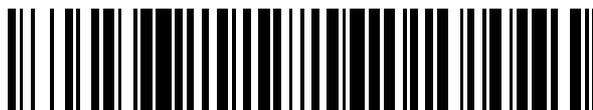


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 149**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2005 E 05819260 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013 EP 1999271**

54 Título: **Método de identificación de variabilidad inducida en cultivos in vitro**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.10.2013

73 Titular/es:

**INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROSLIN
(PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION
INSTITUTE) (100.0%)
BLONIE
05-870 RADZIKOW, PL**

72 Inventor/es:

**BEDNAREK, PIOTR y
ZIMNY, JANUSZ**

74 Agente/Representante:

ZUAZO ARALUZE, Alexander

ES 2 427 149 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método de identificación de variabilidad inducida en cultivos *in vitro*

5 **Campo de la invención**

El objeto de la presente invención es el uso de la técnica de AFLP que se compone de las etapas: aislar ADN genómico, digerir el ADN genómico con un par de endonucleasas de restricción y digerir otra parte del mismo ADN con otro par de endonucleasas de restricción, hibridar heterodúplex sintéticos a los extremos de restricción libres, amplificar inicialmente los fragmentos obtenidos de tal manera por medio de PCR primaria, amplificar selectivamente, separar los productos de PCR en un gel de poliacrilamida, realizar un análisis de perfil visual para el método para la identificación de variabilidad inducida por el método de derivación en cultivos *in vitro*

Es un fenómeno bien establecido que, tras la regeneración de plantas a partir de tejido no diferenciado, la población resultante de individuos clonales no es fenotípica o genéticamente homogénea. Ambos acontecimientos somaclonal y gametoclonal contribuyen a esta variación inducida en cultivo tisular. El término variación somaclonal lo introdujeron Larkin y Scowcroft [Larkin y Scowcroft 1981] para describir la variación que surge durante el cultivo de células somáticas, mientras que la variación gametoclonal representa la variación heredable que surge durante el cultivo de células de origen gamético. La base genética que subyace a la variación somaclonal sigue siendo controvertida [Bouman y De Klerk 2001, Bregitzer, *et al.* 1998, Fourné, *et al.* 1997, Hossain, *et al.* 2003, Linacero, *et al.* 2000, Munthali, *et al.* 1996] y tanto los mecanismos mediante los que se induce, como las maneras en que puede detectarse y aprovecharse se han comentado ampliamente en la bibliografía [Brar y Jain 1998, Remotti 1998]. Los acontecimientos genéticos (mutagénesis puntual de ADN, amplificación de secuencias de microsatélites [Linacero, *et al.* 2000] y movimiento del transpón (Peshke y Phillips 1991) y epigenéticos (cambios localizados en el estado de metilación del ADN (Jaligot, *et al.* 2002, Jaligot, *et al.* 2000)) proporciona una ruta molecular para su inducción. Se acepta en general que los sistemas *in vitro* que requieren un paso prolongado a través de una fase de callo o suspensión celular son los más vulnerables a la mutación (Arene, *et al.* 1993, Freyssinet y Freyssinet 1988, Roseland, *et al.* 1991, Thomas, *et al.* 1982), y por tanto se ha sugerido que el medio más eficaz de minimización de la variación es intentar inducir embriogénesis somática lo más rápidamente posible (Gray, *et al.* 1995). La definición de los cambios moleculares que subyacen a la variación somaclonal *de novo* y la cuantificación de su frecuencia se han visto impedidas por dificultades metodológicas (Gaj 2001), y esto se refleja en la descripción limitada de esta variación (principalmente a nivel fenotípico) en la bibliografía (Guzy-Wróblewska y Szarejko 2003). Sin embargo, no puede tomarse una falta de cambios detectables visualmente para deducir una falta de variación a nivel molecular (Gaj 2001).

La tecnología de huella dactilar de ADN tiene el potencial de detectar cambios del ADN con precisión y eficacia crecientes. Sin embargo, ni los enfoques basados en RFLP ni los basados en RAPD han sido particularmente satisfactorios en el reconocimiento de variantes somaclonales (Devaux, *et al.* 1993). Munthali *et al.* (Munthali, *et al.* 1996) identificaron sólo tres variantes de 5607 productos de RAPD entre un conjunto de plantas de remolacha regeneradas, y se observó una frecuencia similarmente baja en *Begonia* (Bouman y De Klerk 2001). Se han logrado resultados algo mejores en estudios de regenerantes de *Lolium* derivados de protoplastos (Wang, *et al.* 1993), y a partir de suspensiones de cultivo celular de trigo a largo plazo (Brown, *et al.* 1993). La técnica de AFLP es potencialmente más apropiada como plataforma de detección, puesto que tanto identifica un número relativamente grande de fragmentos amplificados, como es más robusta experimentalmente que RAPD, como resultado de su uso de un régimen de PCR más riguroso. A pesar de esto, hasta la fecha se han publicado relativamente pocos informes de su uso para detectar variación en el patrón de metilación o la variación somaclonal (Cervera, *et al.* 2002, Portis, *et al.* 2003, Vendrame, *et al.* 1999). Como ejemplo, pudo discriminar de manera inequívoca entre líneas de cultivo embriogénicas de *Carya illinoensis* y pudo agrupar los embriones que se originaban a partir de una línea dada (Vendrame, *et al.* 1999).

Una característica de AFLP es la flexibilidad de elección para las dos enzimas de restricción necesarias para la digestión inicial del ADN molde. Cuando una o ambas son sensibles a la metilación, la pérdida o ganancia de fragmentos en un perfil puede deberse o bien a la ganancia/pérdida de sitios de restricción (variantes de secuencia) o a la metilación diferencial de sitios de reconocimiento particulares, tal como señalaron Donini *et al.* (Donini, *et al.* 1997). Se han explorado comparaciones isoesquizoméricas, en las que un tratamiento usa una enzima sensible a la metilación, y el otro una insensible a la metilación en *Arabidopsis* (Cervera, *et al.* 2002). Este método, denominado polimorfismo amplificado sensible a la metilación (MSAP, *methylation sensitive amplified polymorphism*), es particularmente adecuado para el análisis de la base molecular de la variación somaclonal. El presente estudio describe la elaboración y aplicación de un método analítico, que permite la detección de variación inducida en cultivo tisular en cebada (*Hordeum vulgare L.*) tanto a nivel de la secuencia de nucleótidos como de metilación de ADN. El objetivo era comparar adicionalmente la frecuencia y los patrones de variación entre dos fuentes diferentes de explantes (embriones inmaduros y microsporas) y evaluar el potencial del enfoque para cuantificar las contribuciones de metilación y la alteración de secuencia con respecto a la variación global. Se propone un método lo suficientemente flexible para estudiar diferente partes del genoma, y adaptado para proporcionar una descripción o bien cualitativa o bien cuantitativa de la variación inducida en cultivo tisular.

La descripción de patente US6300071 (publicada el 09-10-2001) describe un método para detectar la metilación de ácido nucleico usando AFLP(TM). La invención se refiere a un método para analizar la determinación del patrón de metilación de un ADN de partida y/o para distinguir entre sitios metilados y no metilados en el ADN de partida, que comprende al menos(A) generar una primera huella dactilar de ADN, que contiene bandas correspondientes a tanto los sitios metilados como no metilados de interés; y/o (B) generar una segunda huella dactilar de ADN, que contiene bandas correspondientes sólo a los sitios metilados de interés; y que comprende opcionalmente (C) generar una tercera huella dactilar de ADN, que contiene bandas correspondientes sólo a los sitios no metilados de interés; y que comprende además opcionalmente (D) analizar la(s) huella(s) dactilar(es) así obtenido(s). Las huellas dactilares se generan preferiblemente usando AFLP, por medio de una cortadora frecuente y una cortadora inusual sensible a la metilación. La invención se refiere además a métodos para específicos generar la primera y la segunda huellas dactilares de ADN anteriores por medio de AFLP, y a kits para uso con dichos métodos.

La descripción de patente WO9953100 (publicada el 21-10-1999) describe un método para hallar marcadores genéticos de la variación somaclonal. La invención proporciona un método para obtener marcadores moleculares para su uso como herramienta de control de calidad y de diagnóstico para identificar polimorfismos genómicos que surgen durante el proceso de cultivo tisular de plantas propagadas *in vitro*. Usando un análisis de representación de diferencias (RDA) adaptado para genomas de plantas, se obtiene un conjunto de secuencias con diferencias de ácido nucleico entre genomas de plantas normales y fuera de tipo. La invención proporciona además un método para aislar conjuntos de secuencias variantes que son comunes para muchas plantas fuera de tipo generadas en cultivo tisular o que se producen de manera natural del mismo cultivar o especie, además de secuencias variantes presentes en todas las plantas fuera de tipo, independientemente de la mutación fenotípica, y/o en todas las plantas fuera de tipo que presentan la misma mutación. La detección de la variación somaclonal mediante el método de la invención puede presentar una oportunidad para optimizar las condiciones de cultivo tisular y para optimizar las tasas de multiplicación de plantas sin producir un número significativo de plantas fuera de tipo.

A pesar de la investigación mencionada anteriormente sobre métodos de identificación de variabilidad inducida en cultivos *in vitro* aplicables en usos tales como obtener líneas genéticamente equivalentes, y que también faciliten el rendimiento de la selección ampliamente entendida de material de planta derivado mediante cultivos *in vitro* para fines de cultivo, así como la posibilidad de producir una herramienta molecular para la identificación de características epigenéticas para fines de cultivo, existe todavía la necesidad de producir una solución eficaz para la evaluación cuantitativa y cualitativa de la varianza inducida en cultivos *in vitro* y la varianza somaclonal.

El objetivo de la presente invención es proporcionar herramientas que pudieran usarse en la obtención de un método de estimación cuantitativa y cualitativa de la variabilidad inducida en cultivos *in vitro* así como cambios heredados de manera estable en generaciones generativas posteriores. El objetivo de la presente solución es producir líneas genéticamente estables, incluyendo haploides duplicados, para determinar el nivel de su variabilidad genética-epigenética, para facilitar la selección de material de planta derivado mediante cultivo *in vitro* para fines de cultivo, así como producir herramientas moleculares fácilmente adaptables para la identificación de sus características epigenéticas para fines de cultivo. El objetivo es obtener un método de caracterización cuantitativa de la variabilidad inducida en cultivos *in vitro* así como la variación heredada por generaciones generativas posteriores, lo que facilitaría la evaluación de tipos individuales de variabilidad (variabilidad de secuencia y metilación, dividida en más subtipos específicos) lo que permitiría que se determinase cuál de los tipos (subtipos) de variabilidad es dominante, si la variabilidad de secuencia está provocada por la migración de elementos móviles, cambios en regiones de micro- y macrosatélites, dentro de familias de genes, etc.

En la presente invención se lograron la realización de tal objetivo establecido para proporcionar soluciones a los problemas descritos en el estado de la técnica, con el fin de proporcionar herramientas que pudieran usarse en la obtención de un método de estimación cuantitativa y cualitativa de la variabilidad inducida en cultivos *in vitro* así como la variación heredada como resultado de propagación generativa, lo que facilitaría la selección de materiales de planta derivados a través del cultivo *in vitro* para fines de cultivo, la aplicación de dicha metodología para determinar qué porcentaje de variabilidad secuencia o variabilidad de metilación (sitios metilados y no metilados) se transfirió de manera estable a la progenie de plantas.

