor número de marcadores para los TE *copia* y *TRIM* que para *gypsy* y *SINE* por lo que únicamente fue posible realizar el análisis independiente para los marcadores de los dos primeros. Comparado con otras especies vegetales, la proporción de TEs en en genoma de *Arabidopsis* es baja, aproximadamente un 10 % (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), pero esta baja proporción no se debe a la falta de diferentes familias de TE ya que en *Arabidopsis* se encuentran todas las familias de

TE conocidas en las plantas (Joly-Lopez y Bureau, 2014), sino que es debido al bajo número de copias para cada una de estas familias de TE (Ito y Kakutani, 2014).

Las diferencias observadas a nivel global entre las plantas regeneradas y las control también se detectaron individualmente para las regiones próximas a los TE *copia* y *TRIM*. Por lo tanto, estos resultados en obtenidos en *Arabidopsis* indican que a diferencia de la mayor tasa de metilación global detectada con los marcadores metAFLP en las plantas regeneradas respecto a las control, se detectó una mayor presencia de motivos no completamente metilados y también de motivos no metilados en proximidad a diferentes TEs. Además, comparando los marcadores entre las plantas regeneradas de la misma línea celular, se observaron todos los tipos de variación en el motivo 5'-CCGG-3' tanto de ganancia de grupos metilo en la citosina interna, pérdida en la citosina interna, ganancia de hemimetilación en la citosina externa, pérdida de hemimetilación en la citosina externa como de procesos de ganancia y pérdida simultánea en cada una de las citosinas, todos ellos en frecuencias muy bajas y con valores próximos distribuidos heterogéneamente entre las plantas regeneradas de una misma línea celular.

Muchos de los TEs de plantas presentan una alta metilación tanto en los sitios CG como en los no-CG (Cokus y col., 2008; Lister y col. 2008) y la importancia de la metilación en el control de los TE se ha demostrado directamente usando mutantes para los genes relacionados con el establecimiento y mantenimiento de la metilación del ADN. Así, se ha demostrado en mutantes de *Arabidopsis* que presentan una metilación genómica reducida que una variedad de TE pasan a estar desreprimidos y movilizados (Singer y col., 2001; Miura y col., 2001; Kato y col., 2003; Lippman y col., 2004; Tsukahara y col., 2009; Mirouze y col., 2009). Se ha comprobado que algunos TEs como *COPIA93*/*EVADE* y *VANDAL21*/*Hiun* se movilizan en mutantes MET1, la metiltransferasa que mantiene la metilación en sitios CG (Mirouze y col., 2009; Tsukahara y col., 2009), mientras que otros como *CACTA* y *GYPSY3* necesitan de dobles mutaciones en *MET1* y CMT3 (metiltransferasa para sitios no-CG) para su movilización, lo que sugiere que tanto la metilación en CG como en sitios no-CG está involucrada en su inmovilización en Arabidopsis (Kato y col.,. 2003; Tsukahara y col., 2009). La secuencia diana de las endonucleasas utilizadas para la obtención de los marcadores TMD se ve afectada por ambos tipos de metilación, reflejando un descenso en la metilación global de ambos contextos de metilación.

Sin embargo, el estudio de varias líneas de plantas regeneradas de Arabidopsis realizado por Jiang y col. (2011) detectó un amplio espectro de cambios moleculares como sustituciones de bases, inserciones y deleciones, de tal forma que proponen que la mayor causa de la variación somaclonal de las líneas de plantas regeneradas estudiadas son la sustitución de bases, mientras que la movilidad de los transposones es muy improbable que contribuya sustancialmente a dicha variación. Esta conclusión se basa en los datos de secuenciación masiva del genoma de cinco plantas regeneradas R1, analizados para la presencia de varias clases de transposones como *CACTA*, *COPIA*, *gypsy*, *hAT*, no-LTR que determinó la ausencia de transposiciones detectables.

En arroz no se observaron diferencias significativas en los marcadores TMD entre las plantas de la población control y las plantas de las distintas líneas de plantas regeneradas y transgénicas en cuanto al número total de marcadores detectados que implican la presencia de sitios no metilados o parcialmente metilados. El análisis individualizado para cada uno de los TE analizdos (*Tos17*, *Karma*, *nDart* y *mPing*) tampoco presentó diferencias entre ambos grupos de plantas. La tasa de polimorfismo también fue similar en ellos siendo un bajo porcentaje de los marcadores polimórficos el que se pudo asignar específicamente a cambios de estado de metilación, aunque en este caso si que fue mayor en las plantas regeneradas el porcentaje de marcadores polimórficos debidos a cambos de metilación. Comparando los marcadores entre las plantas regeneradas de la misma línea celular, se observaron casi todos los tipos de variación en el motivo 5'-CCGG-3' que implican ganancias o pérdidas de grupos metilo en la citosina interna o en la citosina externa, todos ellos en frecuencias bajas y distribuidos heterogéneamente entre las distintas plantas de una misma línea celular.

En arroz, el 35 % del genoma está constituido por TEs (International Rice Genome Sequencing Project 2005) y entre ellos los MITEs son numéricamente predominantes, constituyendo el 8,6 % del genoma (Chen y col. 2012). *Miniature Ping* (*mPing*) de 0,43 Kb fue el primer MITE activo identificado en el genoma de arroz y su número de copias permanece a un bajo nivel en la mayoría de los cultivares, con menos de 10 copias en los cultivares de *japonica* tropicales e *indica* y un número aproximado de 50 copias en los cultivares de clima templado de *japonica* aunque para Nipponbare, la variedad empleada en este trabajo, es valor estimado es de 70 copias (Jian y col., 2003). El número medio de marcadores TMD detectado por planta para *mPing* ha sido de 35,5 en la plantas control y de 34,5 en las regeneradas y transgénicas, comprobando que más del 76 % de los motivos 5'-CCGG-3' de cada planta situados en proximidad a *mPing* no están metilados (marcadores tipo

11). Aunque la transposición de *mPing* esta suprimida en la mayoría de los cultivares de arroz, se ha comprobado que puede ser activada en condiciones de estrés como el cultivo de tejidos (Jian y col., 2003; Kikuchi y col. 2003), irradiación con rayos gamma (Nakazaki y col. 2003) o altas presiones hidrostácticas (Lin y col. 2006). Además, existen líneas como *japonica* EG4 donde *mPing* se transpone activamente durante la embriogénesis sin la presencia de estrés (Teramoto y col. 2014). La baja metilación detectada para *mPing* en las plantas regeneradas y transgénicas de arroz obtenida en este trabajo podría posibilitar la activación de *mPing*.

