

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL



**PERFIL DE METILACIÓN EN SECUENCIAS DE ADN ESPECÍFICAS
DE CALLO ORGANOGÉNICO Y NO MORFOGÉNICO**
*EN **Nothofagus alpina***

Por

MARÍA FRANCISCA BELTRÁN GUZMÁN

MEMORIA PARA OPTAR AL
TITULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGIA VEGETAL

CONCEPCION – CHILE

2012

UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS FORESTALES
INGENIERIA EN BIOTECNOLOGIA VEGETAL

**PERFIL DE METILACIÓN EN SECUENCIAS DE ADN ESPECÍFICAS
DE CALLO ORGANOGÉNICO Y NO MORFOGÉNICO**
*EN **Nothofagus alpina***

Por

MARÍA FRANCISCA BELTRÁN GUZMÁN

MEMORIA PARA OPTAR AL
TITULO DE INGENIERO EN
BIOTECNOLOGIA VEGETAL

CONCEPCION – CHILE

2012

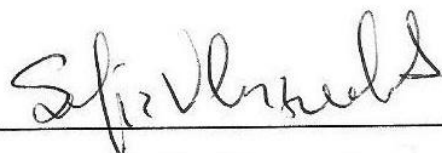
**PERFIL DE METILACIÓN EN SECUENCIAS DE ADN ESPECÍFICAS
DE CALLO ORGANOGÉNICO Y NO MORFOGÉNICO
EN *Nothofagus alpina***

Profesor Guía



Manuel Sánchez Olate
Profesor Asociado
Ingeniero Forestal, Dr.

Profesor Guía



Sofía Valenzuela Águila
Profesor Asociado
Bioquímico, Dra.

Calificación de la Memoria de Título o Habilitación Profesional:

Manuel Sánchez Olate: 6,5 (Seis coma cinco)

Sofía Valenzuela Águila: 6,5 (Seis coma cinco)

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Manuel Sánchez, por actuar como guía durante dos años, por confiar en mí y permitirme integrar el laboratorio, por hacerme crecer como científico, por darme la oportunidad de viajar y ampliar mis conocimientos y contactos.

A la doctora Sofía Valenzuela, por actuar como co-guía en mi memoria, y permitirme integrar parte de su laboratorio, por sus correcciones y directrices.

A los integrantes del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, en especial a la Sra. Libett Alarcón por su apoyo y preocupación cuando recién me integré al laboratorio, a Catherine Delaveau por sus palabras de confianza y amistad y a Carolina Álvarez, por ayudarme siempre que necesité de su colaboración. Muy en especial a Priscila Cartes, por dos años de enseñanza, por su paciencia, experiencia y buena voluntad, por su apoyo, preocupación y amistad, por ayudarme a enfocar mis objetivos y lograr los mismos.

A los integrantes del Laboratorio de Genómica y Biología Molecular del Centro de Biotecnología de la Universidad de Concepción, a Carolina Iturra y Pamela Wachtendorff por su paciencia y buena voluntad. A Mariela González por ayudarme cuando necesite su colaboración, por sus palabras y amistad. En especial a Rodrigo Hasbún, por un año de enseñanza y por haberme iniciado en el mundo de la epigenética, por su apoyo y por ayudarme a lograr mis objetivos.

A cada una de las personas que formaron parte de mi formación universitaria, a los profesores y administrativos, por sus palabras de confianza. A Catalina Castillo, por su apoyo y amistad, por ser un pilar importante durante estos años de estudio.

A mi familia, por su apoyo incondicional, preocupación y colaboración. A mis padres Mónica y Juan les dedico esta memoria de título, sin los cuales habría sido imposible

llegar a estar alturas, por su ejemplo de superación y lucha, por entregarme fortaleza y confianza. A mi hermano Cristián, por su ejemplo de constancia y superación, a mi hermana Fernanda, por su apoyo y cariño. A Aarón por sus palabras, consejos y apoyo en todo momento.

Y a Dios, por guiar cada uno de mis pasos.

INDICE DE MATERIAS

CAPITULOS	PAGINA
I INTRODUCCIÓN	1
II METODOLOGÍA.....	7
2.1. Material Vegetal.....	7
2.1.1 Material vegetal inicial	7
2.2 Diseño experimental.....	7
2.2.1 Variables evaluadas.....	8
2.3 Extracción de ADN.....	8
2.4 Amplificación de polimorfismos sensibles a metilación (MSAP)	9
2.4.1 Digestión y ligación.	9
2.4.1.1 Experimento dilución ADN.....	9
2.4.2 Pre-amplificación..	10
2.4.2.1 Experimento temperatura de <i>annealing</i>	11
2.4.3 Amplificación selectiva.	11
2.4.3.1 Combinación de partidores.....	11
2.4.3.2 Experimento temperatura de <i>annealing</i>	12
2.4.4. Análisis de fragmentos..	12
2.5 Validación del método	13
III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	15
3.1 Extracción de ADN.....	15
3.2 Puesta a punto del método de MSAP	16

3.3 Análisis mediante MSAP	22
IV CONCLUSIONES	28
V RESUMEN.....	29
VI ABSTRACT.....	30
VII REFERENCIAS	31
VIII APENDICE.....	41

INDICE DE TABLAS

TABLA N°	PAGINA
<u>En el texto</u>	
1. Sensibilidad a la metilación y patrón de restricción de isoesquizómeros HpaII y MspI	6
2. Diluciones seriadas ADN	10
3. Partidores selectivos MSAP ensayados en <i>N. alpina</i>	11
4. Parámetros para evaluar las combinaciones de partidores para MSAP.....	12
5. Combinación de partidores MSAP seleccionados, proporción de polimorfismo y error asociado a cada combinación E/H-M.....	21
6. Patrón de metilación en sitios específicos determinado mediante MSAP en Callo Organogénico con respecto a Callo no Morfogénico de un clon de <i>N. alpina</i>	23
<u>En el apéndice</u>	
1A. Calidad y concentración de ADN de callo organogénico y no morfogénico de <i>N. alpina</i>	41

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	PAGINA
<u>En el texto</u>	
1. Cortes histológicos de <i>N. alpina</i> , coloración: Safranina-Fast Green. A) Corte histológico callo no morfogénico (Escala= 200 μm). C) Corte histológico Callo organogénico (Escala= 200 μm). Imágenes tomadas de Cartes (2012).....	5
2. Vista del material empleado en el estudio en sus respectivos medios de cultivo. A) Callo no morfogénico. B) Callo organogénico.....	8
3. Estados de metilación y cambios detectados por las endonucleasas HpaII (H) y MspI (M). Códigos: 0 = no digestión, 1 = digestión. Figura tomada de González <i>et al.</i> (2007).....	13
4. Integridad de ADN para muestras de callo organogénico y no morfogénico de <i>N. alpina</i> mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. 1Kb: marcador de peso.....	15
5. Visualización de etapas de método MSAP mediante electroforesis en geles de agarosa. A) Pre-amplificación. B) Amplificación selectiva con las combinación de partidores E+ACA/H-M+TAGC. M: Marcador de peso 100 pb.....	16
6. Electroferograma de diluciones seriadas de ADN en una muestra de <i>N. alpina</i> , etapa selectiva E+ACA/H-M+ACC. En los <i>picos</i> pintados se destacan alelos variables debido a la dilución del ADN.....	17

7.	Visualización de etapa de pre-amplificación con diferentes temperaturas de alineamiento del método MSAP mediante electroforesis en gel de agarosa. a: Productos corte con HpaII. b: Productos corte con MspI. M: Marcador de peso 100pb.....	18
8.	Parámetros evaluados en la elección de las combinaciones de partidores selectivos. A) Visualización de dato bruto malo. B) Visualización de dato bruto esperado. C) Visualización de mala corrida del estándar de tamaño 500 LIZ. D) Visualización de Estándar de tamaño esperado. E) Espectroferograma de combinación selectiva con bandeo no homogéneo de fragmentos. F) Espectroferograma de combinación selectiva con bandeo homogéneo. G) Zoom visualizando espectroferograma con alelos con errores de amplificación. H) Zoom visualizando espectroferograma con alelos forma esperada.....	19
9.	Electroferograma de MSAP de una muestra de <i>N. alpina</i> . Se muestra el protocolo optimizado usando seis diferentes temperaturas de alineamiento (58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C y 68°C) para la amplificación selectiva combinación E+GC/H-M+ACC. En los <i>picos</i> pintados se destacan alelos variables debido a la temperatura de alineamiento, mostrando cambio en la amplificación de los productos.....	20
10.	Análisis de Componentes Principales (PCA) representando la variación en los en metilación de ADN entre diferentes tejidos. CER: Corte con enzimas de restricción. TT: Tipo de tejido. CO: callo organogénico. CNM: callo no morfogénico.....	22
11.	Patrones MSAP (EcoRI/MspI y EcoRI/HpaII) de <i>N. alpina</i> . Loci MSAP polimórficos (tamaños en pb) detectados en Callo organogénico y Callo no morfogénico.....	24

I INTRODUCCIÓN

Nothofagus alpina ((Poepp. et Endl.) Oerst) conocida por el nombre común de Raulí, es una especie perteneciente a la familia Fagaceae (Rodríguez y Quezada 2003) y una de las diez especies del género *Nothofagus* que habitan en Chile. Se distribuye a lo largo de la Cordillera de la Costa desde la Región del Bío Bío (Río Itata, 36° 30' S) hasta la Región de los Lagos (provincia de Llanquihue, 41° S), y a través de la Cordillera de los Andes desde la Región del Maule (provincia de Curicó, 35° S) hasta la Región de los Ríos (Valdivia, 40° 30' S), en un nicho altitudinal situado entre los 300 y los 1.200 m.s.n.m (Donoso *et al.* 2006).

Considerando las actuales demandas de la sociedad por productos y servicios procedentes del bosque, *N. alpina*, se constituye como una fuente de diversificación en la producción forestal (Cabrera 2000, Gutiérrez 2003), ya que actualmente el 92% de la superficie plantada corresponde a *Pinus spp.* (Pino) y *Eucalyptus spp.* (Eucalipto) (INFOR 2009). *N. alpina* se destaca por las características de su madera, tradicionalmente utilizada en mueblería y construcción (Gutiérrez 2003), así como por sus hábitos y potencial de crecimiento; características que la convierten en una especie apta para ser establecida y manejada bajo regímenes de silvicultura clonal, en esquemas de manejo similares a los aplicados hoy en pino y eucalipto (Ipinza y Gutiérrez 2000, Sabja *et al.* 2008). No obstante, factores como baja viabilidad de las semillas, marcada periodicidad en la producción y susceptibilidad al ataque de insectos en estas (Baldini y Pancel 2000, Burschel *et al.* 1976) influyen en el desarrollo de la especie. Estos factores, sumado a su fragmentada distribución actual (Gallo *et al.* 2006), y a la insatisfacción de propietarios y silvicultores por sus actuales rendimientos en calidad como producto maderable, hacen que resulte conveniente la aplicación de principios de mejoramiento genético, en forma conjunta con técnicas de propagación de individuos elite (Gallo *et al.* 2006).