El tema de la invención objeto es el uso de la técnica de AFLP que se compone de las etapas: aislar ADN genómico, digerir el ADN genómico con un par de endonucleasas de restricción y digerir otra parte del mismo ADN con otro par de endonucleasas de restricción, hibridar heterodúplex sintéticos a los extremos de restricción libres, amplificar inicialmente los fragmentos obtenidos de tal manera por medio de PCR primaria, amplificar selectivamente, separar los productos de PCR en un gel de poliacrilamida, realizar un análisis de perfil visual para el método para la identificación de variabilidad inducida por el método de derivación en cultivos *in vitro* a nivel de plantas regenerantes, así como la variación heredada como resultado de propagación generativa que consiste en las siguientes etapas:

1) estimar la repetibilidad de las dos variantes de la técnica de AFLP: controlar la repetibilidad de AFLP basado en la identidad de varias muestras de ADN de la misma planta a través del uso de AFLP e isoesquízómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;

- 5 2) estimar la repetibilidad de las dos variantes de la técnica de AFLP: controlar la repetibilidad de AFLP basado en la identidad de varias muestras de ADN de la misma planta a través del uso de AFLP e isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos usando un conjunto diferente de cebadores de AFLP selectivos a los usados en los demás análisis de AFLP;
- 10 3) identificar la variabilidad inducida por el método de derivación de los regenerantes en relación con la planta donante, lo que se realiza en dos variantes de AFLP usando isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;
- 15 4) identificar la variabilidad inducida en cultivo tisular entre los regenerantes en relación con la planta donante, lo que se realiza en dos variantes de la técnica de AFLP utilizando isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;
- 20 5) identificar la variabilidad somaclonal entre la progenie de regenerantes en relación con la planta donante, lo que se lleva a cabo usando dos variantes de la técnica de AFLP utilizando isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;
- 25 6) realizar el análisis molecular del material experimental usando la técnica de AFLP teniendo en cuenta isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP se compone de las siguientes etapas:
- 30 a) realizar análisis de patrones de AFLP de plantas donantes con respecto a la variabilidad genética y epigenética inducida durante la propagación generativa de una planta individual, un control de la propagación generativa,
- 35 b) realizar análisis de patrones de AFLP para el control de la reproducibilidad de ambas variantes de la técnica de AFLP,
- c) realizar un análisis de patrones de AFLP para los regenerantes en comparación con plantas donantes o regenerantes separados en relación con plantas donantes apropiadas;
- 40 d) realizar análisis de patrones de AFLP para la planta donante, su regenerante y la progenie de regenerantes, o las distintas líneas de progenie de regenerantes junto con la planta donante apropiada y sus plantas regenerantes;
- 45 7) identificar los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria para sistemas sensibles e insensibles a la metilación, que son el resultado de una comparación entre la planta donante con los regenerantes y entre la planta donante con la progenie de regenerantes simultáneamente en dos sistemas de AFLP, en el que se lleva a cabo la identificación de tipos de acontecimiento individualmente para cada regenerante y en masa para progenies de regenerantes y se representa como 14 matrices binarias que describe cada uno de los acontecimientos independientemente, subdivididos en métodos de derivación; en el que las columnas representan regenerantes consecutivos o masas y las filas representan fragmentos de AFLP consecutivos;
- 50 8) asignar determinados tipos de acontecimiento a un tipo dado de variabilidad inducida el método de derivación en relación con cada regenerante;
- 55 9) identificar los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria para sistemas sensibles e insensibles a la metilación, que son el resultado de una comparación entre la planta donante con regenerante simultáneamente en dos sistemas de AFLP;
- 60 10) identificar los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria para sistemas sensibles e insensibles a la metilación, que son el resultado de una comparación entre la planta donante con la progenie de regenerantes simultáneamente en dos sistemas de AFLP, en el que se realiza la identificación de tipos de acontecimiento a través de la suma de los genotipos de una progenie resumen dada, y a través de la comparación de un perfil de AFLP total de este tipo de la progenie de regenerantes con el perfil de la planta donante,
- 65 11) el genotipo de la progenie de regenerantes en masa expresado mediante un perfil de AFLP para sistemas sensibles e insensibles a la metilación a nivel de fragmentos de AFLP individuales tiene un valor diferente del de la planta donante en un sistema de AFLP dado, siempre que un fragmento dado dentro del mismo sea polimórfico, o es totalmente diferente de este valor para la planta donante; en el caso opuesto, los valores para la planta donante y la progenie de regenerantes en masa para un fragmento de AFLP dado en un sistema de AFLP dado son idénticos,
- 12) producir una matriz cuantitativa para los regenerantes, en la que las columnas contienen datos para

regenerantes consecutivos agrupados mediante el método de derivación, y las filas contienen los 14 tipos de acontecimientos que pueden asignarse a cada progenie de regenerantes;

5 13) producir una matriz cuantitativa para la progenie de regenerantes, en la que las columnas contienen datos en masa para la progenie de regenerantes agrupados mediante el método de derivación, y las filas contienen los 14 tipos de acontecimientos que pueden asignarse a cada progenie de regenerantes en masa;

10 14) producir una matriz cuantitativa para los acontecimientos en regenerantes, siendo ésta una matriz cuantitativa para los regenerantes tras la transposición, en la que las columnas contienen 14 acontecimientos y las filas contienen regenerantes agrupados mediante el método de derivación;

15 15) calcular el número total de acontecimientos basado en la matriz binaria para métodos individuales de derivación de regenerantes así como para los regenerantes, calculándose el número total de acontecimientos como un producto del número de fragmentos de AFLP identificados en ambos sistemas de AFLP para todos los pares de cebadores selectivos multiplicado por el número de regenerantes derivados mediante un método dado;

20 16) calcular el número total de acontecimientos basado en la matriz binaria para métodos individuales de derivación de regenerantes así como para progenies de regenerantes en masa, correspondiendo el número total de acontecimientos al número de fragmentos de ADN idénticos o diferentes en ambos sistemas de AFLP para todos los pares de cebadores selectivos usados en el análisis;

25 17) calcular el error que se origina de la propagación generativa, lo que se lleva a cabo basado en la matriz binaria de plantas donantes y una única planta; determinar el número de acontecimientos diferentes de aquéllos en una única planta perteneciente a las plantas donantes, y calcular el número total de acontecimientos para la planta donantes;

30 18) calcular el error que se origina de la de la técnica de AFLP, lo que se lleva a cabo basado en la matriz binaria para muestras de ADN obtenidas de la misma planta y sometidas a las etapas de la técnica de AFLP usando isoescizómeros sensibles e insensibles a la metilación en el sitio de restricción o sus alrededores inmediatos así como un número representativo de pares de iniciadores selectivos idénticos en todos los sistemas de AFLP, en el que se calculan el número total de acontecimientos y el número de acontecimientos polimórficos, y se expresa este último número como porcentaje;

35 19) determinar, basado en matrices binarias para los regenerantes y la planta donante, grupos de acontecimientos que describen: (a) la variación de secuencia relacionada con cualquier cambio en las secuencias de nucleótidos del ADN basado en datos de AFLP del sistema insensible a la metilación y (b) la variabilidad epigenética, la variabilidad *de novo* de patrones de metilación, y adicionalmente la variación mixta que es variabilidad de secuencia y metilación basado en datos para ambos sistemas de AFLP;

40 20) determinar, basado en matrices binarias para la progenie de regenerantes en masa y la planta donante, grupos de acontecimientos que describen (a) variación de secuencia relacionadas con todos los cambios de nucleótidos del ADN basado en datos de AFLP del sistema insensible a la metilación y (b) la variabilidad epigenética, la variabilidad *de novo* de patrones de metilación, y adicionalmente la variación mixta que es variabilidad de secuencia y metilación, y (c) la herencia de patrones de metilación tal como se relaciona con la presencia y/o falta de metilación en el sitio de restricción o sus proximidades, basado en datos para ambos sistemas de AFLP;

45 21) identificar acontecimientos particularmente sometidos a la actividad de factores que inducen la variabilidad en cultivos *in vitro*;

50 22) realizar el análisis de secuencia de tipos individuales de acontecimiento y/o amplia variabilidad de secuencia, identificándose la variabilidad usando variantes de la técnica de AFLP usando cebadores dirigidos contra secuencias conservativas dentro de elementos móviles, secuencias de repetición o las secuencias de familias génicas conservativas;

55 23) realizar un análisis estadístico de la planta donante y sus regenerantes así como la progenie de regenerantes, y posiblemente distintos regenerantes y progenies de regenerantes junto con plantas donantes apropiadas, así como el control de la reproducibilidad de AFLP y el control de la propagación generativa:

60 a) realizar un análisis estadístico de los resultados de AFLP usando análisis paramétrico, la prueba de Mantel y/o el coeficiente alfa de Cronbach así como análisis de la varianza molecular usando los coeficientes F_s o Phi_s ;

b) determinar el error de las estimaciones de variabilidad somaclonal e inducida en cultivo tisular, basado en el coeficiente de correlación de la prueba de Mantel;

65 c) determinar los parámetros cuantitativos de la variabilidad inducida por el método de derivación de regenerantes y la variabilidad somaclonal para los regenerantes, progenies individuales de regenerantes, teniendo en cuenta el

método de derivación y proporcionando su nivel de significación estadística;

5 d) determinar estadísticamente las diferencias entre tipos individuales de acontecimientos inducidos en cultivos *in vitro* para los regenerantes, así como la progenie de regenerantes en masa, agrupados mediante un método de derivación y complementados mediante su significación estadística usando matrices cuantitativas de acontecimientos;

10 e) realizar un análisis estadístico de la comparación entre la variabilidad inducida por el método de derivación así como la variación somaclonal, determinada a través de la comparación del perfil de la planta donante, y el perfil en masa de la progenie de regenerantes y sus tipos: variabilidad de secuencia y/o amplia variabilidad de secuencia, metilación *de novo*, desmetilación, variabilidad mixta, herencia de: patrones de metilación, sitios no metilados o sitios conservativos en la progenie de regenerantes, agrupados mediante un método de derivación así como una comparación por método de derivación de la progenie de regenerantes, cuando se usan matrices cuantitativas para los acontecimientos;

15 a) realizar comparaciones estadísticas de regenerantes, y las progenes de regenerantes en masa para diferentes métodos de derivación para una progenie de regenerantes dada, cuando se usan matrices cuantitativas de la progenie;

20 b) realizar una comparación estadística de los resultados de los puntos mencionados anteriormente para regenerantes individuales y progenes de regenerantes en masa entre sí;

h) realizar una comparación estadística o cualitativa de la variación somaclonal entre plantas individuales que son la progenie generativa de regenerantes;

25 i) recoger los resultados existentes en forma de una compilación que indica características cuantitativas de variabilidad inducida por el método de derivación determinado a nivel del regenerante, así como características cuantitativas de variabilidad heredada determinada a nivel de la progenie de regenerantes.

30 Preferentemente, la identificación de los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria se selecciona de los acontecimientos representados en la figura 7.

35 Preferentemente, para derivar plantas donantes, se usa una única planta que es un haploide duplicado derivado de una microspora aislada, en el que se trata como control de la variabilidad genética y epigenética de plantas donantes.

40 Preferentemente, la variabilidad genética y epigenética de material propagado de manera generativa, plantas donantes, se determina basado en perfiles de AFLP obtenidos de isoesquizómeros de endonucleasas de restricción que reconocen y que digieren secuencias idénticas, pero que difieren en su sensibilidad a la metilación en o alrededor del sitio de restricción, en los que uno de los isoesquizómeros es insensible a la metilación.

45 Preferentemente, en un sistema sensible e insensible a la metilación no se observan diferencias en los perfiles de AFLP de plantas donantes, entonces es insignificante el nivel de variabilidad inducida a través de propagación generativa e identificado con un par dado de cebadores selectivos.

Preferentemente, cuando existen diferencias en los perfiles de AFLP para plantas donantes entre un sistema sensible y un sistema insensible a la metilación, se determina una parte porcentual de un acontecimiento de este tipo, junto con el nivel de fondo, el error de propagación generativa.

50 Preferentemente, cuando existen diferencias en los perfiles de AFLP para replicantes experimentales en las mismas muestras de ADN, se estima el error de la técnica de AFLP con el fin de determinar el error experimental.