Los transposones *Tos17* y *Karma* también pueden activarse durante el cultivo de tejidos. *Tos17* presenta un tamaño de 4,1 kb y su número de copias es muy bajo, entre una y cinco dependiendo del cultivar. Nipponbare presenta únicamente dos copias por genoma haploide pero Hirochika y col. (1996) comprobaron que el número de copias de *Tos17* se incrementa con los periodos prolongados de cultivo detectando entre 5 y 30 copias en plantas regeneradas y transgénicas de la variedad Nipponbare. El número de marcadores TMD detectado a nivel individual en el presente trabajo ha oscilado entre 3 y 19 que corresponderían a copias en las que los motivos 5'-CCGG-3' próximos no están completamente metilados. En concreto el porcentaje de sitos detectados como no metilados ha oscilado entre 25 % y 100%. En las plantas de la población se han detectado entre 9 y 18 marcadores TMD, por lo que aparentemente cada copia de *Tos17* genera más de un marcador, quizá debido a la no completa digestión del ADN en determinados estados de metilación por las endonucleasas utilizadas, como se comentó anteriormente.

*Karma* es un retrotransposon de tipo LINE que también se activa por el cultivo de tejidos bajo hipometilación del ADN (Komatsu y col. 2003). En la variedad *japonica* cv. Nipponbare se ha establecido que presenta una copia completa y otras nueve copias truncadas en su extremo 5'. Komatsu y col. (2003) no detectaron un incremento de copias en las células cultivadas ni en las hojas de plantas R0 regeneradas a partir de ellas. Sin embargo si que observaron un incremento bien en plantas de la R1 en unas líneas celulares o en plantas de la R2 en otras líneas celulares. Además comprobaron que las propias secuencias de *Karma* presentaban unos niveles de metilación más bajos en las células cultivadas y en las plantas regeneradas que en las plantas control. En el presente trabajo se han analizado plantas R0 y no se han observado diferencias en el número de marcadores TMD entre plantas control y regeneradas que hubieran reflejado diferencias de metilación en las regiones flanqueantes y no en la propia secuencia de *Karma*.

El elemento *nDart* de 0,6 kb es otro de los transposones endógenos activos en arroz que pertenece a la familia *hAT*. En el genoma del cultivar Nipponbare se han encontrado 18 copias de secuencias relacionadas con *nDart* y aproximadamente otras 60 copias de otros elementos relacionados pero mayores de 2 kb, de los que algunos codifican para transposasas putativas (Tsugane y col., 2006). Hasta la fecha no se ha descrito activación de este transposon por cultivo de tejidos. Nuestros resultados muestras un número de marcadores TMD entre 3 y 15 para la mayor parte de las plantas analizadas, con la excepción de dos plantas regeneradas que mostraron valores muy elevados de 27 y 38 marcadores, lo que implica una mayor presencia en ellas de motivos no completamente metilados en proximidad a las copias de *nDart*.

En cualquier caso, hay que tener en cuenta que el análisis realizado por Takata y col. (2007) de caracterización del estado de metilación que flaquea a 12 familias de TE en arroz, determinó que en la vecindad de los retrotransposones tiende a presentarse una mayor tasa de metilación que en los propios transposones por lo que no pudieron correlacionar el número de copias y el grado de conservación de las familias de TE con el estado de metilación de las regiones que los rodean. Aunque demostraron que las familias de TE presentes en el genoma de arroz pueden ser caracterizadas por el estado de metilación de sus zonas flanqueantes, siendo características de cada TE.

# CONCLUSIONES

## 6. CONCLUSIONES

**1.** Se han empleado por primera vez los marcadores metAFLP en las especies *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh, arroz (*Oryza sativa* L.) y centeno (*Secale cereale* L.), siendo eficaces tanto para comparar los niveles de metilación y polimorfismo presentes en los individuos de la población control y en plantas regeneradas obtenidas a partir de individuos de esas mismas poblaciones, como para analizar la variación somaclonal presente en las plantas clónicas obtenidas en las distintas líneas celulares de las tres especies estudiadas.

**2.** En cuanto a los niveles de metilación, las tres especies han presentado distintos resultados al comparar las plantas obtenidas por regeneración con las de la población control. En *Arabidopsis* las plantas regeneradas presentaron más sitios metilados y menos sitios no metilados, en arroz no se observaron diferencias estadísticamente significativas y en centeno las plantas regeneradas presentaron menos sitios metilados.

**3.** Las diferencias a nivel de secuencia nucleotídica son el principal componente del polimorfismo detectado entre las plantas de la población control con una menor incidencia de los patrones de metilación, mientras que en las plantas obtenidas por regeneración los polimorfismos de metilación son un componente con más importancia en la variación observada.

**4.** El componente principal de la variación somaclonal presente en las plantas clónicas obtenidas por regeneración en las distintas líneas celulares de las tres especies estudias es más a nivel de cambios nucleotídicos que de modificaciones en el estado de metilación.

**5.** En todas las líneas celulares de las tres especies analizadas en este trabajo, se han observado cambios en las plantas regeneradas que implican tanto ganancias como pérdidas de grupos metilo, respecto al estado más frecuente de las plantas clónicas de la misma línea, y aunque a nivel de planta individual se presentaron todas las situaciones posibles, al considerarlas en conjunto fue mayor la proporción de ganancias respecto a la de pérdidas de metilación.

**6.** En el análisis del estado de metilación en el entorno de distintos elementos transponibles mediante marcadores TMD, se han obtenido distintos resultados para *Arabidopsis* y arroz. En

**7.** *Arabidopsis* las plantas regeneradas presentaron un mayor número de sitos metilados parcialmente o sin metilación que las plantas control, mientras que en arroz no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

**8.** Se ha observado un mayor porcentaje de variabilidad en marcadores TMD debida a cambios de metilación en las plantas obtenidas por regeneración que en las plantas de la población de origen, tanto para *Arabidopsis* como para arroz.

**9.** El análisis de marcadores metAFLP y TMD no ha revelado diferencias significativas entre los grupos de plantas regeneradas y plantas transgénicas en ninguno de los aspectos contemplados, tanto en *Arabidopsis* como en arroz.

# BIBLIOGRAFÍA

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Adkins S, Kunanuvatchaidach R, Godwin I (1995) Somaclonal Variation in Rice- 2 Drought Tolerance and Other Agronomic Characters. Aust J Bot 43: 201-209

Akash MW, Shiyab SM, Saleh MI (2013) Yield and AFLP Analyses of Inter-Landrace Variability in Okra (*Abelmoschus esculentus* L.). Life Sci J 10: 2771- 2779

Allard RW, Bradshaw A (1964) Implications of genotype-environmental interactions in applied plant breeding. Crop Sci 4: 503-508

Alonso GM (2004) Biotecnología aplicada a la mejora de" pelargonium". (Tesis Doctoral). Universidad Complutense de Madrid, España

Altmann T, Damm B, Frommer WB, Martin T, Morris PC, Schweizer D, Willmitzer L, Schmidt R (1994) Easy determination of ploidy level in *Arabidopsis thaliana* plants by means of pollen size measurement. Plant Cell Rep 13: 652-656