Considerando lo anterior, la propagación asexual mediante cultivo de tejidos surge como alternativa a la multiplicación en especies de interés forestal hace más de 50 años (Rodríguez *et al.* 2005a), siendo hoy en día de interés para aplicar en esta especie. Dentro del cultivo de tejidos vegetales, la organogénesis tiene su origen en un primordio o brote vegetativo de una planta donante, que en condiciones de cultivo *in vitro*, presenta un desarrollo unipolar manteniendo siempre una conexión con el tejido de origen (Jiménez 1998). La organogénesis ofrece la ventaja de transferir toda la ganancia genética desde el árbol donante hacia la descendencia (Ikemori *et al.* 1994, Sabja *et al.* 2008), potenciándola como una herramienta para el mejoramiento de árboles forestales. Este método de micropropagación posee diversas aplicaciones como son: clonación rápida de híbridos o árboles elite para producción comercial (Rodríguez *et al.* 2005b), propagación de especies bajo categorías de amenaza (Corral *et al.* 2011), propagación de especies de importancia ornamental (Chavan *et al.* 2011), entre otras. Cuando la organogénesis es directa, el órgano formado mantiene conexión con el explanto original; a diferencia de cuando la organogénesis es indirecta, en ésta la conexión es a través de una estructura llamada callo compuesta por células indiferencias, con núcleos grandes y que se encuentran en activa división (Pierik 1990).

Durante la morfogénesis ocurren procesos claves para la activación de una ruta particular de desarrollo, como lo son la competencia y la determinación de los tejidos (Rodríguez *et al.* 2005b). La competencia es la capacidad de las células para reconocer señales hormonales (o de otra naturaleza) y se considera como una fase de transición en la que las células adquieren el estado de determinación (Meins 1986). La determinación es el proceso por el cual un organismo ve restringido su potencial morfogénico, dependiendo de la expresión genética manifestada en la inducción de una determinada ruta y que no se verá alterado por manipulación ambiental (Alberts *et al.* 1994).

La inducción de rutas morfogénicas normalmente ocurre por la acción de reguladores del crecimiento (George *et al.* 2008), tanto endógenos como aquellos exógenos adicionados al medio de cultivo. Varga *et al.* (1988), Dewitte y Murray (2003) y Sutan

et al. (2010), citan la importancia de los reguladores del crecimiento auxinas y citoquininas en el proceso de morfogénesis. Entre sus funciones, las auxinas estimulan la elongación de la pared celular, participan en la organización de meristemas y promueven la diferenciación vascular (Rodríguez *et al.* 2005b); y junto a citoquininas inducen la división celular y la producción de callo (Varga *et al.* 1988). Por su parte, las citoquininas regulan la formación y el desarrollo de tallos (Varga *et al.* 1988), rompen la dormición de yemas laterales e inducen la formación de yemas adventicias (Rodríguez *et al.* 2005b).

Aunque la habilidad de las células, tejidos y órganos cultivados *in vitro* para regenerar una planta completa es ampliamente conocida, la pregunta de cómo una célula somática puede diferenciarse en una planta completa, ha sido considerada una de las grandes interrogantes que enfrenta la ciencia (Vogel 2005, Miguel y Marum 2011).

Los procesos de cultivo *in vitro* suponen una situación de estrés para los tejidos que se cultivan, por tanto las plantas requieren de una interacción específica entre los programas de desarrollo y las vías de señalización de los estímulos externos, que debe ser coordinada a nivel de organización de la cromatina (Valledor *et al.* 2007). Esta estructuración en estados específicos es mediada por el control epigenético de la transcripción, que conducen a la expresión diferencial de genes que son fundamentales para la diferenciación celular y el desarrollo (Reyes *et al.* 2002, Smulders y de Klerk 2011). Esta secuencia de eventos es acompañada por cambios en la expresión génica, debido a la interacción de diferentes mecanismos epigenéticos como metilación del ADN, modificación de histonas y ARN de interferencia (ARNi), que afectan críticamente la estructura de la cromatina (Henderson and Jacobsen 2007) y modifican el acceso a la información genética lo que finalmente se traduce en cambios en el fenotipo (Miguel y Marum 2011).

Bucherna *et al.* (2001) enfatiza en el rol que juega la metilación del ADN en la regulación de la actividad genética y la diferenciación celular durante la

micropropagación. Diversos estudios han revelado cambios en la metilación del ADN asociada al cultivo de tejidos (Vergara *et al.* 1990, Smulders *et al.* 1995, Bucherna *et al.* 2001, Meng *et al.* 2010). Además, el cultivo de tejidos ha sido ampliamente usado como sistema modelo para el estudio de la dinámica de mecanismos epigenéticos actuando en la regulación del crecimiento celular y diferenciación, y por tanto, de la reprogramación nuclear necesaria para la desdiferenciación (Koukalova *et al.* 2005, Berdasco *et al.* 2008).

La metilación de citosinas en la posición 5' del anillo pirimidina, es la alteración epigenética más importante en eucariontes (Xiong *et al.* 1999, Valledor *et al.* 2007, Peredo *et al.* 2009) y ocurre en secciones de ADN de doble hebra cuando las enzimas metilasas 5-metilcitosina transfieren un grupo metilo desde la molécula S-adenosilmetionina (SAM), hacia el carbono 5 de residuos de citosina (Mi y Roberts 1992). La metilación del ADN puede ser categorizada en tres tipos de acuerdo a la secuencia donde se encuentra la 5-metilcitosina (5-mdC), sitios CpG, CpHpG o CpHpH (H=A, C o T) (Finnegan *et al.* 1998). Mientras que en animales predomina metilación de citosinas en sitios CG, en plantas la metilación del ADN ha sido encontrada en los tres contextos, con sitios CG metilados en un alto nivel, sitios CHG metilados a nivel medio y sitios CHH metilados a un nivel bajo (Chen *et al.* 2010, Feng *et al.* 2010).

La presencia de 5-metilcitosina (5-mdC) en el promotor de genes específicos altera el lugar de unión de factores de transcripción y otras proteínas del ADN, jugando un rol clave en la expresión génica y diferenciación de los tejidos (Finnegan *et al.* 1998, Tariq y Paszkowski 2004, Peredo *et al.* 2009, Smulders y de Klerk 2011), permitiendo explicar fenómenos como diferentes respuestas morfogénicas en tejidos con la misma constitución genética.

En el estudio previo desarrollado por Cartes (2012) se han encontrados diferencias en la morfogénesis *in vitro* de *N. alpina* obteniéndose, para un mismo genotipo, dos callos completamente diferentes. Estas diferencias son visualizadas tanto en la respuesta

morfogénica, como en cortes histológicas de los tejidos (Figura 1). Mientras un callo presenta alta concentración de células, núcleos grandes, alta proliferación, denominado callo organogénico; el otro callo tiene células grandes, pocos núcleos, denominado callo no morfogénico.

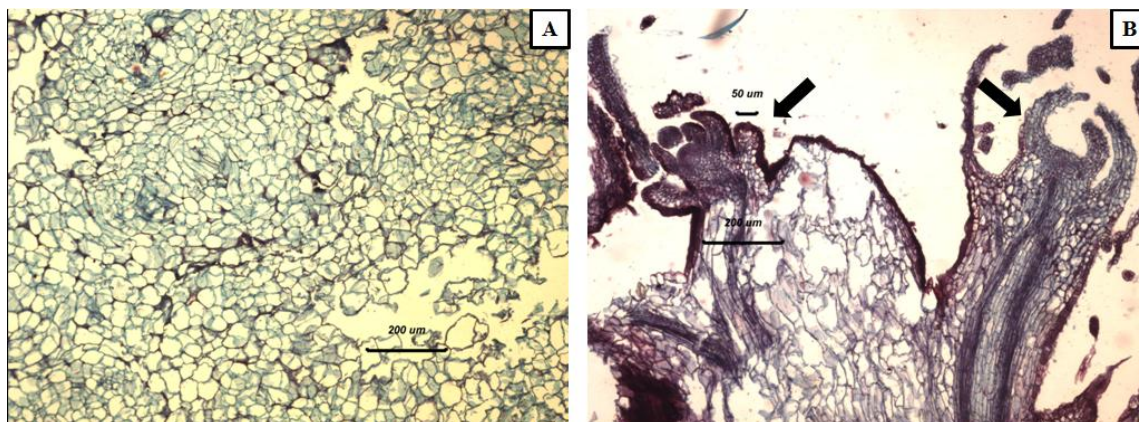


Figura 1. Cortes histológicos de *N. alpina*, coloración: Safranina-Fast Green. A) Corte histológico callo no morfogénico (Escala= 200 µm). C) Corte histológico Callo organogénico (Escala= 200 µm). Imágenes tomadas de Cartes (2012).

Diversos métodos para la detección de metilación del ADN han sido desarrollados y mejorados en el último tiempo (Baurens *et al.* 2003, Lu *et al.* 2008), siendo algunos de estos: (1) Electroforesis capilar de alta eficiencia (HPCE) (Fraga *et al.* 2002) (2) Tratamiento con bisulfito (Fraga *et al.* 2002), (3) Corte enzimático del ADN con isoesquizómeros con diferente sensibilidad a la metilación (Reyna-López *et al.* 1997). Este último, denominado MSAP según su nombre en inglés: Methylation Sensitive Amplification Polymorphism (Polimorfismos amplificados sensibles a la metilación (Reyna-López *et al.* 1997).

La técnica de MSAP, se basa en la técnica de AFLP (Amplified fragment length polymorphism) (Vos *et al.* 1995) y utiliza enzimas de restricción que difieren en su sensibilidad a la metilación de la secuencia que reconocen (Reyna-López *et al.* 1997) HpaII y MspI son isoesquizómeros que reconocen la secuencia tetranucleotida 5'-CCGG-3'. Sin embargo, HpaII no reconoce la secuencia cuando ambas hebras de ADN

presentan citosina metilada, mientras que si corta la cadena hemimetilada (citosina metilada sólo en una hebra). En el caso de MspI, no reconoce la secuencia cuando se encuentra la citosina externa metilada, mientras que si corta cuando la secuencia presenta la citosina interna metilada (Baurens *et al.* 2003, Lu *et al.* 2008, Ruiz-García *et al.* 2010, Elshire *et al.* 2011) (Tabla 1).

Tabla 1. Sensibilidad a la metilación y patrón de restricción de isoesquizómeros HpaII y MspI

Tipo	Estado de metilación	Patrón de digestión de enzima de restricción			
		HpaII	MspI	H*	M
Tipo I	5'- <u>CC</u> GG-3' 3'-GGCC-5'	Activo	Activo	+	+
Tipo II	5'- <u>C</u> CGG-3' 3'-GGCC-5'	Activo	Inactivo	+	-
Tipo III	5'-CC <u>G</u> G-3' 3'-GG <u>C</u> C-5'	Inactivo	Activo	-	+

* H y M indican la combinación de enzimas EcoRI/HpaII y EcoRI/MspI,(-): banda ausente, (+): banda presente. Citosina subrayada está metilada. Tabla modificada de Yang *et al.* 2011.

En este contexto, el estudio pretende determinar el perfil de metilación de ADN en callo organogénico y no morfogénico de *Nothofagus alpina* aplicando la técnica de MSAP. La hipótesis que orienta el trabajo se basa en que la diferencia en la respuesta morfogénica de ambos callos supone un perfil diferencial de metilación de ADN. Con esto se busca establecer una relación entre el perfil de metilación y la capacidad de organogénesis *in vitro* y de esta manera lograr una mayor comprensión sobre la regulación epigenética en estos procesos. De esta manera, los objetivos específicos que pretende alcanzar la presente investigación son: (1) Optimizar el protocolo de MSAP (Methylation sensitive amplification polymorphism) para ser aplicado en tejidos de *N. alpina*, (2) Determinar el perfil de metilación de ADN en callo organogénico y no morfogénico de *N. alpina*.