55 Preferentemente, la parte integral del material de investigación se compone de plantas donantes, junto con una única planta, los regenerantes de la planta donante y progenes de regenerantes separadas.

Preferentemente, la planta donante junto con los regenerantes y la progenie de regenerantes componen el núcleo de material de investigación para el estudio de la variabilidad inducida por el método de derivación o la variabilidad somaclonal, respectivamente.

60 Preferentemente, se realiza el análisis molecular usando la técnica de AFLP en dos variantes, usando isoesquizómeros que difieren en su sensibilidad a la metilación.

Preferentemente, uno de los isoesquizómeros es completamente insensible a la metilación.

65 Preferentemente, en la identificación de productos de PCR segregados, se usa un marcador isotópico que se introduce en el extremo 5' del cebador complementario al adaptador hibridado al sitio de restricción liberado por los

isoesquizómeros.

Preferentemente, se usan otros métodos de visualización de fragmentos de AFLP, incluyendo fluorescencia.

- 5 Preferentemente, se realizan los perfiles de ambas variantes de AFLP para la planta donante junto con sus regenerantes y teniendo en cuenta el método de derivación y el control de la reproducibilidad de AFLP, con pares de cebadores de AFLP idénticos.

10 Preferentemente, el análisis del perfil de AFLP y su conversión en matrices binarias se basa en el hecho de que los perfiles de AFLP de ambos sistemas de restrictasas para todos los pares de cebadores selectivos se introducen como una matriz binaria en una hoja de cálculo, en el que el conjunto de datos obtenido para un par de cebadores de AFLP selectivos se coloca bajo el anterior de manera que cada columna representa un perfil binario total para una planta donante en un sistema de AFLP, y las columnas posteriores contienen datos análogos para los regenerantes y los controles, en el que se registran datos para el segundo sistema de AFLP en columnas posteriores, en el que se ordenan las bandas de un sistema como las del sistema anterior (en filas), y cuando no aparece una banda dada, se introduce un cero en la fila apropiada de la hoja de cálculo.

20 Preferentemente, el análisis del perfil de AFLP y su conversión en matrices binarias se basa en el hecho de que los perfiles de AFLP de ambos sistemas de restrictasas para todos los pares de cebadores selectivos se introducen como una matriz binaria en una hoja de cálculo, en el que el conjunto de datos obtenido para un par de cebadores de AFLP selectivos se coloca bajo el anterior de manera que cada columna representa un perfil binario total para una planta donante en un sistema de AFLP, y las columnas posteriores contienen datos análogos para progenies de regenerantes y los controles, en el que se registran datos para el segundo sistema de AFLP en columnas posteriores, en el que se ordenan las bandas de un sistema como las del sistema anterior (en filas), y cuando no aparece una banda dada, se introduce un cero en la fila apropiada de la hoja de cálculo.

25 Preferentemente, se representa el perfil de AFLP para la progenie de regenerantes en forma de un genotipo en masa por variante de AFLP, sensible e insensible a la metilación por separado.

- 30 Preferentemente, se lleva a cabo el control de la propagación generativa a través de la suma del número de señales (acontecimientos) de una única planta, en el que se calcula el número de cambios como un porcentaje del número total de acontecimientos.

35 Preferentemente, se realizan el análisis paramétrico, el análisis de correlación mediante la prueba de Mantel y el análisis de variabilidad molecular usando matrices binarias de sistemas de AFLP sensibles e insensibles a la metilación para los regenerantes y/o la progenie de regenerantes dependiendo de si está analizándose la variabilidad inducida en cultivo o heredada por la progenie de regenerantes.

40 Preferentemente, se usa el análisis factorial como la representación gráfica de los resultados de AFLP.

45 Preferentemente, la identificación de los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel del patrón de AFLP y asignados a la variabilidad inducida por el método de derivación se realiza basándose en patrones de AFLP, en el que se usa el perfil de la planta donante junto con perfiles de regenerante en ambos sistemas, y posteriormente se compara el perfil de cada regenerante con el perfil de la planta donante con el fin de identificar estos acontecimientos.

50 Preferentemente, la identificación de los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de patrones de AFLP y asignados a la variabilidad somaclonal se lleva a cabo basándose en patrones de AFLP, en el que se usa el perfil de la planta donante junto con perfiles en ambos sistemas de AFLP, y el perfil en masa de la progenie de regenerantes se compara con el perfil de la planta donante con el fin de identificar tipos de acontecimiento, en el que se supone que en el caso de fragmentos polimórficos de AFLP del genotipo de la progenie de regenerantes en masa, se introduce un valor diferente del de la planta donante o un valor diferente si es diferente del de la planta donante en todas las progenies de regenerantes para un sistema de AFLP dado.

55 Preferentemente, cuando los 14 tipos de acontecimiento comprenden la base para su segregación en grupos: variabilidad de secuencia, variabilidad de metilación (metilación y desmetilación), variabilidad mixta y herencia de patrones de metilación, en el que se tiene en cuenta que la variabilidad de secuencia se confirma de manera inequívoca en un sistema insensible a la metilación.

60 Preferentemente, el análisis de la significación de acontecimientos y tipos de variabilidad independientes dentro de los regenerantes y la progenie de plantas regenerantes, tal como se agrupan mediante el método de derivación, se realiza basado en matrices cualitativas y matrices cuantitativas de acontecimientos que describen todos los acontecimientos teóricamente posibles, así como las plantas regenerantes y la progenie de regenerantes.

65 Preferentemente, los resultados del análisis estadístico para regenerantes individuales y progenies de regenerantes en masa obtenido a través de diversos medios se compilan en un todo; se introducen parámetros cuantitativos para

la variabilidad inducida por el método de derivación y de la variabilidad somaclonal para regenerantes individuales y progenies de regenerantes en masa así como para progenies de regenerantes separadas agrupadas mediante el método de derivación y tipos de acontecimiento junto con parámetros estadísticos.

5 Preferentemente, se identifican aquellos tipos de acontecimiento, que son poco comunes en cultivo o que no se producen en absoluto, así como aquéllos que están sometidos particularmente a la actividad de factores que inducen la variabilidad a nivel de regenerante y la progenie de regenerantes, así como para determinar sus parámetros cuantitativos.

10 Preferentemente, se estudian tipos individuales de acontecimiento a nivel molecular a través del análisis de secuencia de fragmentos de AFLP que representan tipos individuales de acontecimientos, y por los mismos tipos de testigos de la variabilidad somaclonal.

15 Preferentemente, se analiza una o más progenies de regenerantes en masa.

Preferentemente, se proporcionan las características cuantitativas de un acontecimiento para cada progenie de regenerantes individual: variabilidad de secuencia, amplia variabilidad de secuencia, la variabilidad epigenética de patrones de metilación (metilación *de novo*, desmetilación), estabilidad de sitios metilados y no metilados heredados (conservativos), frente a cambios inducidos en cultivos así como la introducción de diferencias cuantitativas en la variabilidad entre diferentes métodos de derivación de material de planta.

20 Preferentemente, se realiza un análisis estadístico de la significación de tipos individuales de acontecimiento entre los regenerantes, la progenie de regenerantes en masa y progenies individuales de regenerantes según sea necesario, agrupados mediante el método de derivación del material de investigación. Preferentemente, se determina independientemente el nivel de en el que variabilidad somaclonal de plantas individuales que son la progenie de regenerantes, usando los principios usados para la variabilidad somaclonal.

25 Preferentemente, se someten a prueba las hipótesis relacionadas con las fuentes de variabilidad inducida por el método de derivación de regenerantes y que se heredan como resultado de propagación generativa.

30 Preferentemente, se realiza el análisis detallado de las causas de variabilidad de secuencia después de introducir cambios de procedimiento de AFLP menores, basado en la amplificación selectiva de material de investigación usando un cebador con etiqueta complementario a sitios conservativos de elementos transponibles, o a secuencias de macrosatélite.

35 Preferentemente, se analiza la segregación de marcadores genéticos y epigenéticos para el mapeo de poblaciones derivadas a través de cruzamientos entre plantas que son la progenie de regenerantes con un genotipo conocido, basado en los perfiles de AFLP para ambos sistemas de AFLP. Preferentemente, el método está diseñado para derivar plantas *in vitro* con un nivel disminuido o potenciado de la variabilidad somaclonal a través de la identificación de las causas de esta variabilidad.

40 Preferentemente, se verifica la pureza genética y epigenética de material arbitrario derivado a través de cultivo *in vitro*.

45 Preferentemente, se usa el método en el análisis de la herencia de la variabilidad epigenética durante el cruzamiento sexual.

50 Preferentemente, el método es una herramienta para la identificación de marcadores epigenéticos relacionados con las características utilitarias del material de planta.

55 Preferentemente, se usa el método para la identificación de diferencias en patrones de metilación de ADN para diversos tejidos de una planta individual.

Las figuras adjuntas facilitan una mejor descripción de la naturaleza de la presente invención.

60 La figura 1 representa un esquema general para la evaluación de materiales de planta para estudiar la variación inducida en cultivo tisular (nivel 7) y la variación somaclonal (nivel 8) debido al método de regeneración (nivel 6). Se verifican la variación inducida por reproducción generativa y pureza la del material inicial junto con la reproducibilidad de los enfoques de AFLP en 5. En el ejemplo descrito, se analizaron regenerantes y plantas donantes (nivel 7) sólo tras rutas de embrio y androgénesis.

65 La figura 2 representa disposiciones de los genotipos teóricos de donantes y regenerantes y patrones de AFLP supuestamente amplificados por productos digeridos de *Acc65I/Msel* y *KpnI/Msel*. El primer y el tercer números reflejan el donante y el segundo y el cuarto números perfiles de regenerante; los dos primeros números representan los productos digeridos de *Acc65I/Msel* y de *KpnI/Msel* restantes. 1 y 0 establecen la presencia y ausencia de una banda en un perfil.

La figura 3 representa las huellas dactilares de metAFLP de *Acc65I/Msel* y *KpnII/Msel* de los regenerantes (líneas 1-19) y la planta donante (D), respectivamente; los carriles 1-7 - regenerantes obtenidos mediante embriogénesis; los carriles 8-19 - regenerantes obtenidos mediante androgénesis (véase la figura 1); diferentes tipos de flechas indican algunos de los acontecimientos descritos como presente/ausente "1-0" según la figura 7; v.i. - banda de intensidad variable.

La figura 4 representa la agrupación de los datos de *Acc65I/Msel* y *KpnII/Msel*. "a-r" - establece *Acc65I/Msel* y "k-r" *KpnII/Msel*, los números que siguen a "a-r" o "kr" reflejan la planta regenerada dada. "Aparental" y "Kparental" establecen la planta donante.

La figura 5 representa el análisis factorial de los datos de huella dactilar generados por productos digeridos de *Acc65I/Msel* y *KpnII/Msel* basado en los ADN de las plantas regeneradas.

La figura 6 representa secuencias de cebador para metAFLP.

La figura 7 representa variantes detectadas mediante metAFLP. Se usaron pares de enzimas de *Acc65I/Msel* y *KpnII/Msel* para la digestión de los moldes; 1/0 - la de banda AFLP está presente/falta. Columna de patrones de AFLP: las dos primeras cifras establecen *Acc65I/Msel* y el resto los productos digeridos de *KpnII/Msel*; las posiciones primera y tercera reflejan el donante y la segunda y cuarta los perfiles de regenerante. La columna "tipo de acontecimiento" clasifica el patrón dado con respecto al tipo de acontecimiento. Adicionalmente, se facilita la información de si el patrón es inequívoco. E, A y S establecen regenerantes derivados a través de embrio-, androgénesis y todos los regenerantes tomados juntos expresados como valores absolutos y normalizados (%). Los cálculos de la variación inducida en cultivo tisular se basan en los tipos de acontecimiento.