Alves E, Ballesteros I, Linacero R, Vazquez A (2005) *RYS1*, a foldback transposon, is activated by tissue culture and shows preferential insertion points into the rye genome. Theor Appl Genet 111: 431-436

Al-Zahim M, Ford-Lloyd B, Newbury H (1999) Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. Plant Cell Rep 18: 473-477

Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 96-815

Read PE, Preece JE (2001) Molecular identification of micropropagated plants. In I International Symposium on Acclimatization and Establishment of Micropropagated Plants 616: 25-47

Ashikawa I, Fukuta Y, Tamura K, Yagi T (1999) Application of AFLP technique that uses non-radioactive fluorescent primers to the detection of genetic diversity in Japanese rice cultivars and cloning of DNA sequences derived from an Indica genome. Breed Sci 49: 225-231

Azman A, Mhiri C, Grandbastien M, Tam S (2014) Transposable elements and the detection of somaclonal variation in plant tissue culture. Malayas Appl Biol 43: 1-12

Bairu MW, Aremu AO, Van Staden J (2011) Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regul 63: 147-173

Ballesteros I, Linacero R, Vázquez AM (2009) Mitochondrial DNA amplification in albino plants of rye (*Secale cereale* L.) regenerated *in vitro*. Plant Sci 176: 722-728

Barkla BJ, Vera-Estrella R, Pantoja O (2014) Growing *Arabidopsis in vitro*: cell suspensions, in vitro culture, and regeneration. Methods Mol Biol 1062: 53-62

Barros Fernández P (2014) Organismos modificados genéticamente en la alimentación humana. (Tesis de Grado). Universidad de Valladolid. Valladolid, España

Bayram E, Yilmaz S, Hamat-Mecbur H, Kartal-Alacam G, Gozukirmizi N (2012) Nikita retrotransposon movements in callus cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Omics 5: 211-215

Bednarek PT, Orlowska R, Koebner RMD, Zimny J (2007) Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). BMC Plant Biol 7: 10

Bertin P, Bouharmont J (1997) Use of somaclonal variation and *in vitro* selection for chilling tolerance improvement in rice. Euphytica 96: 135-142

Bevan M, Walsh S (2005) The Arabidopsis genome: a foundation for plant research. Genome Res 15: 1632-1642

Birch RG (1997) Plant transformation: problems and strategies for practical application. Annu Rev Plant Biol 48: 297-326

Boavida LC, McCormick S (2007) TECHNICAL ADVANCE: Temperature as a determinant factor for increased and reproducible in vitro pollen germination in *Arabidopsis thaliana*. Plant J 52: 570-582

Bolibok-Br H, Bolibok L, Kilian A, Rakoczy-Trojanowska M (2014) Genome-wide characterization of genetic diversity and population structure in *Secale*. BMC Plant Biol 14: 184

Braun AC (1959) A Demonstration of the recovery of the crown-gall tumor cell with the use of complex tumors of single-cell origin. Proc Natl Acad Sci USA 45: 932-938

Briard M, Le Clerc V, Grzebelus D, Senalik D, Simon P (2000) Modified protocols for rapid carrot genomic DNA extraction and AFLP™ analysis using silver stain or radioisotopes. Plant Mol Biol Rep 18: 235-241

Butt SJ, Varis S, Nasir IA, Sheraz S, Shahid A (2015) Micro Propagation in Advanced Vegetable Production: A Review. Adv Lif Csi 2: 48-57

Cañal M, Fraga M, Berdasco M, Diego L, Esteller M, Rodríguez R (2003) Epigenetics, the role of DNA methylation. Curr T Plant Biol 4: 193-206

Capy P (2005) Classification and nomenclature of retrotransposable elements. Cytogenet Genome Res 110: 457-461

Cardone S, Olmos S y Echenique V (2010) Variación Somaclonal. En Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II, G. Levitus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp y L. Mroginski (Eds.) Parte II, Cap. 5: 229-241. Ediciones INTA, Buenos Aires, Argentina

Casa AM, Brouwer C, Nagel A, Wang L, Zhang Q, Kresovich S, Wessler SR (2000) The MITE family Heartbreaker (Hbr): Molecular markers in maize. Proc Natl Acad Sci USA 97: 10083-10089

Casa A, Mitchell S, Smith O, Register J, Wessler S, Kresovich S (2002) Evaluation of Hbr (MITE) markers for assessment of genetic relationships among maize (*Zea mays* L.) inbred lines. Theor Appl Genet 104: 104-110

Cassells AC, Kowalski B, Fitzgerald DM, y Murphy GA (1999) The use of image analysis to study developmental variation in micropropagated potato (*Solanum tuberosum* L.) plants. Potato Res 42: 541-548

Castiglioni P, Ajmone-Marsan P, Van Wijk R, Motto M (1999) AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group ditsribution. Theor Appl Genet 99: 425-431

Catterou M, Dubois F, Smets R, Vaniet S, Kichey T, Van Onckelen H, Sangwan-Norreel BS, Sangwan RS (2002) hoc: an *Arabidopsis* mutant overproducing cytokinins and expressing high *in vitro* organogenic capacity. Plant J 30: 273-287

Cervera MT, Ruiz-Garcia L, y Martinez-Zapater J. (2002). Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. Mol Genet Genomics 268: 543-552

Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE (2005) Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Nat Rev Genet 6: 351-360

Chée R, Pool RM (1982) The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of *Vitis* cultured *in vitro*. Sci Hortic Amsterdan 16: 17-27

Che P, Lall S y Howell S. H. (2007). Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. Planta, 226: 1183-1194

Chen J, Lu C, Zhang Y, Kuang H (2012) Miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) in rice were originated and amplified predominantly after the divergence of *Oryza* and *Brachypodium* and contributed considerable diversity to the species. Mob Genet Elements 2: 127-132

Chen M, Yuan Z, Huang H (2006) *DELAYED FLOWERING*, an *Arabidopsis* gene that acts in the autonomous flowering promotion pathway and is required for normal development. J Integr Plant Biol 48: 27-34

Chen W, Chen T, Fu Y, Hsieh R, Chen W (1998) Studies on somaclonal variation in *Phalaenopsis*. Plant Cell Rep 18: 7-13

Chwedorzewska KJ, Bednarek PT (2012) Genetic and epigenetic variation in a cosmopolitan grass *Poa annua* from Antarctic and Polish populations. Pol Polar Res. 33: 63–80

Chilton M, Currier TC, Farrand SK, Bendich AJ, Gordon MP, Nester EW (1974) *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. Proc Natl Acad Sci USA 71: 3672-3676

Cho Y, Blair M, Panaud O, McCouch S (1996) Cloning and mapping of variety-specific rice genomic DNA sequences: Amplified fragment length polymorphisms (AFLP) from silver-stained polyacrylamide gels. Genome 39: 373-378

Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. Nature 452: 215-219

Cuadrado A, Jouve N (2002) Evolutionary trends of different repetitive DNA sequences during speciation in the genus *Secale*. J Hered 93: 339-345