II METODOLOGÍA

2.1. Material Vegetal

2.1.1 Material vegetal inicial. El material utilizado en este estudio fue obtenido en el marco de la tesis doctoral “Validación de rutas morfogénicas para la clonación de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst) a partir de tejidos embrionarios y adultos” por Priscila Cartes Riquelme. La inducción de las rutas morfogénicas se llevó a cabo sobre yemas y hojas obtenidas desde varetas forzadas a brotar *in vitro*. Los materiales de estudio se obtuvieron a partir de un mismo genotipo aplicando los siguientes tratamientos de inducción: a) Callo organogénico: Medio de cultivo conteniendo la solución mineral y vitaminas Broadleaved Tree Medium (BTM) (Chalupa 1983) más 1 mgL^{-1} 6-bencilaminopurina (BAP) y $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ ácido indolbutírico (AIB). b) Callo no morfogénico: Medio de cultivo con la solución mineral y vitaminas Murashige and Skoog (MS) (Murashige y Skoog 1962) más 1 mgL^{-1} Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 1 mgL^{-1} Kinetina.

Los callos generados se mantuvieron en cadenas proliferativas de organogénesis adventicia en medio de mantención, medio base BTM más $0,1 \text{ mgL}^{-1}$ 6-bencilaminopurina (BAP) y $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ ácido indolbutírico (AIB).

2.2 Diseño experimental

La unidad experimental correspondió a un frasco o placa de petri conteniendo una porción de callo organogénico y callo no morfogénico por frasco (Figura 2). Se tomaron 8 muestras con 3 repeticiones cada una, donde cada repetición correspondió a una sección del mismo callo. El diseño experimental fue completamente aleatorio, generando un total de 24 unidades muestrales para cada tejido.

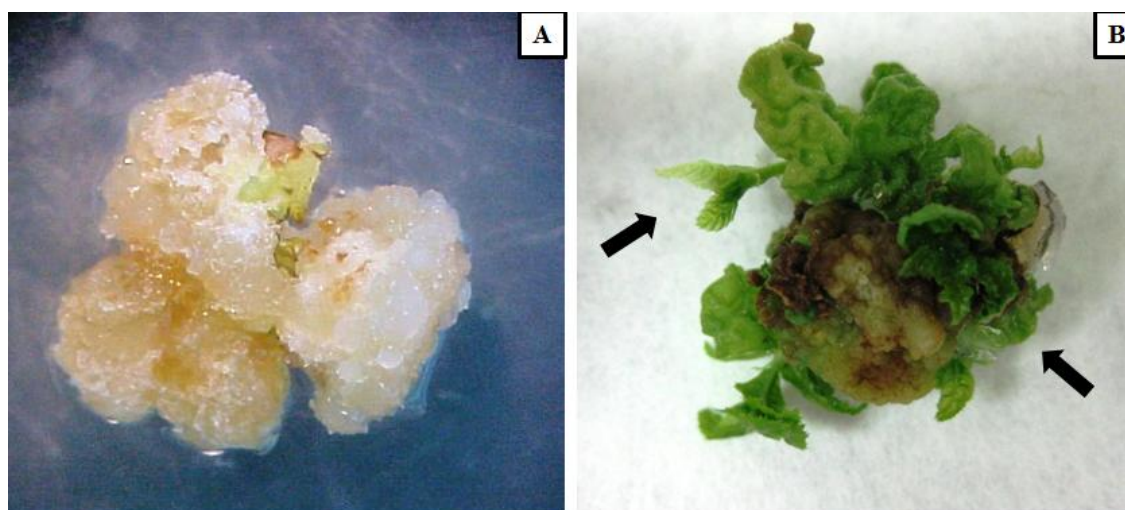


Figura 2. Vista del material empleado en el estudio en sus respectivos medios de cultivo. A) Callo no morfogénico B) Callo organogénico

2.2.1 Variables evaluadas. Se determinó el perfil de metilación generado por cinco combinaciones de partidores en la técnica de MSAP aplicada en muestras de callo organogénico propagado a través de organogénesis adventicia y callo no morfogénico. Para ello se extrajo ADN a ambos tejidos mantenidos en medio con reguladores de crecimiento. En cada caso se extrajo ADN a 24 unidades muestrales.

2.3 Extracción de ADN

Se tomaron porciones de entre 100-150 mg de peso fresco, que fueron cortados en pequeños trozos y puestos en un tubo conteniendo dos esferas de cerámica. Estos materiales fueron homogenizados empleando el equipo de lisis celular Precellys 24 durante 15s a una velocidad de vibración de 6000rpm, posteriormente, se siguió el protocolo de extracción de DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN®) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La calidad y concentración del ADN obtenido fue medido por el espectrofotómetro ND-1000, Nanodrop®. La pureza de las muestras se determinó a través de los índices de absorbancia $OD_{260/280}$ y $OD_{260/230}$, donde se realizaron dos mediciones analíticas. La integridad del ADN fue medida mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% corrido durante 30 min a 70 V visualizado con luz UV en un transiluminador.

2.4 Amplificación de polimorfismos sensibles a metilación (MSAP)

El método se desarrolló basado en el protocolo publicado por Hasbún *et al.* (2011) para AFLP considerando la utilización de las enzimas de restricción HpaII y MspI, en combinación con EcoRI. La optimización del método de MSAP se realizó para las etapas de digestión de ADN genómico, preamplificación y amplificación selectiva, con muestras de callo organogénico y no morfogénico de *N. alpina*, cuyo ADN fue obtenido siguiendo los pasos descritos en el punto 2.3.

2.4.1 Digestión y ligación. Se digirieron 5,5 μ L de ADN genómico durante 2 h a 37°C con 5 U de EcoRI y 4 U de HpaII o MspI (New England Biolabs) en reacciones separadas usando 1x T4 DNA buffer ligasa (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP), 50 μ M NaCl y 50 ng BSA. Adicionalmente, la mezcla digestión/ligación contenía adaptador EcoRI (2 pmol/uL), adaptador HpaII/MspI (2 pmol/uL) y 10 U de T4 ADN ligasa, en un volumen final de reacción de 11 uL. Secuencialmente, la reacción de ligación fue realizada por 1h a 16°C. Posteriormente, las enzimas fueron inactivadas a 65°C por 20 min. Luego de la incubación, los productos fueron diluídos (1:5) con buffer LowTE (1 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA pH 8,0) y guardados a -20°C hasta su uso.

2.4.1.1 Experimento dilución ADN. Para la digestión del ADN genómico, se determinó la concentración óptima de ADN a utilizar realizando diluciones seriadas de ADN extraído de dos muestras de callo organogénico y dos de callo no morfogénico (Tabla 2).

Tabla 2: Diluciones seriadas ADN

Número	ADN (μ l)	Agua nanopura (μ l)	Dilución
1	5,5 sin diluir	5,5	
2	5,5 mezcla 1	5,5	1:2
3	5,5 mezcla 2	5,5	1:4
4	5,5 mezcla 3	5,5	1:8
5	5,5 mezcla 4	5,5	1:16
6	5,5 mezcla 5	5,5	1:32
7	5,5 mezcla 6	5,5	1:64
8	5,5 mezcla 7	5,5	1:128

2.4.2 Pre-amplificación. La reacción de pre-amplificación fue realizada con partidores no selectivos complementarios a la secuencia del adaptador y al sitio de restricción de EcoRI y HpaII-MspI.

La mezcla de pre-amplificación contenía buffer de PCR (20 Mm Tris-HCl pH 8,4 y 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,2 μ M partidor E+00, 0,2 μ M partidor H-M+00, 0,5 U Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) y 15,3 μ L de agua nanopura. A la mezcla de pre-amplificación se agregaron 5 μ L de la mezcla diluida de digestión/ligación obteniendo un volumen final de 25 μ L. La PCR fue realizada en el termociclador The Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystem) usando un programa de PCR que comienza con 4 min a 72 °C, un paso de desnaturación de 30 s a 94 °C, seguido por 28 ciclos de desnaturación de 20 s a 94 °C, 1 min de temperatura de unión de los partidores al templado de ADN y 2 min de extensión a 72°C, y finalmente un ciclo de extensión por 10 min a 72°C. Posteriormente, 10 μ L del producto de PCR fueron visualizados en gel de agarosa 1%, con marcador de peso molecular GenRuler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas) y los 15 μ L restantes fueron diluidos (1:10) en buffer LowTE.

2.4.2.1 Experimento temperatura de alineamiento de los partidores. Para determinar la temperatura óptima de alineamiento de los partidores al ADN templado, se utilizaron cuatro muestras de callo organogénico y cuatro de callo no morfogénico y se realizó una PCR en gradiente desde 50°C a 60°C, variando cada 2°C.

2.4.3 Amplificación selectiva. Se utilizaron 2,5 µL del producto de la amplificación diluido en una reacción de volumen final de 12,5 µL, conteniendo buffer de PCR, 1,5 mM MgCl₂, 0,1 mM de cada dNTP, 0,1 µM partidor E+2 o E+3 marcado con fluoróforo, 0,5 µM partidor H-M+3 o H-M+4, 0,5 U Taq ADN Polimerasa (Invitrogen) y 7,18 µL de agua nanopura. El programa de PCR se realizó con un primer paso de denaturación de 2 min a 94°C, seguido por 30 ciclos de denaturación de 20 s a 94 °C, 1 min de temperatura de alineamiento de los partidores, 2 min a 72 °C, y un ciclo de extensión final de 60 °C durante 30 min. Para corroborar la amplificación 5 µL del producto de PCR fueron visualizados en gel de agarosa 1%, con marcador de peso molecular GenRuler™ 100 pb DNA Ladder (Fermentas).

2.4.3.1 Combinación de partidores. De un total de 100 combinaciones de los partidores selectivos (Tabla 3), se seleccionaron 5 para los posteriores análisis.

Tabla 3. Partidores selectivos MSAP ensayados en *N. alpina*

EcoRI		HpaII/MspI	
AC	ACA	ACC	AATT
CC	ACC	ATG	CGAA
GC	ACG	CCG	CGTT
GG	ACT	CTG	TAGC
TC	ACCG	AACC	TCCA

La elección de las combinaciones se realizó considerando parámetros cualitativos, del modo que se presenta en la Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros para evaluar las combinaciones de partidores para MSAP

Combinación	Dato bruto	Bandeo homogéneo	Forma	Asignación de Liz
EcoRI/HpaII	0	0*	0	0
	1	1*	1	1
	2		2	2
0 = malo 1 = regular 2 = bueno				
* 0= no 1= si				

4.3.2 Experimento temperatura de alineamiento de los partidores. Para determinar la temperatura de óptima de alineamiento los partidores al ADN templado, se utilizaron dos muestras de callo organogénico y dos de callo no morfogénico y se realizó una PCR en gradiente desde 58°C a 68°C, variando cada 2°C.

2.4.4. Análisis de fragmentos. Se utilizaron 2 µL del producto de la amplificación selectiva diluido en 10 µL de formamida y 0,1 µL de estándar de tamaño GeneScanTM 500 LIZ[®] 8 (Applied Biosystems). Los productos de PCR generados fueron visualizados mediante un secuenciador automático ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Los datos fueron analizados utilizando el Software GeneMapper Version 4.0 (Applied Biosystems) y los electroferogramas fueron revisados manualmente para determinar la presencia (1) o ausencia (0) de bandas que presentaban similar forma e intensidad, en un rango desde 50 a 600 pb. Los datos obtenidos a partir de los electroferogramas fueron obtenidos como matrices 1/0 para análisis posteriores.

Utilizando las matrices 1/0 se estudiaron los cambios en el estado de metilación comparando ambos tejidos, considerando el callo organogénico como control comparado con el callo no morfogénico. Se asignaron los estados: metilación *de novo* y demetilación según lo indicado por González *et al.* (2007) (Figura 3).