Se presentan a continuación realizaciones a modo de ejemplo de la presente invención definidas anteriormente.

Material de planta

Se autofertilizó una única planta de cebada doble haploide, obtenido mediante androgénesis a partir de una microspora aislada (Oleszczuk, *et al.* 2005). Se hizo crecer un conjunto de sus dieciséis plantas de progenie que no diferían en los fenotipos en condiciones controladas (régimen de día/noche de 16 h/8 h, intensidad de la luz de $27 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$ y temperaturas de día/noche de, respectivamente, 10°C y 12°C). Se usó el conjunto para someter a prueba la segregación críptica debida a propagación sexual a nivel molecular. Tras alcanzar la etapa de desarrollo adecuada, se aprovechó una planta de la progenie, el donante uno (esquema general de la figura 1) como fuente de anterias y embriones inmaduros. Se indujo embriogénesis somática a partir de callos derivados de embriones inmaduros (Zimny y Lörz 1989) hechos crecer durante tres semanas sobre medio N6 semisólido (Chu 1978) que contenía 2,4-D 2 mg l^{-1} . Se escindieron los embriones somáticos del callo, y se transfirieron a un medio de regeneración que contenía quinetina $0,4 \mu\text{M}$ con el fin de fomentar su germinación. Se transfirieron las plántulas emergentes a matraces Erlenmeyer hasta que alcanzaron una altura de 10-12 cm, tras lo cual se sembraron en macetas, se aclimataron durante dos semanas, y finalmente se hicieron crecer en condiciones de invernadero convencionales hasta su madurez. Para inducir androgénesis, se recogieron esquejes de la planta donante cuando las microsporas estaban entre la etapa de polen uninucleado y binucleado. Se mantuvieron los extremos cortados de los esquejes en agua con una baja intensidad de luz durante 7 días a 4°C. Entonces se esterilizaron en superficie las espigas sumergiéndolas en primer lugar en etanol al 70% y entonces en hipoclorito de sodio al 10%, tras lo cual se aclararon cinco veces en agua estéril. Se escindieron las anterias, se pusieron sobre medio N6 semisólido (Chu 1978) complementado con 2,4-D 2 mg l^{-1} y quinetina $0,5 \mu\text{M}$, y se cultivaron en placas de Petri de 6 cm de diámetro en la oscuridad a 26°C. Se transfirieron los callos embriogénicos a medio de regeneración 190-2 (Pauk, *et al.* 1991). Se transfirieron los embriones andrógenicos desarrollados sobre medio 190-2 nuevo (Zhuang y Xu 1983) complementado con hormonas según Pauk (Pauk, *et al.* 1991) y se solidificaron con Phytigel 5 g/l, y se mantuvieron con un régimen de día/noche de 16 h/8 h. Se enraizaron las plántulas en tubos de vidrio, y después se sembraron en macetas, se transfirieron a una cámara de crecimiento durante un corto periodo de aclimatación, y se hicieron crecer hasta madurez en una cámara de entorno controlado. Antes de la antesis, se embolsaron las espigas de cada planta regenerante para garantizar la autopolinización. Los dos conjuntos de regenerantes, obtenidos mediante embriogénesis somática (conjunto: regenerantes "E"), y mediante androgénesis (conjunto: regenerantes "A" nivel 7, figura 1), junto con los de la planta donante, proporcionaron el material para estudiar la variación inducida en cultivo tisular.

Manipulación de ADN

Se aisló el ADN genómico total de aproximadamente 100 mg de hoja de plantas de semilla de 7 días usando el kit DNeasy MiniPrep (Qiagen). Se obtuvieron oligonucleótidos de metAFLP del Centro para Estudios Macromoleculares de la Academia Polaca de Ciencias (Lódz) (secuencias enumeradas en la tabla 1). Se siguió el procedimiento de AFLP de Vos, *et al.* (Vos, *et al.* 1995) con modificaciones menores (Bednarek, *et al.* 2002), usando los pares de enzimas de restricción *Acc65I/Msel* y *KpnII/Msel* para la digestión inicial del ADN genómico. Se digirieron aproximadamente 500 ng de ADN genómico con *Acc65I/Msel* y una cantidad similar con *KpnII/Msel* a 37°C durante

3 h, deteniendo la reacción con una incubación de 15 min. de incubación a 70°C. Se ligaron los adaptadores relevantes al producto digerido por restricción en un volumen final de 25 µl a 20°C durante 12 h y se diluyeron 1:3 en tampón TE. Se realizó PCR no selectiva usando un perfil de amplificación convencional, en un volumen total de 25 µl usando cebadores preselectivos (tabla 1), y se diluyó esta reacción 1:20 en TE. Se llevaron a cabo PCR selectivas marcadas en un volumen final de 10 µl en presencia de cebadores selectivos marcados con 5'-(³²P). Tras la PCR, se desnaturalizaron las muestras mediante la adición de 6 µl de tampón de carga de formamida al 80% en presencia de los colorantes azul de bromofenol y xileno cianol. Tras una etapa de desnaturalización (95°C durante 10 minutos seguido por extinción a 5°C), se cargaron 6 µl de reacción en un gel de poli(acrilamida) desnaturalizante al 7% de 50 cm x 0,4 mm. Tras la electroforesis, se expusieron películas de rayos X a geles durante la noche a -70°C.

Análisis y puntuación de datos

Se usó el software complemento de Excel XIStat-pro v.7.5.2 (www.x1stat.com, Addinsoft) para realizar análisis de agrupación (UPGMA, coeficiente de Jaccard) y factoriales (coeficiente de correlación de Pearson sin rotación de ejes). Las estimaciones de similitud se basaron en el coeficiente de Jaccard y se realizó la agrupación mediante UPGMA (Saiotu y Nei 1986). Se llevó a cabo el análisis de la varianza molecular (AMOVA) y la prueba de Mantel usando el software complemento de Excel GeneAlex5.1 (Peakall y Smouse 2001). El tratamiento analítico de los datos se explica en el contexto de los propios resultados (véase a continuación, tabla 2). Se usó la estadística de Kruskal-Wallis (XIStat-pro v. 7.5.2) para someter a prueba si el grado de variación inducida en cultivo tisular difería significativamente entre los regenerantes derivados a través de embrio- y androgénesis y entre todos los regenerantes.

Results

Pruebas de la uniformidad de la progenie derivada sexualmente

Se generaron moldes para AFLP de las dieciséis plantas derivadas sexualmente a partir de ambos productos digeridos de *Acc65I/MseI* y *KpnII/MseI*, y se amplificaron con diez combinaciones de cebadores selectivos (CpG-GGC/MCAA; CpG-GGC/MCAC; CpG-GGC/MCAG; CpXpG-AGA/MCAC; CpXpG-AGA/MCCA; pXpG-AGC/MCAC; CpXpGAGC/MCGA; CpXpG-AGC/MCGC; CpXpG-AGG/MCAA; CpXpG-AGT/MCGC) para producir un total de 764 fragmentos a lo largo de ambos productos digeridos. Los perfiles fueron invariantes a través de las dieciséis plantas, excepto en los casos de combinación de cebadores selectivos (CpG-GGC/MCAC) que suministraron dos fragmentos variables de *Acc65I/MseI*, y CpXpG-AGT/MCGC, que produjeron un fragmento variable de *KpnII/MseI*. Por tanto, la tasa de fondo de variación es del orden del 0,26% en *Acc65I/MseI* y del 0,13% *KpnII/MseI*. Cuando se recalcularon basándose en el número de acontecimientos (número total de señales polimórficas que difirieron de las 0 o 1 señales más representativas dividido entre el número de plantas y multiplicado por número de los AFLP puntuados), se concluyó que el modo sexual de reproducción genera polimorfismo a una frecuencia del 0,03 al 0,04%.

Pruebas de regenerantes derivados a través de embrio y androgénesis

En total, se regeneraron 19 plantas viables independientes a partir del cultivo tisular. Éstas consistían en siete en el conjunto E y doce en el conjunto A. Todas las plantas podían dar por completo autofertilización y se asemejaban a su planta madre en el fenotipo. Se generaron huellas dactilares uniformes y reproducibles a partir de los moldes del donante parental y sus regenerantes usando siete pares de cebadores selectivos (CpXpGAGG/CAG; CpGGCA/MCGC; CpXpG-AGC/MCCA; CpXpG-AGG/MCAC; CpGGGC/MCAA; CpXpG-TGC/MCCG; CpXpGAGA/MCAA) (Figura 3). En total, se identificaron 272 fragmentos a través de ambos perfiles de AFLP de *Acc65I/MseI* y *KpnII/MseI*. En cada uno de los conjuntos de perfiles, 229 fragmentos eran invariantes dentro del conjunto de ADN de prueba (todos los regenerantes y la planta donante). En total, 206 fragmentos eran monomórficos a través de todas las muestras. *Acc65I* y *KpnII* identificaron cada uno 43 fragmentos polimórficos, de los que 23 eran específicos para, pero monomórficos dentro de una de las combinaciones de isoesquizómeros. Entre éstos, sólo variaron ocho fragmentos de *Acc65I/MseI* y siete *KpnII/MseI* con respecto a la intensidad de banda.

Análisis estadístico

El análisis de agrupación demostró que los ADN de las plantas regeneradas digeridas con *Acc65I/MseI* formaban agrupaciones que eran distintas e independientes de aquéllas digeridas con *KpnII/MseI*. No fueron evidentes subagrupaciones individuales para los conjuntos "E" o "A" (figura 4). Un análisis factorial (convergencia de 0,001 tras 25 iteraciones) mostró que las variables F1 y F2 explican el 98% de la variación identificada entre los conjuntos de *Acc65I/MseI* y *KpnII/MseI*. Las proporciones respectivas para F1-F3 y F2-F3 fueron del 67% y el 33%. Una vez más, se formaron dos agrupaciones, siendo el grupo de *KpnII/MseI* más compacto que el de *Acc65I/MseI* (figura 5). El AMOVA mostró que el 69% de la variación resultaba de diferencias entre los dos productos digeridos, pero no obstante los conjuntos de datos seguían estando altamente correlacionados, tal como se indicó mediante la prueba de Mantel ($R^2 > 0,9991$, $p = 0,001$).

Explicación de patrones de metAFLP

Se diseñó el sistema experimental para detectar varios acontecimientos distintos que pueden haberse producido durante el cultivo tisular. Los isoesquizómeros reconocen la misma secuencia de escisión, pero difieren en su sensibilidad a la metilación en el sitio de reconocimiento: *Acc65I* digiere secuencias no metiladas pero no las metiladas, mientras que *KpnI* es insensible a la metilación en el sitio de reconocimiento. Los diversos cambios detectables mediante este enfoque de metAFLP se resumen en la tabla 2, en la que se comparan perfiles de regenerante con los del donante. La mayoría (siete) de los patrones podrían haberse generado mediante un único acontecimiento, aunque para algunas variantes es posible más de una explicación. Por ejemplo, el patrón "0011" describe un fragmento que se metila tanto en el molde del donante como del regenerante, de modo que está presente en el producto digerido de *KpnI/MseI*, pero ausente en el de *Acc56I/MseI*, y no es un acontecimiento inducido en cultivo tisular; mientras que se suministra el patrón "0101" cuando un acontecimiento inducido en cultivo tisular introduce un sitio de reconocimiento no metilado presente en el molde parental. En cambio, el patrón "1000" podría haberse generado o bien a partir de la desmetilación de un único sitio metilado o bien la desmetilación del sitio externo (si se consideran dos sitios adyacentes). Algunos de los patrones no pudieron asignarse a un único acontecimiento ("0010" o "0001") y éstos se denominan "variación mixta". Se proporcionan todos los posibles pares de donante - regenerante en la figura 2 y la clasificación admisible del patrón de AFLP al tipo de acontecimiento apropiado.