De Candolle A (1883) Origine des plantes cultivées. Ed. Librairie Germer-Baillière et Cie, Paris, Francia, 385 p

De Jaramillo EH (2005). Transformación genética de plantas para resistencia a virus. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales: publicación del Ministerio de Educación Nacional 29: 110-113

De la Puente R, González AI, Ruiz ML, Polanco C (2008) Somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers. In Vitro Cell & Dev Pl 44: 419-426

Delatorre CA, Silva AAd (2008) *Arabidopsis thaliana*: uma pequena planta um grande papel. Rev Cienc Agr 31: 58-67

Devos K, Gale M (2000) Genome relationships: The grass model in current research. Plant Cell 12: 637-646

Ding J, Jia J, Yang L, Wen H, Zhang C, Liu W, Zhang D (2004) Validation of a rice specific gene, sucrose phosphate synthase, used as the endogenous reference gene for qualitative

and real-time quantitative PCR detection of transgenes. J Agric Food Chem 52: 3372-3377

Dogbe SY (1990) Somaclonal variation in rice – La variation somaclonale chez le riz. Contraintes liées à la riziculture d'altitude et amélioration variétale. Bouharmont J, Tilquin J (Eds.). Université Catholique de Louvain, Bélgica, pp 11-18.

Duclercq J, Assoumou Ndong Y, Guerineau F, Sangwan R, Catterou M (2011) *Arabidopsis* shoot organogenesis is enhanced by an amino acid change in the ATHB15 transcription factor. Plant Biology 13: 317-324

Ellis T, Poyser S, Knox M, Vershinin A, Ambrose M (1998) Polymorphism of insertion sites of *Ty1-copia* class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. Mol Gen Genet 260: 9-19

Engelborghs I, Swennen R, Sagi L (2000) Fluorescent AFLP analysis on azacytidine and gibberellin treated banana (*Musa* spp.) plants to assess differences in cytosine methylation and the mecanism of dwarfism. Fourteenth Forum for Applied Biotechnology, Brugge, Belgium, 27-28 September 2000. Proceedings part II. Med Fac Landbouww Univ Gent 65: 387-396

FAOSTAT. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (Database). Fecha de acceso (08 Abr 2015). URL: http://faostat3.fao.org/

Feng S, Cokus SJ, Zhang X, Chen PY, Bostick M, Goll MG, y col. (2010). Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. Proc Natl Acad Sci USA 107: 8689-8694

Feschotte C, Swamy L, Wessler SR (2003) Genome-wide analysis of mariner-like transposable elements in rice reveals complex relationships with stowaway miniature inverted repeat transposable elements (MITEs). Genetics 163: 747-758

Feuser S, Meler K, Daquinta M, Guerra M, Nodari R (2003) Genotypic fidelity of micropropagated pineapple (*Ananas comosus*) plantlets assessed by isozyme and RAPD markers. Plant Cell Tiss Org 72: 221-227

Figueiras AM, Elorrieta MA, Benito C (1991) Genetic and cytogenetic maps of chromosomes 1R, 4R, and 7R in cultivated rye (*Secale cereale*). Genome 34: 681-685

Finnegan DJ (1989) Eukaryotic transposable elements and genome evolution. Trends genet 5: 103-107

Finnegan EJ, Peacock WJ, Dennis ES (2000) DNA methylation, a key regulator of plant development and other processes. Curr Opin Genet Dev 10: 217-223

Fiuk A, Bednarek P, Rybczyński J (2010) Flow Cytometry, HPLC-RP, and metAFLP Analyses to Assess Genetic Variability in Somatic Embryo-Derived Plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. Plant Mol Biol Rep 28: 413-420

Flavell AJ, Knox MR, Pearce SR, Ellis T (1998) Retrotransposon-based insertion polymorphisms (RBIP) for high throughput marker analysis. Plant J 16: 643-650

Fras A, Maluszynska J (2003) Regeneration of diploid and tetraploid plants of *Arabidopsis thaliana* via callus. Acta Bot Cracoviensia 45: 145-152

Fras A, Maluszynska J (2004) The correlation between the chromosome variation in callus and genotype of explants of *Arabidopsis thaliana*. Genetica 121: 145-154

Fras A, Juchimiuk J, Siwinska D, Maluszynska J (2007) Cytological events in explants of *Arabidopsis thaliana* during early callogenesis. Plant Cell Rep 26: 1933-1939

Fratini R, Ruiz ML (2002) Comparative study of different cytokinins in the induction of morphogenesis in lentil (*Lens culinaris* Medik). In Vitro Cell Dev-Pl 38: 46-51

Fulnecek J, Kovarik A (2014) How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? BMC Genetics 15: 2

Furner IJ, Matzke M (2011) Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. Curr Opin Plant Biol 14: 137-141

Gaj M, Maluszynski M (1987) Genetic variation in callus culture of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Arabidopsis Inf Serv 23: 1-8

Gaj MD (2001) Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for in vitro regeneration of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Tiss org 64: 39-46

Gaj MD (2004) Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Plant Growth Regul 43: 27-47

Galbraith DW, Harkins KR, Knapp S (1991) Systemic Endopolyploidy in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol 96: 985-989

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp Cell Res 50: 151-158

Gao D, Vallejo VA, He B, Gai Y, Sun L (2009) Detection of DNA changes in somaclonal mutants of rice using SSR markers and transposon display. Plant cell, tiss org98: 187-196

Gao L, McCarthy EM, Ganko EW, McDonald JF (2004) Evolutionary history of *Oryza sativa* LTR retrotransposons: a preliminary survey of the rice genome sequences. BMC Genomics 5: 18

Gao X, Yang D, Cao D, Ao M, Sui X, Wang Q, Kimatu JN, Wang L (2010) *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. J Plant Growth Regul 29: 257-267

García-Mas J., Graciano E., Aranzana M., Monforte A., Oliver M., Ballester J., Viruel M. y Arus P (2000) Marcadores de ADN: Concepto, Tipos, Protocolos. In: Nuez, F. y Carrillo, J. (eds). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia, España, p 93-151

Garcia-Martinez J, Martinez-Izquierdo JA (2003) Study on the evolution of the *Grande* retrotransposon in the *Zea* genus. Mol Biol Evol 20: 831-841

Gavazzi G, Tonelli C, Todesco G, Arreghini E, Raffaldi F, Vecchio F, Barbuzzi G, Biasini M, Sala F (1987) Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (Lycopersicon esculentum L.). Theor Appl Genet 74: 733-738

Goff SA, Ricke D, Lan TH, Presting G, Wang R, Dunn M, y col. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). Science 296: 92-100

González AI, Sáiz A, Acedo A, Ruiz ML, Polanco C (2013) Analysis of genomic DNA methylation patterns in regenerated and control plants of rye (*Secale cereale* L.). Plant Growth Regul 70: 227-236