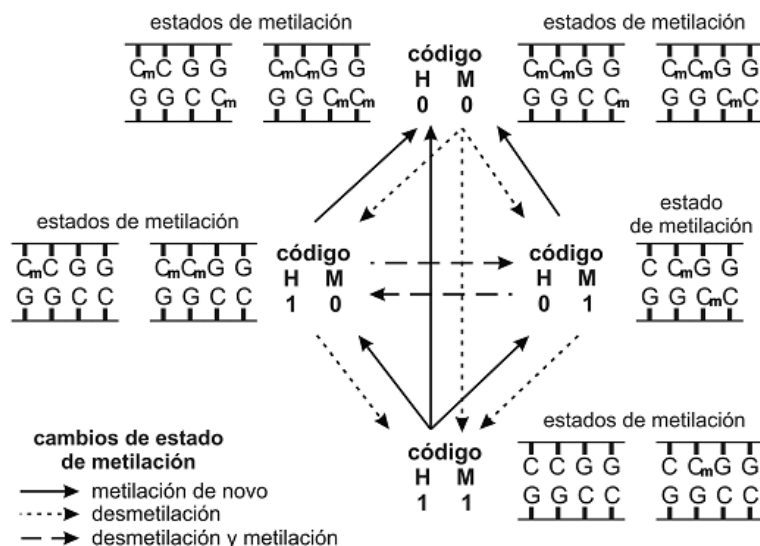


Figura 3. Estados de metilación y cambios detectados por las endonucleasas HpaII (H) y MspI (M). Códigos: 0 = no digestión, 1 = digestión. Figura tomada de González *et al.* (2007).

Usando el programa GenAlex v. 6.4 (Peakall y Smouse 2006) se realizó una matriz de distancia genética, que fue utilizada para el análisis de varianza molecular (AMOVA) entre los tejidos, realizado según el método de Michalakis y Excoffier (1996). El análisis AMOVA se realizó con los datos binarios de todas las combinaciones, mediante 9999 permutaciones al azar y significancia de 95%. A partir del análisis AMOVA se estimó la proporción de varianza atribuida entre y dentro de las muestras; y se realizó el test de significancia de PhiPT entre los tejidos (Michalakis y Excoffier 1996). Para visualizar el patrón de diferenciación epigenética de los tejidos, se construyó un Análisis de Coordenadas Principales (PCA) a partir de la matriz de distancia epigenética usando GenAlex 6.4, basado en el algoritmo de Orloci (1978).

2.5 Validación del método

La validación del método una vez definido, se realizó mediante cálculo de error de genotipificación para cada combinación de partidor. Usando el protocolo optimizado, se tomaron ocho muestras de callo organogénico y ocho de callo no morfogénico y se desarrolló el experimento de MSAP como se describe en el punto 2.4, en dos

experimentos independientes. El error fue determinado comparando las matrices 1/0 de observaciones fenotípicas de cada experimento, analizando por separado la matriz obtenida para los fragmentos de corte EcoRI/HpaII y los de corte EcoRI/MspI. El error fue estimado a nivel alélico según la siguiente fórmula descrita en Herrera y Bazaga (2010).

$100 \times \frac{\text{No. Valores discordantes en dos análisis independientes}}{\text{No. de marcadores} \times \text{No. de individuos}}$

III RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Material inicial y Extracción de ADN

Las extracciones de ADN genómico se realizaron con el material de cultivo fresco mantenido en cámara de crecimiento. En este tejido, con ayuda de pinzas y bisturí se separaron los tallos en crecimiento, a fin de extraer ADN sólo del callo.

El ADN obtenido de los tejidos en estudio poseía la calidad y concentración de ADN requerida para el procedimiento de MSAP (Tabla 1A), no obstante, en algunas muestras el índice $OD_{260/230}$ se encontró fuera del rango óptimo que corresponde a 1,8 a 2,0. Esto probablemente se debió a la presencia de restos de azúcares del medio de cultivo en las muestras. La integridad del ADN fue visualizada por electroforesis en gel de agarosa, donde se observó una banda íntegra, sin presencia de contaminación ni degradación de ADN (Figura 4).

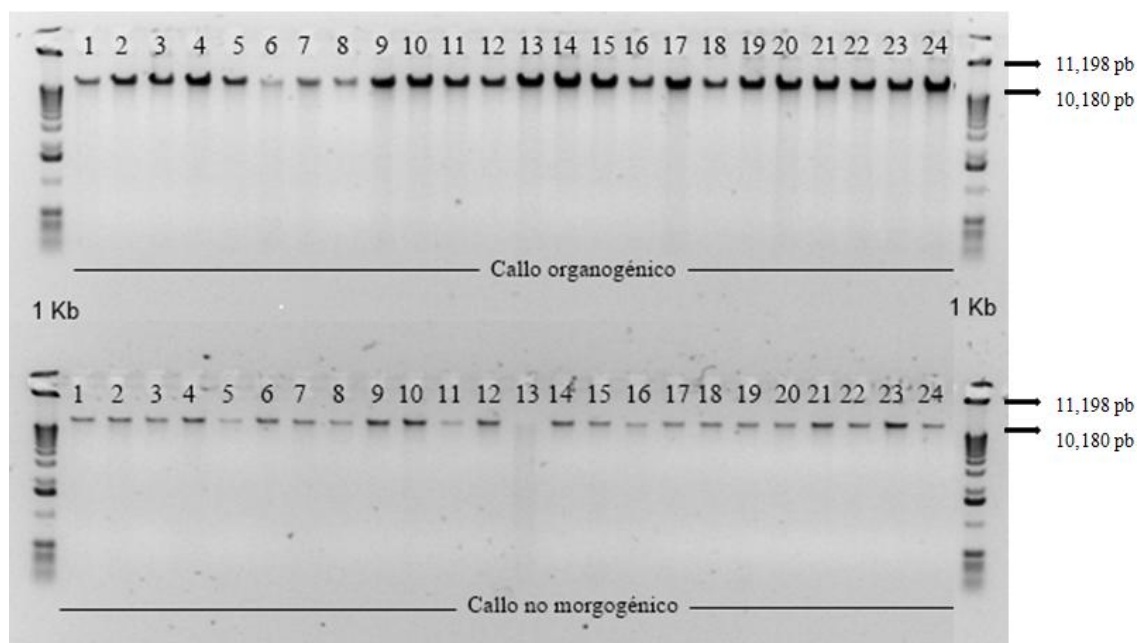


Figura 4. Integridad de ADN para muestras de callo organogénico y no morfogénico de *N. alpina* mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. 1Kb: marcador de peso

3.2 Puesta a punto del método de MSAP

Durante la fase de adecuación del método, la visualización de los productos en las etapas de pre-amplificación y amplificación selectiva (Figura 5) permitió evaluar la correcta amplificación y adaptación del protocolo a las condiciones experimentales. Durante la etapa de pre-amplificación se observan productos de PCR homogéneos entre muestras, generándose un chorreo o mancha de fragmentos menores a 700 pb. En la fase de amplificación selectiva, los productos amplificados se concentran entre 100 y 600 pb.

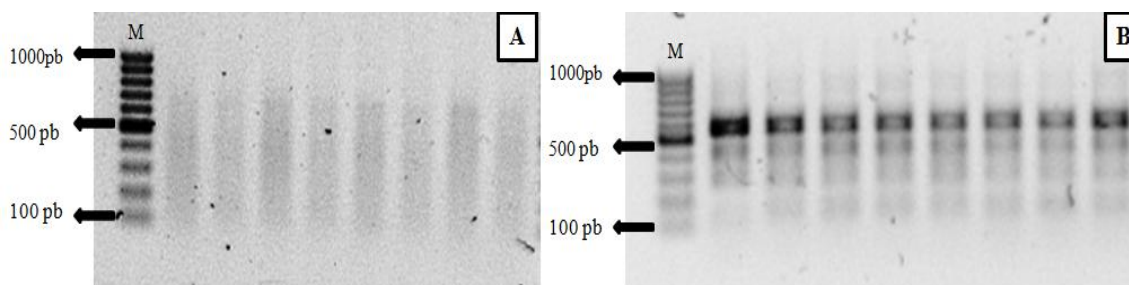


Figura 5. Visualización de etapas de método MSAP mediante electroforesis en geles de agarosa. A) Pre-amplificación. B) Amplificación selectiva con las combinaciones de partidores E+ACA/H-M+TAGC. M: Marcador de peso 100 pb.

Del experimento de diluciones de ADN genómico se determinó que la dilución 1:4 permite visualizar un patrón de bandeo reproducible para una muestra, y equilibrio entre bandas que amplifican y otras que no amplifican (Figura 6). Considerando esto y los valores de concentración de ADN de las muestras a utilizar en el estudio (Tabla 1A), se destaca la alta sensibilidad del método, ya que se permite utilizar concentraciones que varían entre 3 ng/ μ L y 12 ng/ μ L.

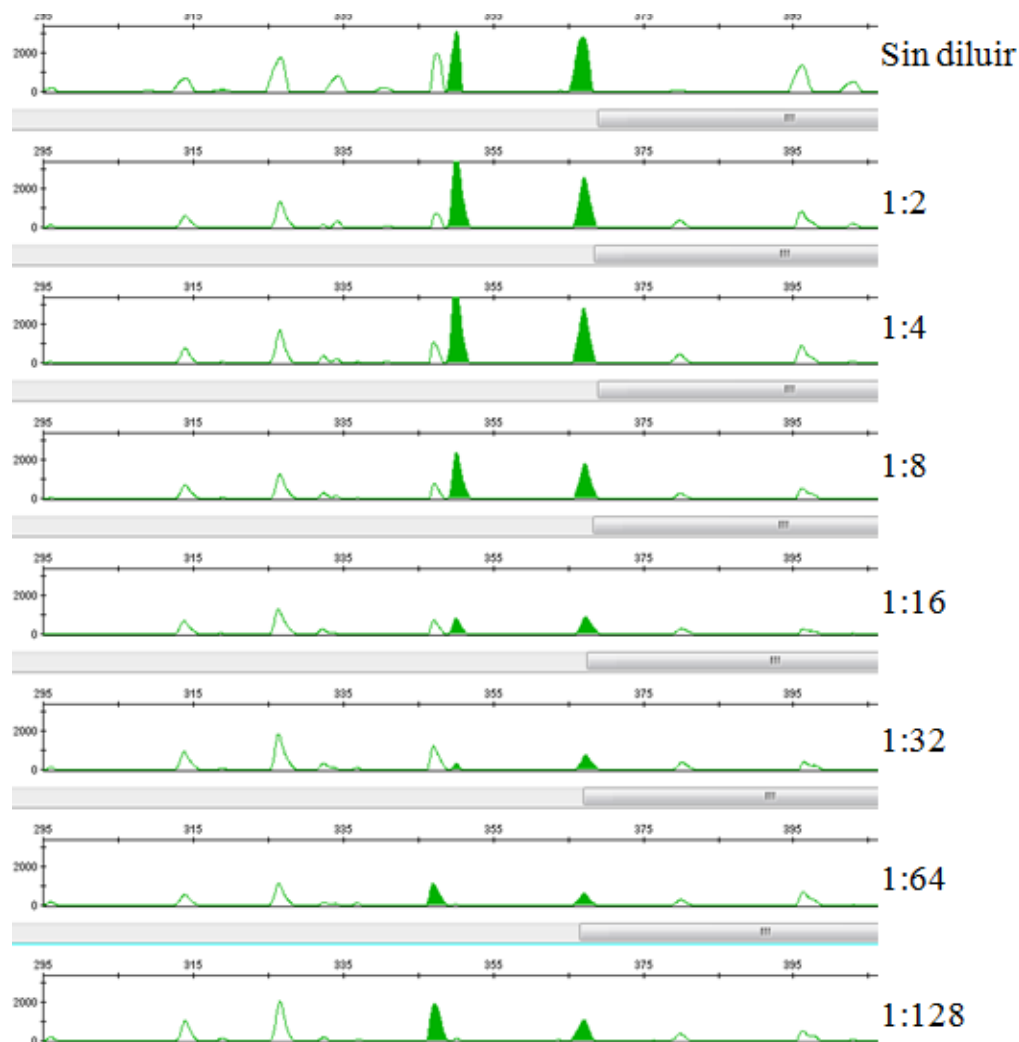


Figura 6. Electroferograma representativo de diluciones seriadas de ADN en una muestra de *N. alpina*, etapa selectiva E+ACA/H-M+ACC. Los picos marcados destacan alelos variables debido a la dilución del ADN.