Variación inducida en cultivo tisular

Entre los regenerantes, se observaron 11 de los 14 posibles patrones descritos en la tabla 2 al menos una vez. No se detectaron dos patrones de variación mixta (0100 y 1001) y de una única secuencia (0010). A través de todos los regenerantes, se conservó el 94,7% de los fragmentos de restricción con respecto al estado de metilación, se conservaron el 95,1 y el 94,4% para las plantas derivadas de embriones y anteras. De estas secuencias invariantes, los sitios de reconocimiento no metilados fueron mucho más comunes que los metilados. La estimación de la frecuencia de acontecimientos inducidos en cultivo tisular se basó en el siguiente razonamiento: en primer lugar, se tomó el número total de acontecimientos (5168) como el número de fragmentos de *Acc65I/MseI* y *KpnI/MseI* analizados (272) por el número (19) de regenerantes. Los números equivalentes para los regenerantes E y A fueron, respectivamente, de 7x272 (1904) y 12x272 (3264). Se identificaron distintos acontecimientos inducidos en cultivo tisular mediante la puntuación para la presencia/ausencia de fragmentos en los dos productos digeridos, a través de los ADN de donante y regenerante, tal como se detalla en la tabla 2 (Si faltaba la banda en uno de los productos digeridos y estaba presente en el segundo en al menos un caso entonces se puntuaba como cero y uno, respectivamente, dando como resultado dos matrices 0-1 de la misma dimensión). El número total de cambios era igual a los acontecimientos en número total menos el de la herencia de metilación (patrones 0011 y 1100). Este valor es igual al número de acontecimientos que comprenden variación inducida en cultivo tisular total. Se calculó la frecuencia de cambios en el producto digerido de *KpnI/MseI* como el número total de diferencias entre los perfiles de donante y de regenerante y se facilita una estimación de la variación de secuencia. Entonces, la frecuencia de metilación de sitios inducida en cultivo tisular es la diferencia entre aquella para la variación inducida en cultivo tisular total y la identificada en los productos digeridos de *KpnI/MseI*. Éstos se convierten en porcentajes usando el número total apropiado de fragmentos estudiados (5168, 1904 y 3264 para total, E y A). Por ejemplo, el número total de cambios identificados basado en ambos productos digeridos es de 275 (5,3%), el número de cambios de secuencia de 101 (2,0%), y el número de variantes de metilación de 174 (3,4%). Esta última estimación comprende porcentajes de variación inducida en cultivo tisular total (TTCV) menores que los porcentajes de variación de secuencia (SV) calculados basado en el producto digerido de *KpnI/MseI*. El cálculo de los TTCV es la suma de 11 acontecimientos (tabla 2) normalizado por el número de acontecimientos y expresado en porcentajes. Se definieron los sitios conservados (aquéllos que no cambiaron en el estado de metilación) en términos de porcentaje como todos los sitios puntuados menos los sitios que variaron en TTCV (94,7% a través de todos los regenerantes). Se puntuaron los sitios de metilación heredados como todos los sitios que no cambiaron en el estado de metilación (que siguieron estando o bien metilados o bien no metilados). Éstos representan el 12,7% de fragmentos. La frecuencia de desmetilación es del mismo nivel en células somáticas y en gaméticas (0,4%). En cambio, se produjo metilación *de novo* un poco menos frecuentemente en "E" (1,1%) que en "A" (1,4%). La estimación de las frecuencias globales de acontecimientos de metilación a lo largo de los dos tipos de regenerante es, respectivamente, del 3,0% y el 3,6%. Los "acontecimientos mixtos" representaron el 1,5% y el 2,0%, respectivamente. De manera similar, las frecuencias de variación de secuencia fueron del 1,9% y el 2,1%. Finalmente, las proporciones globales de los fragmentos de restricción alteradas como consecuencia del tratamiento en cultivo tisular fueron del 4,9% y el 5,6% para, respectivamente, el regenerante E y A.

Todas las plantas regeneradas presentaron o variación de secuencia o / y cambios en el patrón de metilación, con una media de aproximadamente 14 alteraciones por planta. Aproximadamente el 44% de los cambios afectaron a las plantas derivadas a través de embriogénesis. Hubo poca diferencia en el número medio de cambios de secuencia y alteraciones en los patrones de metilación entre las plantas derivadas de embriones y anteras. La variación inducida en cultivo tisular se distribuyó, sin embargo, irregularmente entre los regenerantes, variando entre 10 y 16 acontecimientos en los primeros tipos, y entre 13 y 20 en los últimos tipos de regenerantes. La estadística de Kruskal-Wallis, sin embargo, sugiere que no existe un efecto significativo del modo de regeneración sobre el grado

de variación inducida en cultivo tisular.

Puntos calientes de variación inducida en cultivo tisular

5 Se observaron ocho fragmentos que parecen haberse comportado como puntos calientes de variación, en el sentido de que todas o casi todas las plantas regeneradas se alteraron en la secuencia o en el estado de metilación en relación con el donante. Por tanto, por ejemplo, el perfil de *Acc65l* de todos los regenerantes incluyó un fragmento que estaba ausente en el donante, mientras que el mismo fragmento estaba presente en los perfiles de *Kpnl* tanto de donante como de regenerante. Se clasificaron los acontecimientos como mixtos (0100 -100%; dos 1000 - 100%;),
10 desmetilación (0111 - 100%), metilación *de novo* (1011 - 95%) y cambio de secuencia y tres acontecimientos de secuencia (0001-100%; 0001 - 95%; 1010 - 95%).

Un hallazgo importante es que casi el 95% de los sitios se transmitieron de manera fiel a todas las plantas regenerantes independientemente de cómo se regeneraron (mediante embrio o androgénesis). De manera interesante, sólo aproximadamente el 12% de los sitios siguieron estando metilados de manera estable, lo que es casi siete veces menos que los no metilados. Estos datos son comparables con los de (Chakrabardad, *et al.* 2003) que evaluaron el grado y el patrón de metilación de citosinas durante la embriogénesis somática en *Eleurenococcus senticosus*, y mostraron que más del 11% de los sitios estaban metilados en tejido de callo embriogénico. Se han obtenido estimaciones bastante mayores del grado de metilación en arroz (16%), y en palmera de aceite derivada de embriones (20%) por (Jaligot, *et al.* 2000).
15
20

La estrategia que se ha desarrollado ha permitido tanto cuantificar como calificar la variación inducida en cultivo tisular en plantas de cebada regeneradas a partir de embriones y microsporas. Se muestra que ésta se produce a una frecuencia de dos magnitudes mayor que la tasa de fondo asociada con la reproducción sexual, y se ha podido repartir la variación en cambios en el estado de metilación y la secuencia, para estimar la proporción de sitios no afectados por la variación, para distinguir entre sitios metilados y no metilados, y para predecir la aparición de bandas con intensidad variable. También pueden examinarse los cambios que afectaron a plantas individuales y especificar el grado en que pueden diferir de la donante. Aunque no se intentó en el presente documento, se cree que usando cebadores selectivos especialmente diseñados, debe ser posible diferenciar entre diversos tipos de metilación y obtener de ese modo cierto conocimiento de la variación de secuencia, definiendo si está inducida por migración de elementos móviles, por cambios en el número de copias de microsatélites o por mutaciones dentro de regiones genómicas pertenecientes a diferentes familias de proteínas. Se cree que el enfoque analítico es el primero que puede diferenciar entre dos clases principales de variación genética (mutación de secuencia) y epigenética (metilación) inducida en tejido, y proporcionar una descripción cuantitativa y cualitativa de su contribución relativa. Esto representa un medio para acceder a la variación inducida en tejido entre los regenerantes que comparten un fenotipo uniforme. Además, tras modificaciones menores, el enfoque podría usarse para estudiar la herencia de la variación inducida en cultivo tisular entre progenies de los regenerantes que proporcionan características de variación somaclonal. Es posible anticipar el desarrollo de este enfoque para la disección de la herencia epigenética.
25
30
35

40 **Bibliografía**

- Aina R, Sgorbati S, Santagostino A, Labra M, Ghiani A, Citterio S. (2004) Specific hypomethylation of DNA is induced by heavy metals in white clover and industrial hemp. *Physiol Plant* 121:472-480.
- 45 Arene L, Pellegrino C, Gudín S. (1993) A comparison of the somaclonal variation level of *Rosa hybrida* L. cv. Meirutral plants regenerated from callus or direct induction from different vegetative and embryonic tissues. *Euphytica* 71:83-90.
- Bednarek PT, Kubicka H, Zawada M. (2002) Morphology, cytology and BSA based testing on limited segregation population AFLPs. *Cell Mol Biol Let* 7: 635-648.
50
- Bouman H, De Klerk G-J. (2001) Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays. *Theor Appl Genet* 102:111-117.
- Brar DS, Jain SM. (1998) Somaclonal variation: mechanism and applications in crop improvement. In: *Somaclonal variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London:16-37.
55
- Bregitzer P, Halbert SE, Lemaux PG. (1998) Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. *Theor Appl Genet* 96:421-425.
- 60 Breyne P, Rombaut D, Gysel A, Montagu M, Gerats T. (1999) AFLP analysis of genetic diversity within and between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Mol Gen Genet* 261:627-634.
- Brown PTH, Lange FD, Kranz E, Lörz H. (1993) Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology. *Molecular General Genetics* 237:311-317.
65
- Cervera M, Ruiz-García L, Martínez-Zapater J. (2002) Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on

- methylation-sensitive AFLP markers. *Molecular Genetics and Genomics* 268:DOI 10.1007/s00438-002-0772-4.
- Chakrabarty D, Yu KW, Paek KY. (2003) Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (*Eleutherococcus senticosus*). *Plant Science* 165:61-68.
- 5 Chu C. (1978) The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proc. Symp. Plant Tissue Culture*, Science Press Beijing:43-50.
- Devaux P, Kilian A, Kleinhofs A. (1993) Anther culture and *Hordeum bulbosum*-derived barley doubled haploids: mutations and methylation. *Mol. Gen. Genet.* 241:674-679.
- 10 Donini P, Elias ML, Bougourd SM, Koebner ROD. (1997) AFLP fingerprinting reveals pattern differences between template DNA extracted from different plant organs. *Genome* 40:521-526.
- 15 Fourré J-L, Berger P, Niquet L, André P. (1997) Somatic embryogenesis and somaclonal variation in Norway spruce: morphogenetic, cytogenetic and molecular approaches. *Theor Appl Genet* 94: 159-169.
- Freyssinet M, Freyssinet G. (1988) Fertil plant regeneration from sunflower (*Heliantus annuus* L.) immature embryos. *Plant Sci.* 56:177-181.
- 20 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.
- Gray DJ, Compton ME, Harrell RC, Contcliffe DJ. (1995) Somatic embryogenesis and the technology of synthetic seed. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Somatic Embryogenesis and synthetic seed I*. Springer, Berlin 30:126-151.
- 25 Guzy-Wróblewska J, Szarejko I. (2003) Molecular and agronomic evaluation of wheat double haploid lines obtained through maize pollination and anther methods. *Plant Breeding* 122:305-313.
- 30 Habu Y, Kakutani, T. and Paszkowski, J. (2001) Epigenetic developmental mechanisms in plants: Molecules and targets of plant epigenetic regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 11:215-220.
- Hossain MA, Konisho K, Minami M, Nemoto K. (2003) Somaclonal variation of regenerated plants in chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica* 130:233-239.
- 35 Jacobsen SE, Sakai, H., Finnegan, E. J., Cao, X. and Meyerowitz, E. M. (2000) Ectopic hypermethylation of flower-specific genes in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 10:179-186.
- 40 Jaligot E, Beulé T, Rival A. (2002) Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theor Appl Genet* 104:1263 - 1269.
- Jaligot E, Rival A, Beulé T, Dussert S, Verdeil J-L. (2000) Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports* 19:684 - 690.
- 45 Kakutani T, Munakata, K., Richards, E. J. and Hirochika, H. (1999) Meiotically and mitotically stable inheritance of DNA hypomethylation induced by *ddm1* mutation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 151: 831-838.
- Kudirka DT, Schaeffer GW, Beanzinger PS. (1989) Stability of ploidy in meristems of plants regenerated from anther calli of wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). *Genome* 32:1068-1073.
- 50 Larkin PJ, Scowcroft WR. (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60: 197-214.
- 55 Linacero R, Freitas AE, Vázquez AM. (2000) Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye. *Theor Appl Genet* 100: 506-511.
- Munthali MT, Newbury HJ, Ford-Lloyd BV. (1996) The detection of somaclonal variants of beet using RAPD. *Plant Cell Reports* 15:474 - 478.
- 60 Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J. (2005) Androgenic response to pre-culture stress in the microspore cultures of barley. *Protoplasma* in press
- Pauk J, Manninen O, Mattila I, Salo Y, Pulli S. (1991) Androgenesis in hexaploid spring wheat F2 populations and their parents using a multiple-step regeneration system. *Plant Breeding* 107:18-27.
- 65