Gottlieb LD (1981) Gene number in species of Astereae that have different chromosome numbers. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3726-3729

Gupta P, Varshney RK, Sharma P, Ramesh B (1999) Molecular markers and their applications in wheat breeding. Plant breeding 118: 369-390

Haberlandt G (1906) Ueber Regeneration im Pflanzenreich. Deutsche Revue 26 (1): 334-342. 1902. Culturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitz-Ber. Mat.-Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien 111: 69-92

Hancock JF (2005) Contributions of domesticated plant studies to our understanding of plant evolution. Ann Bot 96: 953-963

Heslop-Harrison JP, Brandes A, Taketa S, Schmidt T, Vershinin AV, Alkhimova EG, Kamm A, Doudrick RL, Schwarzacher T, Katsiotis A (1997) The chromosomal distributions of *Ty1-copia* group retrotransposable elements in higher plants and their implications for genome evolution. Genetica 100: 197-204

Hiei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Plant J 6: 271-282

Hillman G (1978) On the origins of domestic rye (*Secale cereale*): the finds from aceramic Can Hasan III in Turkey. Anatolian Studies 28: 157-174

Hirochika H, Sugimoto K, Otsuki Y, Tsugawa H, Kanda M (1996) Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. Proc Natl Acad Sci USA 93: 7783-7788

Hirochika, H. (2001) Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics. Curr. Opin. Plant Biol 4**:** 118–122

Hoekema A, Hirsch P, Hooykaas P, Schilperoort R (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir-and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. Nature 303: 179-180

Hollister JD, Smith LM, Guo YL, Ott F, Weigel D, Gaut BS (2011) Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. Proc Natl Acad Sci USA 108: 2322-2327

Huang S, Sirikhachornkit A, Faris JD, Su X, Gill BS, Haselkorn R, Gornicki P (2002) Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. Plant Mol Biol 48: 805-820

Hull R (2001) Classifying reverse transcribing elements: a proposal and a challenge to the ICTV. Arch Virol 146: 2255-2261

International Rice Genome Sequencing Project (2005) The map-based sequence of the rice genome. Nature 436: 793–800 doi: 10.1038/nature03895

Ito H, Kakutani T (2014) Control of transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. Chromosome res 22: 217-223

Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica 118: 153-166

Jan VVS, De Macedo CC, Kinet J, Bouharmont J (1997) Selection of Al-resistant plants from a sensitive rice cultivar, using somaclonal variation, in vitro and hydroponic cultures. Euphytica 97: 303-310

Jiang C, Mithani A, Gan X, Belfield E. J, Klingler JP, Zhu JK y col. (2011). Regenerant *Arabidopsis* Lineages Display a Distinct Genome-Wide Spectrum of Mutations Conferring Variant Phenotypes. *Current Biology*, 21: 1385–1390

Jiang N, Bao Z, Zhang X, Hirochika H, Eddy SR, et al. (2003) An active DNA transposon family in rice. Nature 421: 163-167

Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuisson J, Heredia F, Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F, Colot V (2009) Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. PLoS Genet 5(6): e1000530

Jordan E, Saedler H, Starlinger P (1967) Strong-polar mutations in the transferase gene of the galactose operon in *E. coli*. Mol Gen Genet 100: 296-306

Jullien PE, Berger F (2010) Parental genome dosage imbalance deregulates imprinting in *Arabidopsis*. PLoS Genet 6(3): e1000885

Kaeppler SM, Phillips RL (1993) Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. Proc Natl Acad Sci USA 90: 8773-8776

Kalendar R, Grob T, Regina M, Suoniemi A, Schulman A (1999) IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor Appl Genet 98: 704-711

Kalendar R, Flavell A, Ellis T, Sjakste T, Moisy C, Schulman AH (2011) Analysis of plant diversity with retrotransposon-based molecular markers. Heredity 106: 520-530

Komatsu M, Shimamoto K, Kyozuka J (2003) Two-step regulation and continuous retrotransposition of the rice LINE-type retrotransposon *Karma*. Plant Cell 15:1934-1944

Kantama L, Junbuathong S, Sakulkoo J, de Jong H, Apisitwanich S (2013). Epigenetic changes and transposon reactivation in Thai rice hybrids. Mol Breeding 31: 815-827

Karp A, Owen P, Steele S, Bebeli P, Kaltsikes P (1992) Variation in telomeric heterochromatin in somaclones of rye. Genome 35: 590-593

Karp A (1995) Somaclonal variation as a tool for crop improvement. Euphytica 85: 295-302

Kashkush K, Khasdan V (2007) Large-scale survey of cytosine methylation of retrotransposons and the impact of readout transcription from long terminal repeats on expression of adjacent rice genes. Genetics 177: 1975-1985

Kato M, Miura A, Bender J, Jacobsen SE, Kakutani T (2003) Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis*. Curr Biol 13: 421–426

Kaul S, Koo H, Jenkins J, Rizzo M, Rooney T, Tallon L y col (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature 408: 796-815

Kikuchi K, Terauchi K, Wada M, Hirano H-Y (2003) The plant MITE *mPing* is mobilized in anther culture. Nature 421: 167-170

Kim MY, Zilberman D (2014) DNA methylation as a system of plant genomic immunity. Trends Plant Sci 19: 320-326

Kubis S, Castilho A, Vershinin A, Heslop-Harrison J (2003) Retroelements, transposons and methylation status in the genome of oil palm (*Elaeis guineensis*) and the relationship to somaclonal variation. Plant Mol Biol 52: 69-79

Kumar A, Bennetzen JL (1999) Plant retrotransposons. Annu Rev Genet 33: 479-532

Labra M, Vannini C, Grassi F, Bracale M, Balsemin M, Basso B, Sala F (2004) Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. Theor Appl Genet 109: 1512-1518

Laibach F (1943) *Arabiopsis thaliana* (L.) Heynh. als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen Bot Arch 44: 439-455

Laibach F (1907) Zur Frage nach der individualität der Chromosomen im Pflanzenreich (Tesis Doctoral) Beih. Bot. Cbl., 1 pp. 191–210 Abt. 22

Larkin P, Scowcroft W (1981) Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability from Cell-Cultures for Plant Improvement. Theor Appl Genet 60: 197-214

Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nat Rev Genet 11: 204-220

Lee M, Phillips RL (1988) The chromosomal basis of somaclonal variation. Annu Rev Plant and Plant Mol Biol 39: 413-437

Li J, Wang J, Zeigler RS (2014) The 3,000 rice genomes project: new opportunities and challenges for future rice research. GigaScience 3: 1-3

Li J, Chory J (1998) Preparation of DNA from *Arabidopsis*. Arabidopsis Protocols 82: 55-60

Li N, Ye M, Li Y, Yan Z, Butcher LM, Sun J, Han X, Chen Q, Wang J (2010) Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology. Methods 52: 203-21

Linacero R, Alves EF, Vázquez A (2000) Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. Theor Appl Genet 100: 506-511