El ajuste del método en la etapa de pre-amplificación, mostró que usar diferentes temperaturas de alineamiento de los partidores tiene efectos cualitativos visibles cuando se cargan los productos de la pre-amplificación en un gel de agarosa (Figura 7). Si se comparan estos resultados con lo esperado (Figura 5A) se observa que sólo la temperatura 60°C muestra un patrón de corrida erróneo. Sin embargo, considerando que los partidores E+00 y H-M+00 tienen temperaturas de alineamiento de 53,8 °C y 60,3 °C, respectivamente (Fuente: Integrated DNA Technologies) se eligió la temperatura de 56 °C para los posteriores análisis, ya que es la más cercana al promedio de las temperaturas de ambos partidores.

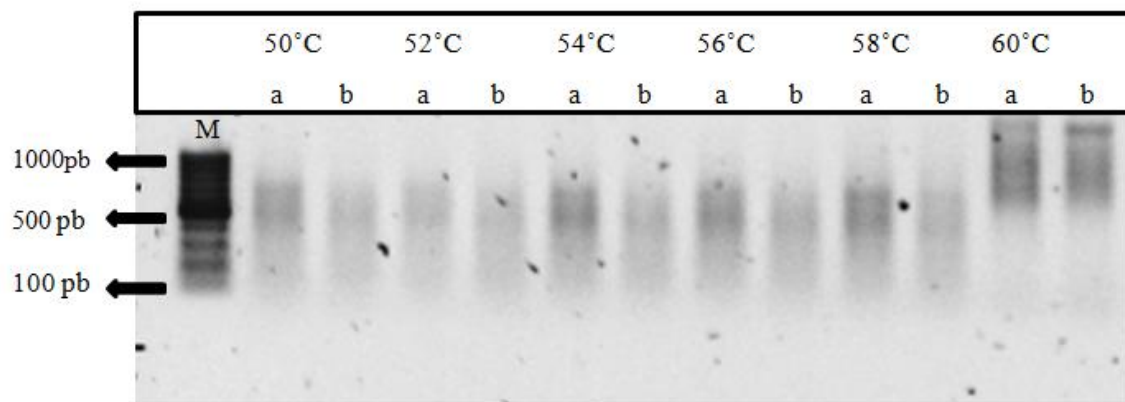


Figura 7. Visualización de etapa de pre-amplificación con diferentes temperaturas de alineamiento del método MSAP mediante electroforesis en gel de agarosa. a: Productos corte con HpaII. b: Productos corte con MspI. M: Marcador de peso 100 pb.

Para la etapa de amplificación selectiva se seleccionaron cinco combinaciones de partidores E/H-M. En la Figura 8 se visualizan las características evaluadas en los electroferogramas de la amplificación de los productos. Estas características cobran importancia para realizar el análisis de los productos y convertir los datos de numerosos perfiles en matrices de 1/0. Es importante que el estándar de tamaño asigne correctamente cada fragmento a su tamaño (en pb), ya que puede ingresar errores en los perfiles, dificultando la asignación de los valores presentes/ausentes. Por otro lado, parámetros como bandeo homogéneo y forma de los picos permitieron seleccionar aquellas combinaciones que entregan perfiles de bandeo claros y reproducibles para muestras de un mismo tejido.

De las 100 combinaciones ensayadas, un 46% presentó un dato bruto diferente al esperado y del 54% restante, sólo 29 (53,7%) de ellas presentaron bandeo homogéneo. De estas, 24 presentaron forma de los picos regular o buena, sin embargo, sólo 7 presentaron una correcta asociación del marcado de tamaño 500 LIZ® con la muestra.

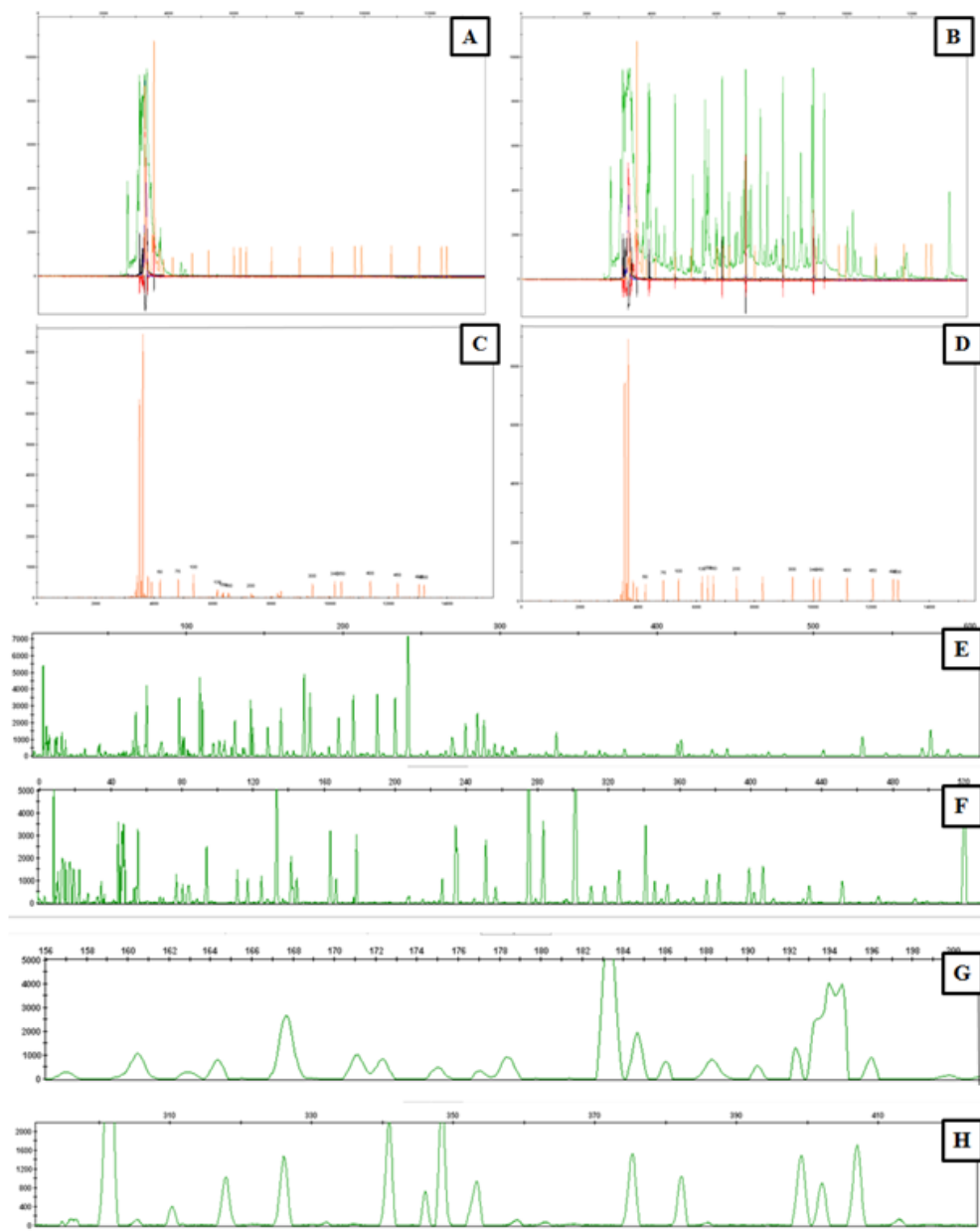


Figura 8. Parámetros evaluados en la elección de las combinaciones de partidores selectivos. A) Visualización de dato bruto con errores. B) Visualización de dato bruto esperado. C) Visualización de mala corrida del estándar de tamaño 500 LIZ. D) Visualización de estándar de tamaño 500 liz esperado. E) Espectroferograma de combinación selectiva con bandeo no homogéneo de fragmentos. F) Espectroferograma de combinación selectiva con bandeo homogéneo. G) Zoom visualizando espectroferograma con alelos con errores de amplificación. H) Zoom visualizando espectroferograma con alelos forma esperada.

Con las combinaciones de partidores selectivos seleccionadas, se demostró que diferentes temperaturas de alineamiento de los partidores (58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C y 68°C) tiene efectos cuantitativos y cualitativos evidentes en el perfil de bandeó (Figura 9). Como se visualiza, el número de *picos* cambia con la temperatura de alineamiento, así como la separación de los *picos* y la intensidad de estos. Se determinó que para aquellas combinaciones que cuentan con tres bases selectivas (combinaciones 1, 2 y 3) es mejor una temperatura de 66°C y para aquellas de dos bases selectivas (combinaciones 4 y 5) es mejor la temperatura de 62°C.

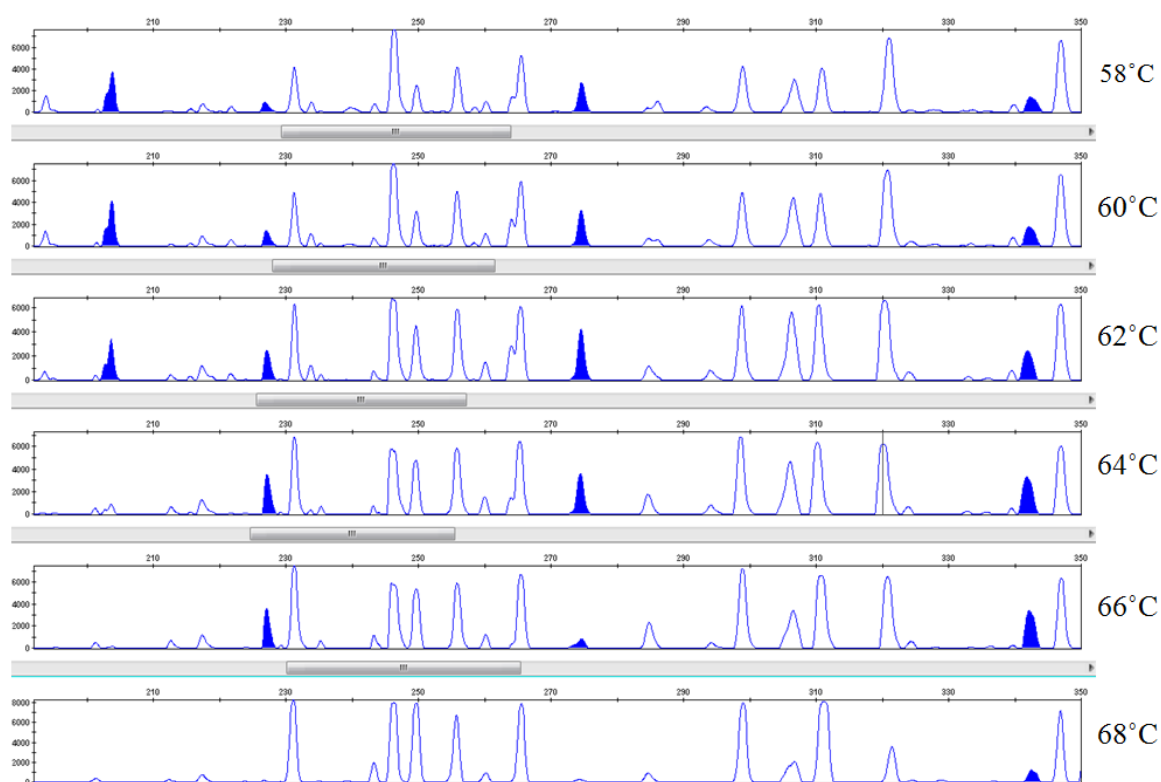


Figura 9. Electroferograma de MSAP de una muestra de *N. alpina*. Se muestra el protocolo optimizado usando seis diferentes temperaturas de alineamiento (58°C, 60°C, 62°C, 64°C, 66°C y 68°C) para la amplificación selectiva combinación E+GC/H-M+ACC. En los *picos* pintados se destacan alelos variables debido a la temperatura de alineamiento, mostrando cambio en la amplificación de los productos.