- Peakall R, Smouse PE. (2001) GenALEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenALEx/>
- 5 Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia VA, James-Kay A. (2001) Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science* 161:359-367.
- 10 Peshke VM, Phillips RL. (1991) Activation of the maize transposable element Suppressor-mutator (Spm) in tissue culture. *Theor Appl Genet* 81:90-97.
- Portis E, Acquadro A, Comino C, Lanteri S. (2003) Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Science* 166:169-178.
- 15 Remotti PC. (1998) Somaclonal variation and in vitro selection for crop improvement. In: *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Eds. Jain, S.M., Brar, D.S., Ahloowalia, B.S.: 169-201.
- 20 Reyna-López GE, Simpson J, Ruiz-Herrera 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.
- Roseland CS, Espinasse A, Grosz TJ. (1991) Somaclonal variants of sunflower with modified coumarin expression under stress. *Euphatica* 54
- 25 Saiotu N, Nei M. (1986) The number of nucleotides required to determine the branching order of three species, with special reference to human - Chimpanzee- Gorilla divergence. *J. Mol. Evolution* 24: 189-204.
- Thomas E, Bright SWJ, Franklin J, Lancaster V, Miflin BJ. (1982) Variation amongst protoplast-derived potato plants (*Solanum tuberosum* cv, "Maris Bar"). *Theor Appl Genet* 62:65-68.
- 30 Vendrame WA, Kochert G, Wetzstein HY. (1999) AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports* 18:853-857.
- 35 Vos P, Hogers R, Bleeker M, Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zauber M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acids Res* 23:4407-4414.
- Wang ZY, Nagel J, Potrykus I, Spangenberg G. (1993) Plants from cell suspension-derived protoplasts in *Lolium* species. *Plant Sci* 94:179-193.
- 40 Xiong LZ, Xu CG, Saghai Maroof MA, 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.
- 45 Zhuang JJ, Xu J. (1983) Increasing differentiation frequencies in wheat pollen calus. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement* (Hu, H. and Vega, M.R. Eds). Science Press Beijing 431
- Zimny J, Lörz H. (1989) High frequency of somatic embryogenesis and plant regeneration of rye (*Secale cereale* L.). *Z. Pflanzenzüchtung* 102:89-100.

REIVINDICACIONES

1. Uso de la técnica de AFLP que se compone de las etapas: aislar ADN genómico, digerir el ADN genómico con un par de endonucleasas de restricción y digerir otra parte del mismo ADN con otro par de endonucleasas de restricción, hibridar heterodúplex sintéticos a los extremos de restricción libres, amplificar inicialmente los fragmentos obtenidos de tal manera por medio de PCR primaria, amplificar selectivamente, separar los productos de PCR en un gel de poliacrilamida, realizar un análisis de perfil visual para el método para la identificación de variabilidad inducida por el método de derivación en cultivos *in vitro* a nivel de plantas regenerantes, así como la variación heredada como resultado de propagación generativa que consiste en las siguientes etapas:
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- 1) estimar la repetibilidad de las dos variantes de la técnica de AFLP: controlar la repetibilidad de AFLP basado en la identidad de varias muestras de ADN de la misma planta a través del uso de AFLP e isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;
 - 2) estimar la repetibilidad de las dos variantes de la técnica de AFLP: controlar la repetibilidad de AFLP basado en la identidad de varias muestras de ADN de la misma planta a través del uso de AFLP e isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos usando un conjunto diferente de cebadores de AFLP selectivos a los usados en los demás análisis de AFLP;
 - 3) identificar la variabilidad inducida por el método de derivación de los regenerantes en relación con la planta donante, lo que se realiza en dos variantes de AFLP usando isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;
 - 4) identificar la variabilidad inducida en cultivo tisular entre los regenerantes en relación con la planta donante, lo que se realiza en dos variantes de la técnica de AFLP utilizando isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;
 - 5) identificar la variabilidad somaclonal entre la progenie de regenerantes en relación con la planta donante, lo que se lleva a cabo usando dos variantes de la técnica de AFLP utilizando isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP;
 - 6) realizar el análisis molecular del material experimental usando la técnica de AFLP teniendo en cuenta isoesquizómeros tanto sensibles como insensibles a la metilación en el sitio de restricción y/o zonas adyacentes así como un número representativo de pares de cebadores selectivos idénticos en todos los análisis de AFLP, que se compone de las siguientes etapas:
 - a) realizar análisis de patrones de AFLP de plantas donantes con respecto a la variabilidad genética y epigenética inducida durante la propagación generativa de una planta individual, un control de la propagación generativa,
 - b) realizar análisis de patrones de AFLP para el control de la reproducibilidad de ambas variantes de la técnica de AFLP,
 - c) realizar un análisis de patrones de AFLP para los regenerantes en comparación con plantas donantes o regenerantes separados en relación con plantas donantes apropiadas;
 - d) realizar análisis de patrones de AFLP para la planta donante, su regenerante y la progenie de regenerantes, o las distintas líneas de progenie de regenerantes junto con la planta donante apropiada y sus plantas regenerantes;
 - 7) identificar los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria para sistemas sensibles e insensibles a la metilación, que son el resultado de una comparación entre la planta donante con los regenerantes y entre la planta donante con la progenie de regenerantes simultáneamente en dos sistemas de AFLP, en el que se lleva a cabo la identificación de tipos de acontecimiento individualmente para cada regenerante y en masa para progenies de regenerantes y se representa como 14 matrices binarias que describen cada uno de los acontecimientos independientemente, subdivididos en métodos de derivación; en el que las columnas representan regenerantes consecutivos o masas y las filas representan fragmentos de AFLP consecutivos;

- 8) asignar determinados tipos de acontecimiento a un tipo dado de variabilidad inducida el método de derivación en relación con cada regenerante;
- 5 9) identificar los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria para sistemas sensibles e insensibles a la metilación, que son el resultado de una comparación entre la planta donante con regenerante simultáneamente en dos sistemas de AFLP;
- 10 10) identificar los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria para sistemas sensibles e insensibles a la metilación, que son el resultado de una comparación entre la planta donante con la progenie de regenerantes simultáneamente en dos sistemas de AFLP, en el que se realiza la identificación de tipos de acontecimiento a través de la suma de los genotipos de una progenie resumen dada, y a través de la comparación de un perfil de AFLP total de este tipo de la progenie de regenerantes con el perfil de la planta donante,
- 15 11) el genotipo de la progenie de regenerantes en masa expresado mediante un perfil de AFLP para sistemas sensibles e insensibles a la metilación a nivel de fragmentos de AFLP individuales tiene un valor diferente del de la planta donante en un sistema de AFLP dado, siempre que un fragmento dado dentro del mismo sea polimórfico, o es totalmente diferente de este valor para la planta donante; en el caso opuesto, los valores para la planta donante y la progenie de regenerantes en masa para un fragmento de AFLP dado en un sistema de AFLP dado son idénticos,
- 20 12) producir una matriz cuantitativa para los regenerantes, en la que las columnas contienen datos para regenerantes consecutivos agrupados mediante el método de derivación, y las filas contienen los 14 tipos de acontecimientos que pueden asignarse a cada progenie de regenerantes;
- 25 13) producir una matriz cuantitativa para la progenie de regenerantes, en la que las columnas contienen datos en masa para la progenie de regenerantes agrupados mediante el método de derivación, y las filas contienen los 14 tipos de acontecimientos que pueden asignarse a cada progenie de regenerantes en masa;
- 30 14) producir una matriz cuantitativa para los acontecimientos en regenerantes, siendo ésta una matriz cuantitativa para los regenerantes tras la transposición, en la que las columnas contienen 14 acontecimientos y las filas contienen regenerantes agrupados mediante el método de derivación;
- 35 15) calcular el número total de acontecimientos basado en la matriz binaria para métodos individuales de derivación de regenerantes así como para los regenerantes, calculándose el número total de acontecimientos como un producto del número de fragmentos de AFLP identificados en ambos sistemas de AFLP para todos los pares de cebadores selectivos multiplicado por el número de regenerantes derivados mediante un método dado;
- 40 16) calcular el número total de acontecimientos basado en la matriz binaria para métodos individuales de derivación de regenerantes así como para progenies de regenerantes en masa, correspondiendo el número total de acontecimientos al número de fragmentos de ADN idénticos o diferentes en ambos sistemas de AFLP para todos los pares de cebadores selectivos usados en el análisis;
- 45 17) calcular el error que se origina de la propagación generativa, lo que se lleva a cabo basado en la matriz binaria de plantas donantes y una única planta; determinar el número de acontecimientos diferentes de aquéllos en una única planta perteneciente a las plantas donantes, y calcular el número total de acontecimientos para la planta donantes;
- 50 18) calcular el error que se origina de la de la técnica de AFLP, lo que se lleva a cabo basándose en la matriz binaria para muestras de ADN obtenidas de la misma planta y sometidas a las etapas de la técnica de AFLP usando isoescizómeros sensibles e insensibles a la metilación en el sitio de restricción o sus alrededores inmediatos así como un número representativo de pares de iniciadores selectivos idénticos en todos los sistemas de AFLP, calculándose el número total de acontecimientos y el número de acontecimientos polimórficos, y se expresa este último número como porcentaje;
- 55 19) determinar, basado en matrices binarias para los regenerantes y la planta donante, grupos de acontecimientos que describen: (a) la variación de secuencia relacionada con cualquier cambio en las secuencias de nucleótidos del ADN basado en datos de AFLP del sistema insensible a la metilación y (b) la variabilidad epigenética, la variabilidad *de novo* de patrones de metilación, y adicionalmente la variación mixta que es variabilidad de secuencia y metilación basado en datos para ambos sistemas de AFLP;
- 60 20) determinar, basado en matrices binarias para la progenie de regenerantes en masa y la planta donante, grupos de acontecimientos que describen (a) la variación de secuencia relacionada con todos los cambios de nucleótidos del ADN basado en datos de AFLP del sistema insensible a la metilación y (b) la variabilidad
- 65

epigenética, la variabilidad *de novo* de patrones de metilación, y adicionalmente la variación mixta que es variabilidad de secuencia y metilación, y (c) la herencia de patrones de metilación tal como se relaciona con la presencia y/o falta de metilación en el sitio de restricción o sus proximidades, basado en datos para ambos sistemas de AFLP;

5 21) identificar acontecimientos particularmente sometidos a la actividad de factores que inducen la variabilidad en cultivos *in vitro*;

10 22) realizar el análisis de secuencia de tipos individuales de acontecimiento y/o amplia variabilidad de secuencia, identificándose la variabilidad usando variantes de la técnica de AFLP usando cebadores dirigidos contra secuencias conservativas dentro de elementos móviles, secuencias de repetición o las secuencias de familias génicas conservativas;