Linacero R, Rueda J, Esquivel E, Bellido A, Domingo A, Vázquez AM (2011) Genetic and epigenetic relationship in rye, *Secale cereale* L., somaclonal variation within somatic embryo-derived plants. In Vitro Cell Dev-Plant 47: 618-628

Linacero R, Vazquez AM (1992a) Cytogenetic variation in rye regenerated plants and their progeny. Genome 35: 428-430

Linacero R, Vazquez AM (1992b) Genetic analysis of chlorophyll-deficient somaclonal variants in rye. Genome 35: 981-984

Linacero R, Vázquez AM (1993) Somaclonal variation in rye. Mutation Res Lett 302: 201-205

Lin, X., Long, L., Shan, X., Zhang, S., Shen, S., and Liu, B. (2006) In planta mobilization of *mPing* and its putative autonomous element Pong in rice by hydrostatic pressurization. J. Exp. Bot. 57, 2313–2323

Lippman Z, Gendrel AV, Black M, Vaughn MW, Dedhia N, McCombie WR, Lavine K, Mittal V, May B, Kasschau KD, Carrington JC, Doerge RW, Colot V, Martienssen R (2004) Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. Nature 430: 471–476

Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR (2008) Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. Cell 133: 523–536

Lu YQ, Wang DM, Li HY, Jia Q, Wu Z, Lu WF (2012) A comparison on DNA methylation levels in bamboo at five developmental stages. J For Res 23: 157-159

Machczyńska J, Orłowska R, Mańkowski DR, Zimny J, Bednarek PT (2014a) DNA methylation changes in triticale due to *in vitro* culture plant regeneration and consecutive reproduction. Plant Cell Tiss Org 2: 289-299

Machczyńska J, Orłowska R, Zimny J, Bednarek PT (2014b) Extended metAFLP approach in studies of tissue culture induced variation (TCIV) in triticale. Mol Breed 34: 845-854

Machczyńska J, Zimny J, Bednarek PT (2015) Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticale (× Triticosecale spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. Plant Mol Biol 89: 279-292

Markert CL, Moller F (1959) Multiple Forms of Enzymes: Tissue, Ontogenetic, and Species Specific Patterns. Proc Natl Acad Sci USA 45: 753-763

Martis MM, Zhou R, Haseneyer G, Schmutzer T, Vrana J, Kubalakova M, Konig S, Kugler KG, Scholz U, Hackauf B, Korzun V, Schon CC, Dolezel J, Bauer E, Mayer KF, Stein N (2013) Reticulate evolution of the rye genome. Plant Cell 25: 3685-3698

Mathur J, Koncz C (1998) Callus culture and regeneration. Methods Mol Biol 82: 31-4

Matsunaga W, Kobayashi A, Kato A, Ito H (2012) The effects of heat induction and the siRNA biogenesis pathway on the transgenerational transposition of ONSEN, a *copia-like* retrotransposon in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 53: 824-833

Matthes M, Singh R, Cheah S, Karp A (2001) Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. Theor Appl Genet 102: 971-979

Maunakea, AK, Nagarajan RP, Bilenky M, Ballinger TJ, D'Souza C, Fouse SD, Costello JF (2010) Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters. Nature 466: 253-257

McClintock B (1948) Mutable loci in maize. Carnegie Inst. of Wash. Year Book 47: 155-169

McCourt, P., & Keith, K. (1997). Sterile techniques in *Arabidopsis*. Method Mol Cell Biol, 82: 13-17

Meinke DW, Cherry JM, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome analysis. Science 282: 662, 679-82

Miguel C, Marum L (2011) An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. J Exp Bot 62: 3713-3725

Ministerio de agricultura, alimentación y medio ambiente. Fecha de acceso (05 Feb 2015). URL: https:// http://www.magrama.gob.es

Mittelsten Scheid O, Jakovleva L, Afsar K, Maluszynska J, Paszkowski J (1996) A change of ploidy can modify epigenetic silencing. Proc Natl Acad Sci USA 93: 7114-7119

Mirouze M, Reinders J, Bucher E, Nishimura T, Schneeberger K, Ossowski S, Cao J, Weigel D, Paszkowski J, Mathieu O (2009) Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis*. Nature 461: 427-430

Miura A, Yonebayashi S, Watanabe K, Toyama T, Shimada H, Kakutani T (2001) Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. Nature 411: 212-214

Miyao A, Iwasaki Y, Kitano H, Itoh J, Maekawa M, Murata K, Yatou O, Nagato Y, Hirochika H (2007) A large-scale collection of phenotypic data describing an insertional mutant population to facilitate functional analysis of rice genes. Plant Mol Biol 63: 625-635

Miyao M, Masumoto C, Miyazawa S, Fukayama H (2011) Lessons from engineering a single-cell C(4) photosynthetic pathway into rice. J Exp Bot 62: 3021-3029

Miyao A, Nakagome M, Ohnuma T, Yamagata H, Kanamori H, Katayose Y, Takahashi A, Matsumoto T, Hirochika H (2012) Molecular spectrum of somaclonal variation in regenerated rice revealed by whole-genome sequencing. Plant Cell Physiol 53: 256-264

Miyao A, Tanaka, K, Murata K, Sawaki H, Takeda S, Abe K y col. (2003) Target site specificity of the *Tos17* retrotransposon shows a preference for insertion within genes and against insertion in retrotransposon-rich regions of the genome. The Plant Cell 15: 1771-1780

Molinier J, Ries G, Zipfel C, Hohn B (2006) Transgeneration memory of stress in plants. Nature 442: 1046-1049

Mujib, A. 2004. *In vitro* variability in tissue culture a freshlook. In: Mujib, A., M.-J. Cho, S. Predieri, and S. Banerjee (eds.). *In vitro* Application in Crop Improvement 261-271. New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co.Pvt.Ttd.

Murashige T (1974) Plant Propagation through Tissue-Cultures. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 25: 135-166

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-97

Nakano M, Nomizu T, Mizunashi K, Suzuki M, Mori S, Kuwayama S, Hayashi M, Umehara H, Oka E, y col. (2006) Somaclonal variation in *Tricyrtis hirta* plants regenerated from 1-year-old embryogenic callus cultures, Sci Hort 110: 366-371, ISSN 0304-4238

Nakazaki, T., Okumoto, Y., Horibata, A., Yamahira, S., Teraishi, M., Nishida, H., Inoue, H., and Tanisaka, T. (2003) Mobilization of a transposon in the rice genome. Nature 421, 170–172

Neelakandan AK, Wang K (2012) Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Rep 31: 597-620

Nei M, Li W (1979) Mathematical-model for studying genetic-variation in terms of restriction endonucleases. Proc Natl Acad Sci USA 76: 5269-5273

Nishi T, Yamada Y, Takahashi E (1968) Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. Nature 219: 508-509