Ya con el protocolo de MSAP definido se estudió el error de análisis para las combinaciones seleccionadas, donde se obtuvieron porcentajes de error variando entre 0,0% y 2,62% (Tabla 5). En otro estudio, el porcentaje de error de análisis para loci MSAP ha sido estimado mediante la repetición del experimento, obteniéndose valores que varían en 1,85% y 5,07% (Herrera y Barraza 2010).

Tabla 5. Combinación de partidores MSAP seleccionados, proporción de polimorfismo y error asociado a cada combinación E/H-M

Combinación de partidores	Número de marcadores MSAP	Polimorfismos (%)		Proporción error (%)*	
		HpaII	MspI	HpaII	MspI
1. E+ACA/ H-M+CCG	32	12.5	21.9	0.39	1.17
2. E+ACA/ H-M+ACC	35	14.3	8.6	1.43	1.79
3. E+ACA/ H-M+TAGC	28	10.7	14.3	0.00	0.89
4. E+CC/ H-M+CGTT	43	0.0	0.0	1.60	2.47
5. E+GC/ H-M+ACC	43	14.0	7.0	0.15	2.62
Total	181	9.9	9.4	0.76	1.90

* Calculado para 16 muestras como $100 \times (\text{número de valores discordantes en dos experimentos independientes}) / (\text{número de marcadores} \times \text{número de individuos})$.

Los errores visualizados correspondieron a bandas que se presentaron aleatoriamente en muestras de los tejidos, no muestran un patrón ni un ordenamiento particular.

Considerando el porcentaje de polimorfismo estimado para cada combinación de partidores (Tabla 5), y error para cada una de estas, la combinación de partidores E+CC/H-M+CGTT debería eliminarse del análisis en futuros estudios, ya que no aporta información referente a sitios diferenciales en metilación de ADN entre los tejidos en estudio. Se espera que una buena combinación, además de presentar buenas características de bandeo, debe ser capaz de discriminar muestras de ADN de diferentes tejidos y muestras de un mismo tejido.

3.3 Análisis mediante MSAP

El uso de las enzimas de restricción HpaII y MspI, con sensibilidad diferencial a la metilación de citosinas en el contexto CCGG, permitió visualizar diferentes perfiles de metilación en los tejidos en estudio. Mediante la utilización de cinco combinaciones de partidores selectivos, se amplificaron un total de 168 fragmentos. Los análisis de AMOVA indicaron que el 57% de la variación molecular fue explicada por diferencias en el comportamiento frente a las enzimas de restricción ($\text{PhiPT} = 0,57$, $P = 0,0001$) y el 43% por diferencias entre los tejidos en estudio ($\text{PhiPT} = 0,429$, $P = 0,0001$). Los resultados del Análisis de Componentes Principales (PCA) mostraron que los dos primeros componentes fueron capaces de recoger el 97,95% de la varianza. Estos componentes permitieron el ordenamiento de los datos (Figura 10), el primer componente que recoge el 68,95% de la varianza corresponde al comportamiento frente a las enzimas de restricción y el segundo componente, que corresponde al 29,30% de la varianza, corresponde a la diferencia entre los tejidos en estudio.

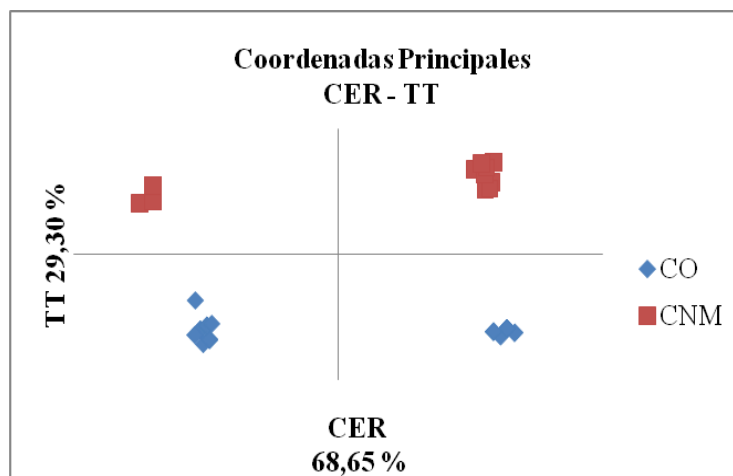


Figura 10. Análisis de Componentes Principales (PCA) representando la variación en los en metilación de ADN entre diferentes tejidos. CER: corte con enzimas de restricción. TT: tipo de tejido. CO: callo organogénico. CNM: callo no morfogénico.

De los loci amplificados 69,0% fueron monomórficos y el 31% restante fragmentos polimórficos asociados a diferentes eventos de metilación (Tabla 6). De estos fragmentos un 4,8% correspondieron a eventos de desmetilación en el callo no

morfogénico con respecto al control (callo organogénico), y 14,9% de los fragmentos se relacionaron con procesos de metilación *de novo*.

Tabla 6. Patrón de metilación en sitios específicos determinado mediante MSAP en Callo no Morfogénico con respecto a Callo Organogénico de un clon de *N. alpina*

Tipo de fragmento	Loci					Total (%)
	ACA/CCG	ACA/ACC	ACA/TAGC	CC/CGTT	GC/ACC	
Monomórfico	20	18	18	30	30	116 (69.0)
Demetilación	2	2	1		3	8 (4.8)
Metilación <i>de novo</i>	7	4	3		11	25 (14.9)
Específico de EcoRI/HpaII	4	4	4	3		15 (8.9)
Específico de EcoRI/MspI		4				4 (2.4)
Total	33	32	26	33	44	168

El 31% de fragmentos polimórficos obtenido según la Tabla 6, se descompuso de acuerdo a fragmentos producidos diferencialmente por la digestión con las enzimas de restricción. La Figura 11 resume los loci polimórficos MSAP. La mayor proporción de fragmentos en callo organogénico (CO) y callo no morfogénico (CNM) fue observada por el corte con HpaII, pero no con MspI, en 40,2% y 44,2%, respectivamente. Esto indicó que la mayoría de las secuencias presentaron hemimetilada la citosina externa. Por otro lado, la baja diferencia entre los tejidos puede indicar que esos sitios siempre se mantienen metilados en *N. alpina*. En cuanto a los fragmentos exclusivos producidos por corte con la enzima de restricción MspI, en CO fue de 13,5% y en CNM de 21,2%, lo que indicó que la citosina interna estaba metilada en ambas cadenas de la secuencia y la

citósina externa demetilada. Los fragmentos producidos por ambas enzimas indicaron que la secuencia se encontró no metilada o presentó hemimetilada la citósina interna, en CO y CNM la proporción de estos fragmentos fue de 34,6% y 9,6%, respectivamente. La ausencia de fragmentos indicó que ni HpaII ni MspI cortó en ese sitio, indicando que la secuencia se encontró completamente metilada en la citósina externa, para estos tejidos, los porcentajes fueron de 11,5% en CO y 25% en CNM.

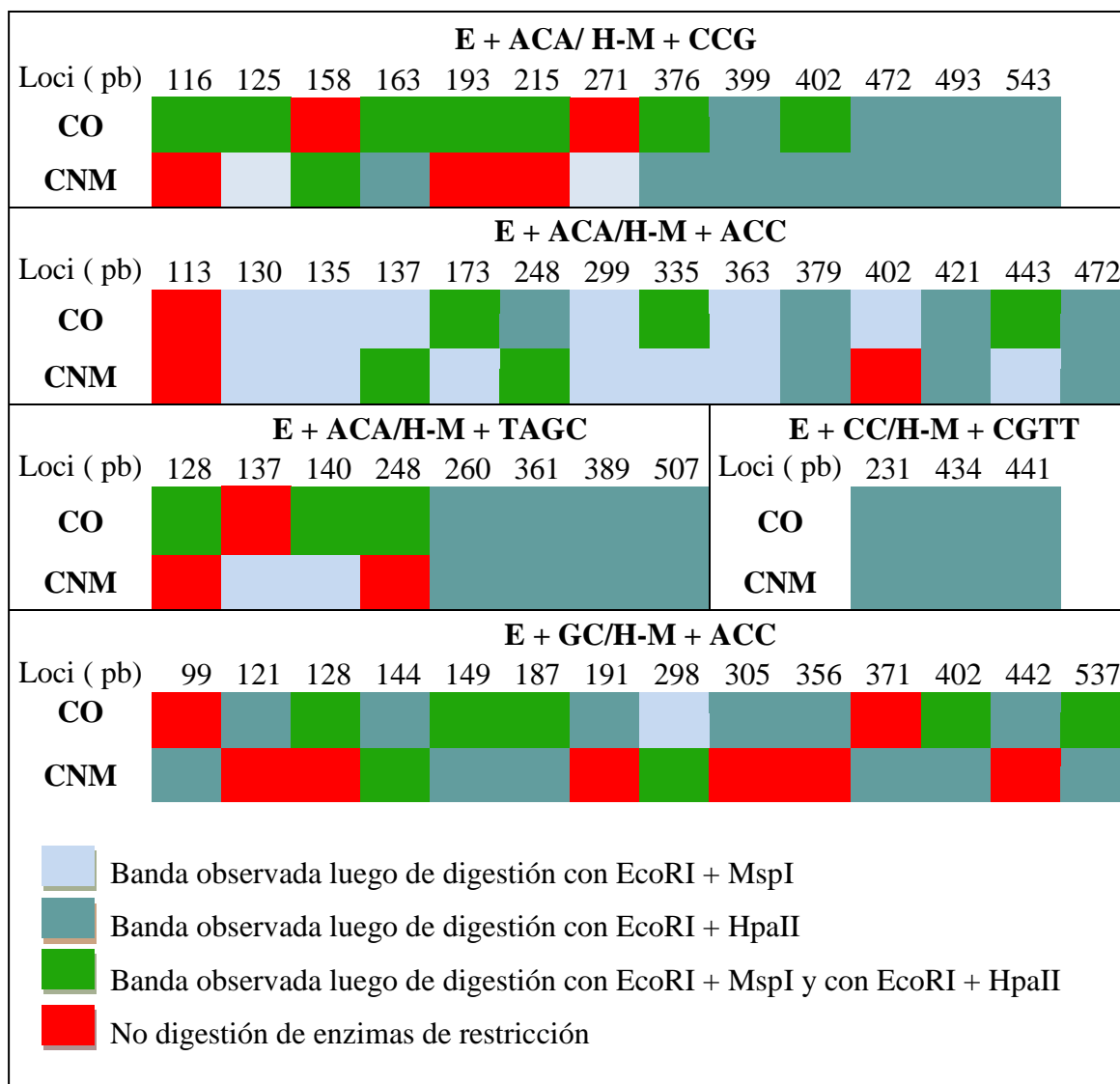


Figura 11. Patrones MSAP (EcoRI/MspI y EcoRI/HpaII) de *N. alpina*. Loci MSAP polimorficos (tamaños en pb) detectados en callo organogénico y callo no morfogénico.