15 23) realizar un análisis estadístico de la planta donante y sus regenerantes así como la progenie de regenerantes, y posiblemente distintos regenerantes y progenes de regenerantes junto con plantas donantes apropiadas, así como el control de la reproducción de AFLP y el control de la propagación generativa:

20 a) realizar un análisis estadístico de los resultados de AFLP usando análisis paramétrico, la prueba de Mantel y/o el coeficiente alfa de Cronbach así como análisis de la varianza molecular usando los coeficientes F_s o Φ_{is} ;

25 b) determinar el error de las estimaciones de variabilidad somaclonal e inducida en cultivo tisular, basado en el coeficiente de correlación de la prueba de Mantel;

c) determinar los parámetros cuantitativos de la variabilidad inducida por el método de derivación de regenerantes y la variabilidad somaclonal para los regenerantes, progenes individuales de regenerantes, teniendo en cuenta el método de derivación y proporcionando su nivel de significación estadística;

30 d) determinar estadísticamente las diferencias entre tipos individuales de acontecimientos inducidos en cultivos *in vitro* para los regenerantes, así como la progenie de regenerantes en masa, agrupados mediante un método de derivación y complementados mediante su significación estadística usando matrices cuantitativas de acontecimientos;

35 e) realizar un análisis estadístico de la comparación entre la variabilidad inducida por el método de derivación así como la variación somaclonal, determinado a través de la comparación del perfil de la planta donante, y el perfil en masa de la progenie de regenerantes y sus tipos: variabilidad de secuencia y/o amplia variabilidad de secuencia, metilación *de novo*, desmetilación, variabilidad mixta, herencia de: patrones de metilación, sitios no metilados o sitios conservativos en la progenie de regenerantes, agrupados mediante un método de derivación así como una comparación por método de derivación de la progenie de regenerantes, cuando se usan matrices cuantitativas para los acontecimientos;

40 f) realizar comparaciones estadísticas de regenerantes, y las progenes de regenerantes en masa para diferentes métodos de derivación para una progenie de regenerantes dada, cuando se usan matrices cuantitativas de la progenie;

45 g) realizar una comparación estadística de los resultados de los puntos mencionados anteriormente para regenerantes individuales y progenes de regenerantes en masa entre sí;

50 h) realizar una comparación estadística o cualitativa de la variación somaclonal entre plantas individuales que son la progenie generativa de regenerantes;

55 i) recoger los resultados existentes en forma de una compilación que indica características cuantitativas de variabilidad inducida por el método de derivación determinado a nivel del regenerante, así como características cuantitativas de variabilidad heredada determinada a nivel de la progenie de regenerantes.

2. Uso según la reivindicación 1, en el que la identificación de los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de la matriz binaria se selecciona de los acontecimientos representados en la figura 7.

60 3. Uso según la reivindicación 1, en el que para derivar plantas donantes, se usa una única planta que es un haploide duplicado derivado de una microspora aislada, en el que se trata como control de la variabilidad genética y epigenética de plantas donantes.

65 4. Uso según la reivindicación 1, en el que la variabilidad genética y epigenética de material propagado de manera generativa, plantas donantes, se determina basado en perfiles de AFLP obtenidos de isoesquizómeros de endonucleasas de restricción que reconocen y que digieren secuencias idénticas, pero

que difieren en su sensibilidad a la metilación en o alrededor del sitio de restricción, en el que uno de los isoesquizómeros es insensible a la metilación.

- 5 5. Uso según la reivindicación 1, en el que en un sistema sensible e insensible a la metilación no se observan diferencias en los perfiles de AFLP de plantas donantes, entonces es insignificante el nivel de variabilidad inducida a través de propagación generativa e identificado con un par dado de cebadores selectivos.
- 10 6. Uso según la reivindicación 1, en el que cuando existen diferencias en los perfiles de AFLP para plantas donantes entre un sistema sensible y un sistema insensible a la metilación, se determina una parte porcentual de un acontecimiento de este tipo, junto con el nivel de fondo, el error de propagación generativa.
- 15 7. Uso según la reivindicación 1, en el que cuando existen diferencias en los perfiles de AFLP para replicantes experimentales en las mismas muestras de ADN, se estima el error de la técnica de AFLP con el fin de determinar el error experimental.
- 20 8. Uso según la reivindicación 1, en el que la parte integral del material de investigación se compone de plantas donantes, junto con una única planta, los regenerantes de la planta donante y progenies de regenerantes separadas.
- 25 9. Uso según la reivindicación 1, en el que la planta donante junto con los regenerantes y la progenie de regenerantes componen el núcleo de material de investigación para el estudio de la variabilidad inducida por el método de derivación o la variabilidad somaclonal, respectivamente.
- 30 10. Uso según la reivindicación 1, en el que se realiza el análisis molecular usando la técnica de AFLP en dos variantes, usando isoesquizómeros que difieren en su sensibilidad a la metilación.
- 35 11. Uso según la reivindicación 1, en el que uno de los isoesquizómeros es completamente insensible a la metilación.
- 40 12. Uso según la reivindicación 1, en el que en la identificación de productos de PCR segregados se usa un marcador isotópico que se introduce en el extremo 5' del cebador complementario al adaptor hibridado al sitio de restricción liberado por los isoesquizómeros.
- 45 13. Uso según la reivindicación 1, en el que se usan otros métodos de visualización de fragmentos de AFLP, incluyendo fluorescencia.
- 50 14. Uso según la reivindicación 1, en el que se realizan los perfiles de ambas variantes de AFLP para la planta donante junto con sus regenerantes y teniendo en cuenta el método de derivación y el control de la reproducibilidad de AFLP, con pares de cebadores de AFLP idénticos.
- 55 15. Uso según la reivindicación 1, en el que el análisis del perfil de AFLP y su conversión en matrices binarias se basa en el hecho de que los perfiles de AFLP de ambos sistemas de restrictasas para todos los pares de cebadores selectivos se introducen como una matriz binaria en una hoja de cálculo, en el que el conjunto de datos obtenido para un par de cebadores de AFLP selectivos se coloca bajo el anterior de manera que cada columna representa un perfil binario total para una planta donante en un sistema de AFLP, y las columnas posteriores contienen datos análogos para los regenerantes y los controles, en el que se registran datos para el segundo sistema de AFLP en columnas posteriores, en el que se ordenan las bandas de un sistema como las del sistema anterior (en filas), y cuando no aparece una banda dada, se introduce un cero en la fila apropiada de la hoja de cálculo.
- 60 16. Uso según la reivindicación 1, en el que el análisis del perfil de AFLP y su conversión en matrices binarias se basa en el hecho de que los perfiles de AFLP de ambos sistemas de restrictasas para todos los pares de cebadores selectivos se introducen como una matriz binaria en una hoja de cálculo, en el que el conjunto de datos obtenido para un par de cebadores de AFLP selectivos se coloca bajo el anterior de manera que cada columna representa un perfil binario total para una planta donante en un sistema de AFLP, y las columnas posteriores contienen datos análogos para progenies de regenerantes y los controles, en el que se registran datos para el segundo sistema de AFLP en columnas posteriores, en el que se ordenan las bandas de un sistema como las del sistema anterior (en filas), y cuando no aparece una banda dada, se introduce un cero en la fila apropiada de la hoja de cálculo.
- 65 17. Uso según la reivindicación 1, en el que el perfil de AFLP para la progenie de regenerantes se representa en forma de un genotipo en masa por variante de AFLP, sensible e insensible a la metilación por separado.
18. Uso según la reivindicación 1, en el que se lleva a cabo el control de la propagación generativa a través de la suma del número de señales (acontecimientos) de una única planta, en el que se calcula el número de

cambios como un porcentaje del número total de acontecimientos.

- 5 19. Uso según la reivindicación 1, en el que se realizan el análisis paramétrico, el análisis de correlación mediante la prueba de Mantel y el análisis de variabilidad molecular usando matrices binarias de sistemas de AFLP sensibles e insensibles a la metilación para los regenerantes y/o la progenie de regenerantes dependiendo de si está analizándose la variabilidad inducida en cultivo o heredada por la progenie de regenerantes.
- 10 20. Uso según la reivindicación 1, en el que se usa el análisis factorial como la representación gráfica de los resultados de AFLP.
- 15 21. Uso según la reivindicación 1, en el que la identificación de los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel del patrón de AFLP y asignados a la variabilidad inducida por el método de derivación se realiza basándose en patrones de AFLP, en el que se usa el perfil de la planta donante junto con perfiles de regenerante en ambos sistemas, y posteriormente se compara el perfil de cada regenerante con el perfil de la planta donante con el fin de identificar estos acontecimientos.
- 20 22. Uso según la reivindicación 1, en el que la identificación de los 14 tipos de acontecimientos reconocidos a nivel de patrones de AFLP y asignados a la variabilidad somaclonal se lleva a cabo basándose en patrones de AFLP, en el que se usa el perfil de la planta donante junto con perfiles en ambos sistemas de AFLP, y el perfil en masa de la progenie de regenerantes se compara con el perfil de la planta donante con el fin de identificar tipos de acontecimiento, en el que se supone que en caso de fragmentos polimórficos de AFLP del genotipo de la progenie de regenerantes en masa, se introduce un valor diferente del de la planta donante o un valor diferente si es diferente del de la planta donante en todas las progenies de regenerantes para un sistema de AFLP dado.
- 25 23. Uso según la reivindicación 1, en el que cuando los 14 tipos de acontecimientos comprenden la base para su segregación en grupos: variabilidad de secuencia, variabilidad de metilación (metilación y desmetilación), variabilidad mixta y herencia de patrones de metilación, en el que se tiene en cuenta que la variabilidad de secuencia se confirma de manera inequívoca en un sistema insensible a la metilación.
- 30 24. Uso según la reivindicación 1, en el que el análisis de la significación de acontecimientos y tipos de variabilidad independientes dentro de los regenerantes y la progenie de plantas regenerantes, tal como se agrupan mediante el método de derivación, se realiza basado en matrices cualitativas y matrices cuantitativas de acontecimientos que describen todos los acontecimientos teóricamente posibles, así como las plantas regenerantes y la progenie de regenerantes.
- 35 25. Uso según la reivindicación 1, en el que los resultados del análisis estadístico para regenerantes individuales y progenies de regenerantes en masa obtenidos a través de diversos medios se compilan en un todo; se introducen parámetros cuantitativos para la variabilidad inducida por el método de derivación y de la variabilidad somaclonal para regenerantes individuales y progenies de regenerantes en masa así como para progenies de regenerantes separadas agrupadas mediante el método de derivación y tipos de acontecimiento junto con parámetros estadísticos.
- 40 26. Uso según la reivindicación 1, en el que se identifican aquellos tipos de acontecimiento, que son poco comunes en cultivo o que no se producen en absoluto, así como aquéllos que están sometidos particularmente a la actividad de factores que inducen la variabilidad a nivel de regenerante y la progenie de regenerantes, así como para determinar sus parámetros cuantitativos.
- 45 27. Uso según la reivindicación 1, en el que se estudian tipos individuales de acontecimiento a nivel molecular a través del análisis de secuencia de fragmentos de AFLP que representan tipos individuales de acontecimientos, y por los mismos tipos de testigos de la variabilidad somaclonal.
- 50 28. Uso según la reivindicación 1, en el que se analiza una o más progenies de regenerantes en masa.
- 55 29. Uso según la reivindicación 1, en el que se proporcionan las características cuantitativas de un acontecimiento para cada progenie de regenerantes individual: variabilidad de secuencia, amplia variabilidad de secuencia, variabilidad epigenética de patrones de metilación (metilación *de novo*, desmetilación), estabilidad de sitios metilados y no metilados heredados (conservativos), frente a cambios inducidos en cultivos así como la introducción de diferencias cuantitativas en la variabilidad entre diferentes métodos de derivación de material de planta.
- 60 30. Uso según la reivindicación 1, en el que se realiza un análisis estadístico de la significación de tipos individuales de acontecimiento entre los regenerantes, la progenie de regenerantes en masa y progenies individuales de regenerantes según sea necesario, agrupados mediante el método de derivación del material de investigación.
- 65