Noro Y, Takano-Shimizu T, Syono K, Kishima Y, Sano Y (2007) Genetic variations in rice *in vitro* cultures at the EPSPs-RPS20 region. Theor Appl Genet 114: 705-711

Oono, K. (1978). High frequency mutations in rice plants regenerated from seed callus. In Proceedings of the Fourth International Congress of Plant Cell and Tissue Culture, Univ. of Calgary Press. Calgary, Canada (Vol. 52)

Orovic V, Syvertsen J, Bright D, Van Clief D, Graham H (2008) Citrus seedling growth and susceptibility to root rot as affected by phosphate and phosphite. J Plant Nutr 31: 774-787

Park K, Park N, Lee S, Kim K, Chang Y, Kim N (2014) A new active *CACTA* element and transposition activity in ecotype differentiation of *Arabidopsis*. Genes Genom 36: 229-238

Paszkowski J, Whitham SA (2001) Gene silencing and DNA methylation processes. Curr Opin Plant Biol 4: 123-129

Pearce S, Knox M, Ellis T, Flavell A, Kumar A (2000) Pea *Ty1-copia* group retrotransposons: transpositional activity and use as markers to study genetic diversity in *Pisum*. Mol Gen Genet 263: 898-907

Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia V, James-Kay A (2001) Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). Plant Sci 161: 359-367

Picca A, Helguera M, Salomón N, Carrera A, Echenique V, Rubinstein C, Mogrisdki L (2004) Marcadores moleculares. Biotecnología y Mejoramiento Genético Vegetal Parte II. Herramientas básicas. Ediciones INTA. Echenique V, Rubinstein C, L. Mroginski (Eds.). Parte II, Cap, 61, 68: 125-133

Polanco C, González AI, De la Puente R, Somalo S, Ruiz ML (2005) Cloning of AFLP markers detected by fluorescence capillary electrophoresis. Plant Mol Biol Rep 23: 271-277

Polanco C, Ruiz ML (2002) AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. Plant Sci 162: 817-824

Qiao M, Zhao Z, Xiang F (2012) *Arabidopsis thaliana in vitro* shoot regeneration is impaired by silencing of TIR1. Biol Plant 56: 409-414

Quirós E (2003) Evaluación morfológica y molecular de líneas avanzadas de mejoramiento genético de arroz (*Oryza sativa*) del instituto de investigación agropecuaria de panamá (IDIAP)

Rakoczy-Trojanowska M (2002) The effects of growth regulators on somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) and selection of somaclonal variants with increased agronomic traits. Cell Mol Biol Lett 7: 1111-1120

REBASE The Restriction Enzyme Database. Fecha de acceso (18 Nov 2015). URL: http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html

Reinert J (1958) Untersuchungen uber die Morphogenese an Gewebekulturen. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 71, 15

Reyna-Lopez G, Simpson J, RuizHerrera J (1997) Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. Mol Gen Genet 253: 703-710

Rigal M, Mathieu O (2011) A "mille-feuille" of silencing: epigenetic control of transposable elements. BBA-Gene Regul Mech 8: 452-458

Roschevicz R (1931) A contribution to the knowledge of rice. Bull Appl Bot Genet Plant Breed 27: 31-33

Rout G, Mohapatra A, Jain SM (2006) Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. Biotechnol Adv 24: 531-560

Rout G, Palai S, Samantaray S, Patra A, Das P (1998) Chromosome variation and cytophotometric investigation of callus culture of the teaplant, *Camellia sinensis*. Cytobios 93: 73-82

Ruiz-García L, Cervera MT, Martínez-Zapater JM (2005) DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. Planta 222: 301-306

Saharan V, Yadav RC, Yadav NR, Chapagain BP (2004) High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). African J Biotechnol 3: 256-259

Sahijram L, Soneji J, Bollamma K (2003) Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa* spp.). In Vitro Cell Dev Biol -Plant 39: 551-556

Sánchez-Chiang N, Jiménez VM (2009) Técnicas moleculares para la detección de variantes somaclonales. Agronomía Mesoamericana 20: 135-151

Sangwan RS, Bourgeois Y, Brown S, Vasseur G, Sangwan-Norreel B (1992) Characterization of competent cells and early events of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in *Arabidopsis thaliana*. Planta 188: 439-456

Singer T, Yordan C, Martienssen RA (2001) Robertson's mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene decrease in DNA methylation (*DDM1*). Genes Dev 15:591–602

Schlegel R, Melz G, Mettin D (1986) Rye cytology, cytogenetics and genetics—current status. Theor Appl Genet 72: 721-734

Schrey AW, Alvarez M, Foust CM, Kilvitis HJ, Lee JD, Liebl AL, Martin LB, Richards CL, Robertson M (2013) Ecological epigenetics: beyond MS-AFLP. Integr Comp Biol 53: 340-350

Sedov KA, Fomenkov AA, Solovyova AI, Nosov V, Yu I. (2014) The level of genetic variability of cells in prolonged suspension culture of *Arabidopsis thaliana*. Biol Bull 41: 493-499

Shemer O, Landau U, Candela H, Zemach A, Williams LE (2015) Competency for shoot regeneration from *Arabidopsis* root explants is regulated by DNA methylation. Plant Sci 238: 251-261

Serrano-Cartagena J, Candela H, Robles P, Ponce MR, Perez-Perez JM, Piqueras P, Micol JL (2000) Genetic analysis of incurvata mutants reveals three independent genetic operations at work in *Arabidopsis* leaf morphogenesis. Genetics 156: 1363-1377

Shan X, Blake T, Talbert L (1999) Conversion of AFLP markers to sequence-specific PCR markers in barley and wheat. Theor Appl Genet 98: 1072-1078

Sherman J, Talbert L (2002) Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. Genome 45: 253-260

Skoog F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp Soc Exp Biol 11: 118-130

Slazak B, Sliwinska E, Saługa M, Ronikier M, Bujak J, Słomka A, Göransson U, Kuta E (2015) Micropropagation of *Viola uliginosa* (Violaceae) for endangered species conservation and for somaclonal variation-enhanced cyclotide biosynthesis. Plant Cell Tiss Org Culture 120: 179-190

Slotkin RK, Nuthikattu S, Jiang N (2012) The impact of transposable elements on gene and genome evolution. Springer Viena 1: 35-58

Smýkal, P, Valledor, L, Rodriguez, R, y Griga, M. (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). Plant cell reports, 26: 1985-1998

Smulders M, De Klerk G (2011) Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regul 63: 137-146

Steward F, Mapes MO, Mears K (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am J Bot 45: 705-708

Stroud H, Ding B, Simon SA, Feng S, Bellizzi M, Pellegrini M, Wang G, Meyers BC, Jacobsen SE (2013) Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. eLIFE 2:e00354

Takagi, K., Ishikawa, N., Maekawa, M., Tsugane, K., & Iida, S. (2007). Transposon display for active DNA transposons in rice. Genes Genet Syst 82: 109-122