La baja proporción de secuencias no metiladas o con la citosina interna hemimetilada (una de las cadenas metilada) en CNM (9,6%) con respecto a CO (34,9%), y por otro lado, la mayor cantidad de secuencias con citosina externa completamente metilada en CNM (25%) con respecto a CO (11,5%), puede ser una razón que explique la diferencia en la competencia morfogénica del tejido. Mientras varios reportes indican que la variación genética encontrada ocurre relativamente a bajas frecuencias (Polanco y Ruiz 2002, Chuang *et al.* 2007, Vroh-Bi *et al.* 2011, Cartes 2012), variaciones en los patrones de metilación de ADN muestran ser mucho más frecuentes y en algunos casos estos han sido directamente implicados en la variación fenotípica (Miguel y Marum 2011).

La variación genética encontrada en *N. alpina*, estudiada como la proporción de variación somaclonal producto de subcultivos sucesivos en cultivo *in vitro*, es cerca de un 3% (Cartes, 2012). Si consideramos estos antecedentes y que cerca del 10% de la variación entre los tejidos se debe a metilación *de novo* en CNM, sumando las altas diferencias fenotípicas entre los tejidos, se puede hipotetizar que la metilación del ADN estaría actuando en la regulación de genes de importancia en lo que respecta a competencia y determinación de los tejidos. Miguel y Marum (2011) indican que esta intervención en el fenotipo se debe a modificaciones en la expresión de genes. En animales, la regulación de promotores de genes dependientes de metilación de ADN ha sido destacada por tener un rol importante en el desarrollo y la diferenciación (Berdasco *et al.* 2008), donde la represión de genes involucrados en diferenciación celular mediada por hipermetilación involucra resultados aberrantes (Esteller 2002). Sin embargo, en plantas se tiene poca información sobre la metilación del ADN en mecanismos involucrados en el control de la diferenciación celular. En trabajo previos, se ha encontrado que la pérdida del estado diferenciado en protoplastos es acompañado por cambios globales en metilación del ADN (Koukalova *et al.* 2005, Miguel y Marum 2011).

Para el caso de los tejidos en estudio, el callo es una masa de células en activa división celular y que, en respuesta a señales ambientales específicas, estas células adquieren

competencia para cambiar de fase mediante un proceso de desdiferenciación seguido por la expresión de una nueva ruta de desarrollo (Miguel y Marum 2011), sin embargo, los tejidos callogénicos presentan grupos de células heterogéneos entre sí, los que a la vez podrían presentar diferentes perfiles de metilación (Zhang y Jeltsch 2010, Massicotte *et al.* 2011). La presencia de un perfil de metilación de ADN bien definido en plantas, es necesario para el crecimiento y desarrollo normal del organismo (Zilberman *et al.* 2007). En futuros estudios, se pueden considerar distintas alternativas para investigar la metilación del ADN en tipos celulares específicos, como lo son el uso de técnicas de microscopía, microdissección láser (Zluvova *et al.* 2001), o técnicas cuantitativas, mediante la transformación de los datos de la matriz 1/0 entregada por el programa GeneMapper v4. Utilizando el programa Data File Converter para datos ABI, FSA y SDS (v10. Applied Biosystems) se ha logrado cuantificar los niveles de fluorescencia, permitiendo estudiar cambios de un locus MSAP en diferentes muestras (López *et al.* 2012).

La aplicación de la técnica de MSAP en callos de *N. alpina* permitió identificar marcadores polimórficos de metilación de ADN entre callos con diferente capacidad organogénica, y con el uso de las combinaciones de partidores seleccionadas se estudió la metilación en sitios CpG del genoma de *N. alpina*. En otros estudios con células en suspensión y callos de *A. thaliana*, se ha encontrado hipermetilación en promotores en sitios CpG sugiriendo que la metilación de sitios CpG en promotores específicos puede ser importante para la regulación de la expresión de algunos genes (Berdasco *et al.* 2008).

Los resultados de este trabajo entregan las primeras evidencias acerca de la utilidad de la determinación del perfil de metilación de ADN genómico como marcador de procesos organogénicos en la especie *Nothofagus alpina*. Sin embargo, aunque el método MSAP muestra ser un método eficiente para la detección de alteraciones en metilación de citosinas, este método sólo permite investigar una pequeña porción de las citosinas metiladas en el genoma de la especie, debido a que la detección está restringida a los

sitios de reconocimiento de los isoesquizómeros utilizados, limitándola para ser aplicada en la cuantificación global de 5-mdC. Estos resultados pueden ser complementados con la aplicación de tecnologías de alto rendimiento como secuenciación de segunda generación (Zhang y Jeltsch 2010), a fin de estudiar los loci polimórficos observados entre los callos organogénico y no morfogénico y su relación con la expresión de genes involucrados en procesos organogénicos (Yang *et al.* 2011).

En *N. alpina*, los niveles menores de metilación global de ADN encontrados en CO, entregan indicios acerca de una posible validación molecular relacionada a este tejido, el cuál presenta mayor competencia organogénica que el callo no morfogénico. No obstante, Zhu (2009) descubrió una glicosilasa de ADN con actividad demetilante, ya que, suprime la metilación del ADN y activa la expresión génica. Considerando lo anterior, la aplicación de esta enzima en callo no morfogénico podría revertir su estado no morfogénico y activar la expresión de genes relacionados con organogénesis.

IV CONCLUSIONES

La optimización de diversos parámetros en el protocolo de MSAP permite obtener perfiles de metilación en callo organogénico y no morfogénico de *Nothofagus alpina*.

El uso de las enzimas de restricción HpaII y MspI permite identificar cambios en el estado de metilación de sitios en el genoma relacionados con eventos de metilación *de novo* y demetilación. Los resultados de la presente investigación suponen una relación directa entre el ADN metilado y la respuesta organogénica *in vitro*.

Los resultados obtenidos permiten guiar la selección de loci polimórficos que podrían diferenciar los tejidos y que están involucrados en la expresión de genes relacionados con la competencia y determinación.

V RESUMEN

En la micropropagación de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst) en cultivo *in vitro* mediante organogénesis indirecta, ocurren procesos claves para la activación de una ruta particular de desarrollo mediada por el control epigenético de la transcripción. La metilación del ADN tiene un rol importante, ya que la presencia de 5-metilcitosina (5-mdC) en el promotor de genes específicos altera el lugar de unión de factores de transcripción y otras proteínas del ADN, jugando un rol clave en la expresión génica y diferenciación de los tejidos. El objetivo del presente estudio fue determinar el perfil de metilación de ADN en callo organogénico y no morfogénico de *Nothofagus alpina* aplicando la técnica de Polimorfismos amplificados sensibles a la metilación (MSAP). Para el estudio, el ADN genómico fue digerido con las enzimas de restricción HpaII y MspI y amplificado utilizando cinco combinaciones de partidores selectivos. Se amplificaron un total de 168 loci, de los cuales el 31% fueron polimórficos asociados a diferentes eventos de metilación, donde 14,9% corresponde a metilación *de novo* en callo no morfogénico con respecto al organogénico. Cuando se analizaron en detalle los loci polimórficos, se obtuvieron mayores porcentajes de metilación completa y hemimetilación en callo no morfogénico. La optimización de diversos parámetros en el protocolo de MSAP permitió obtener perfiles de metilación diferenciales en los tejidos, lo que supuso una relación directa entre el ADN metilado y la morfogénesis *in vitro*.

VI ABSTRACT

In the micropropagation of Raulí (*Nothofagus alpina* ((Poepp. et Endl.) Oerst) cultured *in vitro* by indirect organogenesis, key processes occur for the activation of a particular path of development mediated by epigenetic control of transcription. DNA Methylation is known to play an important role, because the presence of 5-methylcytosine (5-MDC) in the promoter of specific genes alters the binding of transcriptional factors and other proteins to DNA, playing a key role in gene expression and tissues differentiation. The aim of this study was to determine the DNA methylation profile in organogenic callus and non morphogenic callus in *Nothofagus alpina* using the technique methylation sensitive amplified polymorphism (MSAP). For this study, genomic DNA was digested with HpaII and MspI restriction enzymes and amplified using five combinations of selective primers. Were amplified a total of 168 loci, which 31% were associated with different polymorphic methylation events, which corresponds to 14.9% *de novo* methylation in non morphogenic callus compared to organogenic callus. When it was analyzed in detail the polymorphic loci was obtained higher percentage of full methylation and hemimethylation in non morphogenic callus. Optimization of different parameters on the MSAP protocol yielded differential methylation profiles in the tissues in study, which involves a direct connection between DNA methylated and morphogenesis *in vitro*.

VII REFERENCIAS

1. Alberts, B.; D. Bray; J. Lewis; M. Raff; K. Roberts y J.D. Watson. 1994. Molecular Biology of the Cell. Third edition. Garland Publishing. New York, USA. 1294 p.
2. Baldini, A. y L. Pancel. 2000. Agentes de daño en el bosque nativo. Editorial Universitaria S.A. Santiago, Chile. 408 p.
3. Baurens, F.C.; F. Bonnot; D. Bienvenu; S. Causse y T. Legavre. 2003. Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome. Plant Molecular Biology Reporter 21: 339-348
4. Berdasco, M.; R. Alcazar; M.V. García-Ortiz; E. Ballestar; A.F. Fernández; T. Roldan-Arjona; A.F. Tiburcio; T. Altabella; N. Buisine; H. Quesneville; A. Baudry; L. Lepiniec; M. Alaminos; R. Rodríguez; A. Lloyd; V. Colot; J. Bender; M.J. Canal; M. Esteller and M.F. Fraga. 2008. Promoter DNA Hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* Cells. Plos One 3(10): e3306
5. Bucherna, N.; E. Szabo; L.E. Heszky y I. Nagy. 2001. DNA methylation and gene expression differences during alternative *in vitro* morphogenetic processes in eggplant (*Solanum melongena* L.). *In vitro cellular & developmental biology-plant* 37: 672-677
6. Burschel, P; C. Gallegos; O. Martínez y W. Moll. 1976 Composición y Dinámica regenerativa de un bosque virgen mixto de Raulí y Coigue. Universidad Austral de Chile, Valdivia. Bosques (Chile) 1: 55-74

7. Cabrera, J. 2000. Importancia económica de los bosques de *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua*. En Domesticación y mejora genética de Raulí y Roble. R. Ipinza, B. Gutiérrez y V. Emhart (eds.). Instituto Forestal, Universidad Austral de Chile. pp. 11-23
8. Cartes, P. 2012. Validación de rutas morfogénicas para la clonación de Raulí (*Nothofagus alpina* (Poepp. et Endl.) Oerst) a partir de tejidos embrionarios y adultos. Trabajo no publicado, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
9. Cervera, M.T.; L. Ruiz-García y J.M. Martínez-Zapater. 2003. Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular genetics and genomics* 268: 832-833
10. Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39
11. Chavan, J.J.; M.S. Nimbalkar; N. B. Gaikwad; G.B. Dixit y S.R. Yadav. 2011. In vitro propagation of *Ceropegia spiralis* Wight - An endemic and rare potential ornamental plant of peninsular India. *Proceedings of the national academy of sciences india section B-biological sciences* 81: 120-126
12. Chen, M.; S. Lv y Y. Meng. 2010. Epigenetic performers in plants. *Development growth and differentiation* 52(6): 555-566
13. Chuang, S.; L. C. Li, J. Jih, W. Yu y J. Min. 2007. Detection of somaclonal variation in micropropagated *Echinacea purpurea* using AFLP marker. *Scientia horticultrae* 120: 121-126