Takata M, Kiyohara A, Takasu A, Kishima Y, Ohtsubo H, Sano Y (2007) Rice transposable elements are characterized by various methylation environments in the genome. BMC Genomics 8: 469

Tam SM, Mhiri C, Vogelaar A, Kerkveld M, Pearce SR, Grandbastien M (2005) Comparative analyses of genetic diversities within tomato and pepper collections detected by retrotransposon-based SSAP, AFLP and SSR. Theor Appl Genet 110: 819-831

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Mol Biol Evol 30: 2725-2729

Targońska M, Hromada-Judycka A, Bolibok-Brągoszewska H, Rakoczy-Trojanowska M (2013) The specificity and genetic background of the rye (*Secale cereale* L.) tissue culture response. Plant Cell Rep 32: 1-9

Teramoto S, Tsukiyama T, Okumoto Y, Tanisaka T (2014) Early embryogenesis-specific expression of the rice transposon *ping* enhances amplification of the MITE *mPing*. PLoS Genet 10(6): e1004396

Thomas T (2004) *In vitro* modification of sex expression in mulberry (*Morus alba*) by ethrel and silver nitrate. Plant Cell Tissue Organ Cult 77: 277-281

Toki S, Hara N, Ono K, Onodera H, Tagiri A, Oka S, Tanaka H (2006) Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. Plant J47: 969-976

Tsugane K, Maekawa M, Takagi K, Takahara H, Qian Q, Eun C, Iida S (2006) An active DNA transposon *nDart* causing leaf variegation and mutable dwarfism and its related elements in rice. Plant J 45: 46-57

Tsukahara S, Kawabe A, Kobayashi A, Ito T, Aizu T, Shin-i T, Toyoda A, Fujiyama A, Tarutani Y, Kakutani T (2012) Centromere-targeted de novo integrations of an LTR retrotransposon of *Arabidopsis lyrata*. Genes Dev 26: 705–713

Us-Camas R, Rivera-Solís G, Duarte-Aké F, De-la-Peña C (2014) *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 118: 187-201

Valvekens D, Van Montagu, M, Van Lijsebettens M (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. Proc Natl Acad Sci USA 85: 5536-5540

Vavilov NI (1992) Origin and geography of cultivated plants. Cambridge University Press

Venkatachalam P, Thulaseedharan A, Raghothama K (2007) Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). Planta 226: 499-515

Vergunst AC, Jansen LE, Hooykaas PJ (1998) Site-specific integration of *Agrobacterium* T-DNA in *Arabidopsis thaliana* mediated by Cre recombinase. Nucleic Acids Res 26: 2729-2734

Vershinin A, Ellis T (1999) Heterogeneity of the internal structure of PDR1, a family of *Ty1/copia-like* retrotransposons in pea. Mol Gen Genet 262: 703-713

Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee Tvd, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res 23: 4407-4414

Wang Q, Wang L (2012) An evolutionary view of plant tissue culture: somaclonal variation and selection. Plant Cell Rep 31: 1535-1547

Wang Q, Zhang W, Yin Z, Wen CK (2013) Rice CONSTITUTIVE TRIPLE-RESPONSE2 is involved in the ethylene-receptor signalling and regulation of various aspects of rice growth and development. J Exp Bot 64: 4863-4875

Wang, W., Zhao, X., Pan, Y., Zhu, L., Fu, B., y Li, Z. (2011). DNA methylation changes detected by methylation-sensitive amplified polymorphism in two contrasting rice genotypes under salt stress. J Genet Genomics, 38: 419-424

Wang X, Wu, R, Lin X, Bai Y, Song C, Yu X y col. (2013). Tissue culture-induced genetic and epigenetic alterations in rice pure-lines, F1 hybrids and polyploids. BMC Plant Biol, 13: 77

Watanabe H, Futakuchi K, Jones MP, Sobambo BA (2006) Grain protein content of interspecific progenies derived from the cross of African rice (*Oryza glaberrima* Steud.) and Asian rice (*Oryza sativa* L.). Plant Prod Sci 9: 287-293

Waugh R, McLean K, Flavell A, Pearce S, Kumar A, Thomas B, Powell W (1997) Genetic distribution of Bare–1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP). Mol Gen Genet 253: 687-694

Wicker T, Sabot F, Hua-Van A, Bennetzen JL, Capy P, Chalhoub B, Flavell A, Leroy P, Morgante M, Panaud O (2007) A unified classification system for eukaryotic transposable elements. Nat Rev Genet 8: 973-982

Wu, Y., Wu, R., Zhang, B., Jiang, T., Li, N., Qian, K y col. (2012). Epigenetic instability in genetically stable micropropagated plants of *Gardenia jasminoides* Ellis. Plant Growth Regul 66: 137-143

Xiao, W., Custard, K. D., Brown, R. C., Lemmon, B. E., Harada, J. J., Goldberg, R. B., & Fischer, R. L. (2006). DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. The Plant Cell 18: 805-814

Xiong L, Xu C, Maroof MS, Zhang Q (1999) Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. Mol Gen Genet 261: 439-446

Xu M, Li X, Korban SS (2000) AFLP-based detection of DNA methylation. Plant Mol Biol Rep 18: 361-368

Yang H, Tabei Y, Kamada H, Kayano T, Takaiwa F (1999) Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA. Plant Cell Rep 18: 520-526

Yang X, Zhang X, Fu L, Min L, Liu G (2010) Multiple shoots induction in wild cotton (*Gossypium bickii*) through organogenesis and the analysis of genetic homogeneity of the regenerated plants. Biologia 65: 496-503

Yu J, Hu S, Wang J, Wong GK, Li S, Liu B y col. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). Science 296: 79-92

Yu XM, Li X, Zhao XX, Jiang LL, Miao GJ, Pang JS, Qi X, Liu B: Tissue culture-induced genomic alteration in maize (*Zea mays*) inbred lines and F1 hybrids. Ann Appl Biol 2011, 158: 237-247

Zemach, A., Kim, M. Y., Silva, P., Rodrigues, J. A., Dotson, B., Brooks, M. D. y Zilberman, D. (2010). Local DNA hypomethylation activates genes in rice endosperm. P Natl Acad USA 107: 18729-18734

Zeng X, Wen J, Wan Z, Yi B, Shen J, Ma C, Tu J, Fu T (2010) Effects of bleomycin on microspore embryogenesis in *Brassica napus* and detection of somaclonal variation using AFLP molecular markers. Plant Cell Tiss Org 101: 23-29

Zhang M., Xu, C., Yan H., Zhao N, Von Wettstein, D, Liu, B. (2009). Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F1 hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. Plant J, 57: 666-679

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

Zoé Joly-Lopez, Thomas E. Bureau (2014) Diversity and evolution of transposable elements in *Arabidopsis*. Chromosome Res 22: 203-216

Zhu JK (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. Annu Rev Genet 43: 143-166

Zupan J, Muth TR, Draper O, Zambryski P (2000) The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. Plant J 23: 11-28