14. Corral, P.; R. Mallon; J. Rodríguez-Oubina y M.L. González. 2011. Multiple shoot induction and plant regeneration of the endangered species *Crepis novoana*. *Plant cell tissue and organ culture* 105: 211-217
15. Dewitte, W. y J.A.H. Murray. 2003. The plant cell cycle. *Annual review of plant biology* 54: 235-264
16. Donoso, P.; C. Donoso; P. Marchelli; L. Gallo y B. Escobar. 2006. *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. Et Mil. En Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina *Autoecología*. C. Donoso (ed.). Marisa Cuneo Ediciones. Valdivia, Chile. pp. 448-461
17. Elshire, R.; J. Glaubitz; Q. Sun; J. Poland; K. Kawamoto; E. Buckner y S. Mitchell. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for high diversity species. *Plos One* 6: e19379
18. Esteller, M. 2002. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427–5440
19. Feng, S.; S.E. Jacobsen y W. Reik. 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330: 622–627
20. Finnegan, E.J.; R.K. Genger; W.J. Peacock y E.S. Dennis. 1998. DNA methylation in plants. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology* 49: 223-247
21. Fraga, M.F.; R. Rodríguez y M.J. Cañal. 2002. Genomic DNA methylation/demethylation during ageing-reinvigoration of *Pinus radiata* D.Don. *Tree physiology* 22:813–816

22. Gallo, L.; P. Marchelli; M. Azpilicueta y P. Crego. 2006. El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a Raulí y Roble. *Bosque* 27: 3-15
23. George, E.; M. Hall y G. De Klerk. 2008. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Third edition. Published by Springer. Dordrecht, The Netherlands.
24. Goll, M.G. y T.H Bestor. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annual Review of biochemistry* 74: 481–514
25. González, A. I.; V. Alaiz; C. Polanco y M.L. Ruiz. 2007. Análisis del estado de metilación en plantas de centeno obtenidas por embriogénesis somática. En VII reunión Sociedad Española de Cultivo *In Vitro* de Tejidos Vegetales. M. Toribio, M.C. Sánchez, J.M. González y J. Alegre (eds.). Alcalá de Henares, España.
26. Gutiérrez, B. 2003. Mejoramiento genético y Conservación de recursos forestales nativos en Chile. *Investigación agraria: Sistemas y recursos forestales* 12: 145-153
27. Hasbún, R; C. Iturra; P. Moraga; P. Wachtendorff; P. Quiroga y S. Valenzuela. 2011. An efficient and reproducible protocol for production of AFLP markers in tree genomes using fluorescent capillary detection. *Tree genetics and genomics* 1-7
28. Henderson, I.R. y S.E. Jacobsen. 2007. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418-424

29. Herrera, C. y P. Bazaga. 2010. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. *New phytologist* 187: 867–876 867
30. Ikemori, Y.; R. Penchel y F. Bertolucci. 1994. Integrating biotechnology into *Eucalyptus* breeding. En *International Wood biotechnology symposium*, August 31th- September 1th. Tokio, Japan. pp. 77-84
31. Instituto Forestal (INFOR). 2009. Superficie de bosques plantados por especie. Centro de información forestal, Sede Metropolitana, Chile.
32. Ipinza, R. y B. Gutiérrez. 2000. Estrategia de Mejora Genética para *Nothofagus alpina* y *Nothofagus obliqua* en Chile. En *Domesticación y Mejora Genética de Raulí y Roble*. R. Ipinza, B. Gutiérrez y V. Emhart (eds.). Instituto Forestal, Universidad Austral de Chile, Chile.
33. Jaligot, E.; A. Rival; T. Beule; S. Dussert y J.L. Verdeil. 2000. Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant cell reports* 19: 684-690
34. Jiménez, E. 1998. Generalidades del cultivo in vitro. En *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. J. Pérez (ed.). Instituto de Biotecnología de Plantas. Santa Clara, Cuba. pp. 13-24
35. Koukalova, B.; M. Fojtova; K.Y. Lim; J. Fulneck; A.R. Leitch y A. Kovarik. 2005. Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. *Plant physiology* 139(1): 275–286

36. López, C; P. Morán; F. Lago; M. Espiñeira; M. Beckmann y S. Consuegra. 2012. Detection and quantification of tissue of origin in salmon and veal products using methylation sensitive AFLPs. *Food chemistry* 131: 1493-1498
37. Lu, Y.L.; T.Z. Rong y M.J. Cao. 2008. Analysis of DNA methylation in different maize tissues. *Journal of Genetics and Genomics* 35: 41-48
38. Massicotte, R.; E. Whitelaw y B. Angers. 2011. DNA Methylation: A source of random variation in natural populations. *Epigenetics* 6:421-427
39. Meins, F. 1986. Determination and morphogenetic competence in plant tissue culture. En *Plant cell culture technology*. M. Yeoman (ed.). Blackwell Scientific publications, Oxford. pp. 7-25
40. Meng, L.; S.B. Zhang y P.G. Lemaux. 2010. Toward molecular understanding of *in vitro* and in planta shoot organogenesis. *Critical reviews in plant sciences* 29: 108-122
41. Michalakis, Y. y L. Excoffier. 1996. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite loci. *Genetics* 142: 1061-1064
42. Mi, S. y R.J. Roberts. 1992. How M-MSPL and HPALL decide which base to methylate. *Nucleic acids research* 20: 4811-4816
43. Miguel, C. y L. Marum. 2011. An epigenetic view of plants cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of experimental botany advance* 62(11): 3713-372

44. Murashige, T. y F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia plantarum* 15: 473-479
45. Orloci, L. 1978. *Multivariate analysis in vegetation research*. The Hague: Dr W. Junk B. V. 276 p.
46. Peakall, R. y P.E. Smouse. 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes* 6: 288-295
47. Peredo, E.L.; R. Arroyo-Garcia y M.A. Revilla. 2009. Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *Journal of plant physiology* 166: 1101-1111
48. Pierik, R. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 326 p.
49. Polanco, C. y M. Ruiz. 2002. AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant science* 162: 817-824
50. Reyes, J.C.; L. Hennig y W. Gruissem. 2002. Chromatin-remodeling and memory factors. New regulators of plant development. *Plant physiology* 130: 1090-1101
51. Reyna-López, G.E.; J. Simpson y J. Ruiz-Herrera. 1997. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and general genetics* 253: 703-710

52. Rodríguez, R.; M. Albuerne y B. Fernández. 2005b. Morfogénesis y su manipulación en especies leñosas. En *Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal*. M. Sánchez-Olate y D. Ríos (eds.). Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Departamento de Silvicultura. Concepción, Chile. pp. 49-62
53. Rodríguez, R.; S. Castañón y M. Uribe. 2005a. Biotecnología forestal: Presente y futuro. En *Biotecnología Vegetal en Especies Leñosas de Interés Forestal*. M. Sánchez-Olate y D. Ríos (eds.). Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Forestales, Departamento de Silvicultura. Concepción, Chile. pp. 5-16
54. Rodríguez, R. y M. Quezada, M. 2003. Fagácea. *Flora de Chile* 2, 64-76
55. Ruiz-García, L.; J. Cabezas; N. de María y M.T. Cervera. 2010. Isoschizomers and Amplified Fragment Length Polymorphism for the Detection of Specific Cytosine Methylation Changes. En *Plant Epigenetics: Methods and Protocols*. I. Kovalchuk y F. Zemp (eds.). Springer Science+Business Media. p. 278
56. Sabja, A.; O. Ortíz y C. Triviño. 2008. Avances de clonación in vitro de árboles adultos de Raulí (*Nothofagus alpina* Poepp. et Endl.) Oerst.) para propagación comercial. *Agrociencia* 42: 595-603
57. Smulders, M.J.M. y G.J. de Klerk. 2011. Epigenetics in plant tissue culture. *Plant growth regulation* 63: 137-146
58. Smulders, M.J.M.; W. Ruskortekaas y L.J.W. Gilissen. 1995. Natural variation in patterns of polysomaty among individual tomato plants and their regenerated progeny *Plant Science* 106: 129-139

59. Sutan, A.N.; A. Popescu y V. Isac. 2010. *In vitro* culture medium and explant type effect on callogenesis and shoot regeneration in two genotypes of ornamental strawberry. Romanian biotechnological letters 15: 12-18
60. Tariq, M. y J. Paszkowski. 2004. DNA and histone methylation in plants. Trends in Genetics 20: 244-251
61. Valledor, L.; R. Hasbun; M. Meijon; J.L. Rodríguez; E. Santamaria; M. Viejo; M. Berdasco; I. Feito; M.F. Fraga; M.J. Canal y R. Rodríguez. 2007. Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. Plant cell tissue and organ culture 91: 75-86
62. Varga, A.; L.H. Thoma y J. Bruinsma. 1988. Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated kalanchoe-blossfeldiana poelln. Plant cell tissue and organ culture 15: 223-231
63. Vergara, R.; F. Verde; L. Pitto; F. Loschiavo y M. Terzi, M. 1990. Reversible variations in the methylation pattern of carrot DNA during somatic embryogenesis. Plant cell reports 8: 697-700
64. Vogel, G. 2005. How does a single somatic cell become a whole plant? Science 309: 86
65. Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijans; T. Vandelee; M. Hornes; A. Frijters; J. Pot; J. Peleman; M. Kuiper y M. Zabeau. 1995. AFLP - A new technique for DNA-fingerprinting. Nucleic acids research 23: 4407-4414

66. Vroh-Bi, I.; C. Anagbogu, S. Nnadi y A. Tenkouano. 2011. Genomic characterization of natural and somaclonal variations in bananas (*Musa spp*). *Plant molecular biology reporter* 29:440–448
67. Xiong, L.Z.; C.G. Xu; M.A.S. Maroof y Q.F. Zhang. 1999. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. *Molecular and general genetics* 261: 439-446
68. Yang, C.; M. Zhang; W. Niu; R. Yang; Z. Qiu; B. Sun y Z. Zhao. 2011. Analysis of DNA methylation in various swine tissues. *Plos One* 6(1): e16229
69. Zhang, Y. y A. Jeltsch. 2010. The Application of next generation sequencing in DNA. *Genes* 1: 85-101
70. Zhu, J. 2009. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual review of genetics* 43: 143-66
71. Zilberman, D.; M. Gehring; R. Tran; T. Ballinger y S. Henikoff. 2007. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nature genetics* 39: 61–69
72. Zluvova, J.; B. Janousek y B. Vyskot. 2001. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. 2001. *Journal of experimental botany* 52: 2265-2273

VIII APÉNDICE

Tabla 1A. Calidad y concentración de ADN de callo organogénico y no morfogénico de *N. alpina*.

Callo organogénico				Callo no morfogénico		
Muestra	[ng/ul]	OD _{260/280}	OD _{260/230}	[ng/ul]	OD _{260/280}	OD _{260/230}
1	30	1.74	2.63	13	1.64	> 3.0
2	40	1.75	> 3.0	12	1.79	> 3.0
3	33	1.69	2.58	12	1.64	> 3.0
4	24	1.65	2.87	12	1.76	> 3.0
5	36	1.75	2.70	13	1.58	> 3.0
6	31	1.81	2.21	11	1.77	> 3.0
7	48	1.75	2.34	15	1.62	> 3.0
8	33	1.79	2.82	15	1.65	> 3.0
9	29	1.67	2.95	13	1.70	2.66
10	39	1.78	2.72	12	1.66	> 3.0
11	27	1.75	> 3.0	11	1.63	2.99
12	39	1.75	> 3.0	10	1.63	> 3.0
13	26	1.71	2.85	11	1.83	> 3.0
14	36	1.83	> 3.0	11	1.60	> 3.0
15	37	1.73	2.15	12	1.64	> 3.0
16	36	1.77	> 3.0	13	1.73	2.06
17	34	1.77	2.83	10	1.76	> 3.0
18	41	1.84	2.93	16	1.66	> 3.0
19	41	1.71	1.69	12	1.64	> 3.0
20	46	1.86	> 3.0	11	1.71	> 3.0
21	38	1.78	> 3.0	14	1.70	> 3.0
22	45	1.76	1.94	12	1.58	> 3.0
23	39	1.79	2.32	11	1.65	> 3.0
24	29	1.78	> 3.0	10	1.81	> 3.0