- 5 31. Uso según la reivindicación 1, en el que se determina independientemente el nivel de en el que variabilidad somaclonal de plantas individuales que son la progenie de regenerantes, usando los principios usados para la variabilidad somaclonal.
- 10 32. Uso según la reivindicación 1, en el que se someten a prueba las hipótesis relacionadas con las fuentes de variabilidad inducida por el método de derivación de regenerantes y que se heredan como resultado de propagación generativa.
- 15 33. Uso según la reivindicación 1, en el que se realiza el análisis detallado de las causas de variabilidad de secuencia después de introducir cambios de procedimiento de AFLP menores, basado en la amplificación selectiva de material de investigación usando un cebador con etiqueta complementario a sitios conservativos de elementos transponibles, o a secuencias de macrosatélite.
- 20 34. Uso según la reivindicación 1, en el que se analiza la segregación de marcadores genéticos y epigenéticos para el mapeo de poblaciones derivadas a través de cruzamientos entre plantas que son la progenie de regenerantes con un genotipo conocido, basado en los perfiles de AFLP para ambos sistemas de AFLP.
- 25 35. Uso según la reivindicación 1, en el que el método está diseñado para derivar plantas *in vitro* con un nivel disminuido o potenciado de la variabilidad somaclonal a través de la identificación de las causas de esta variabilidad.
- 30 36. Uso según la reivindicación 1, en el que se verifica la pureza genética y epigenética de material arbitrario derivado a través de cultivo *in vitro*.
37. Uso según la reivindicación 1, en el que se usa el método en el análisis de la herencia de la variabilidad epigenética durante el cruzamiento sexual.
38. Uso según la reivindicación 1, en el que el método es una herramienta para la identificación de marcadores epigenéticos relacionados con las características utilitarias del material de planta.
39. Uso según la reivindicación 1, en el que se usa el método para la identificación de diferencias en patrones de metilación de ADN para diversos tejidos de una planta individual.

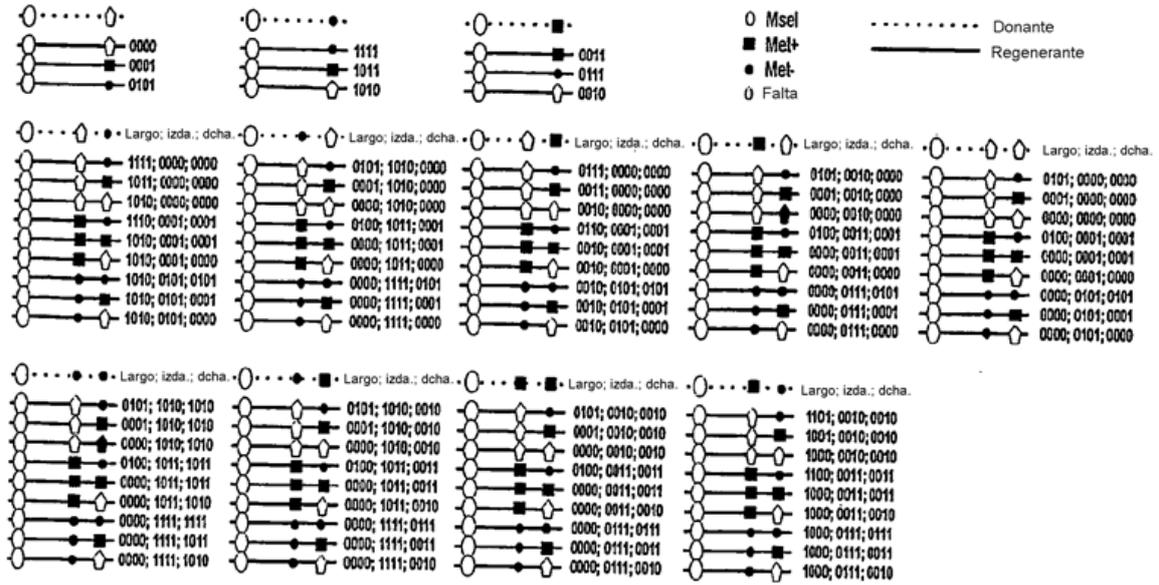


Fig. 2

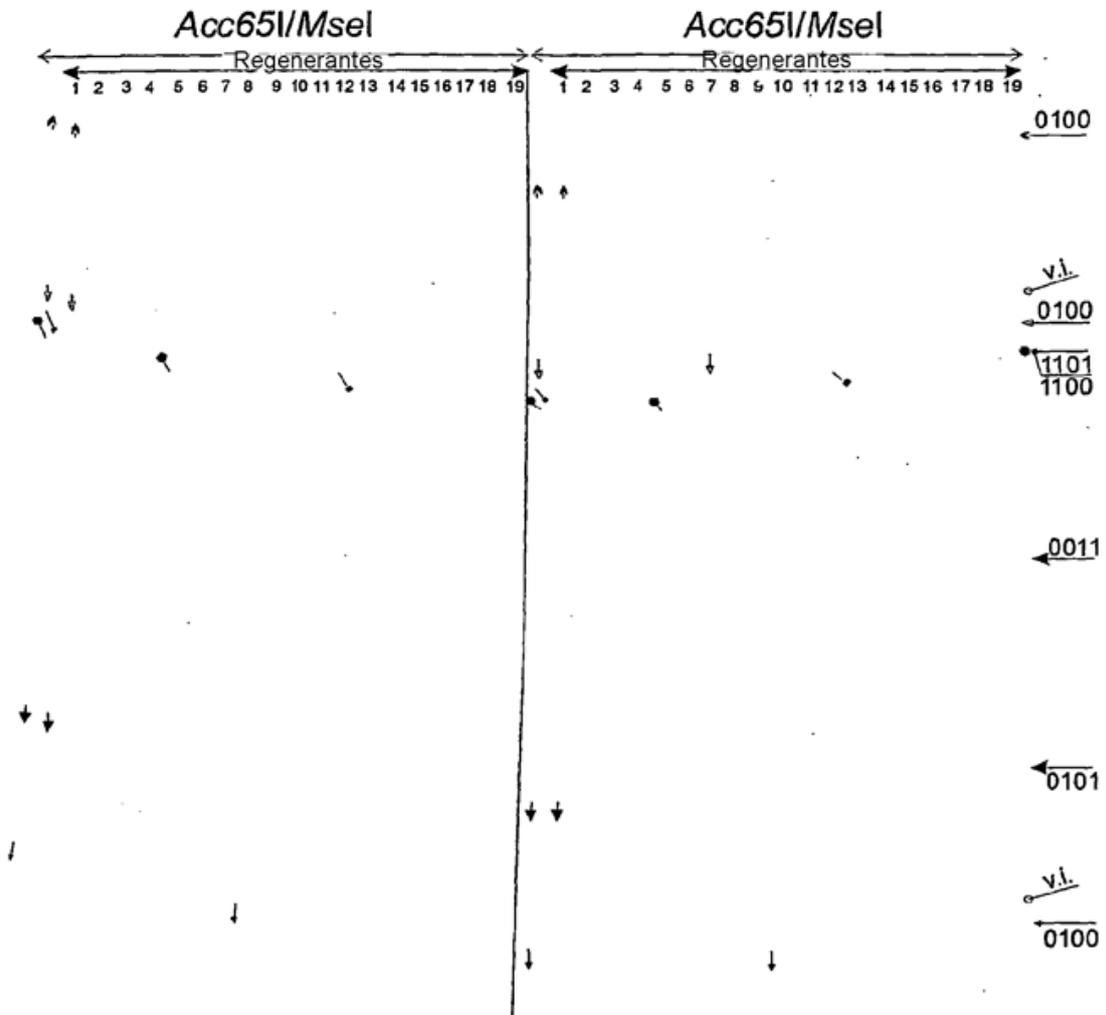


Fig. 3

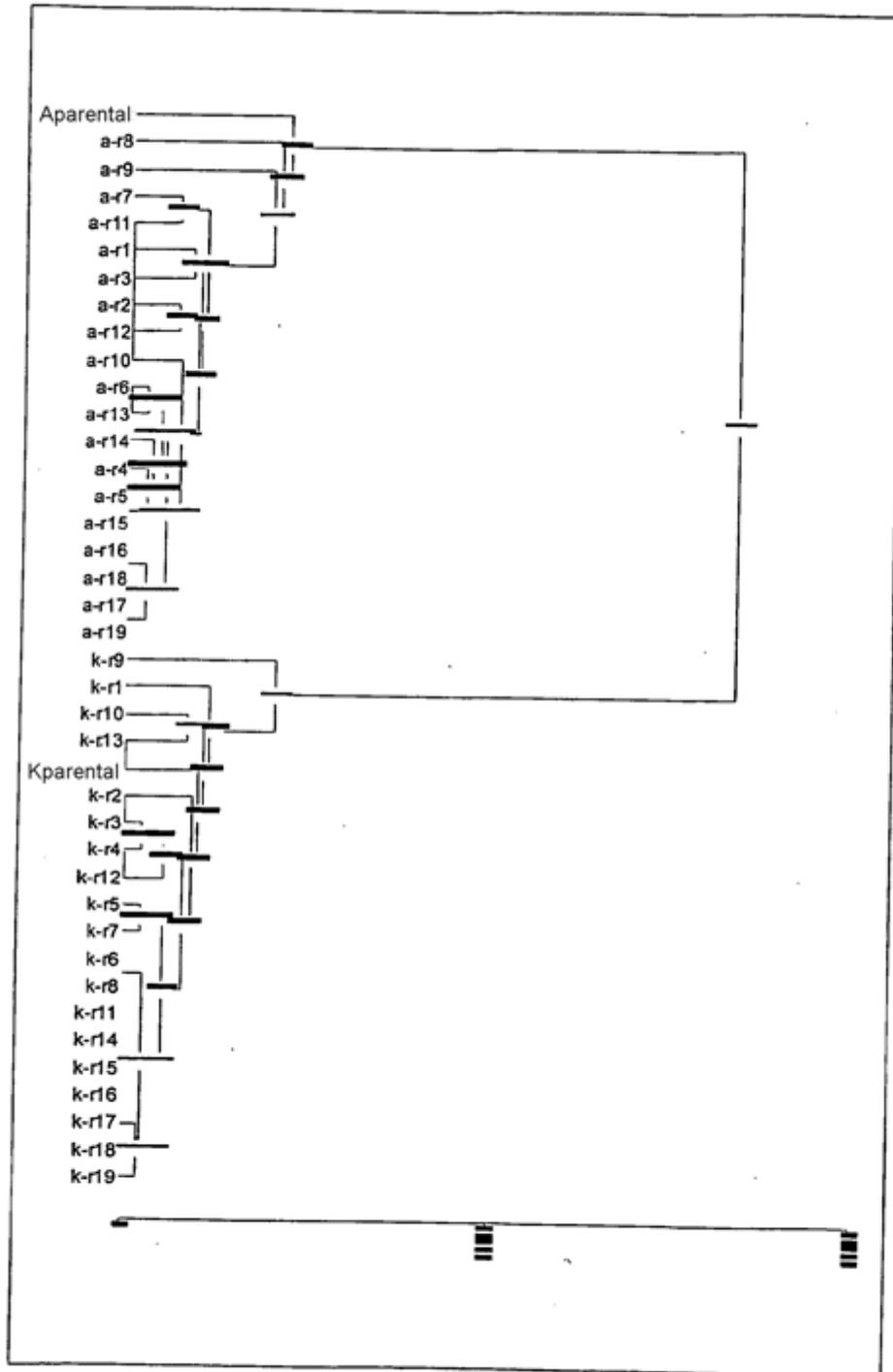


Fig. 4

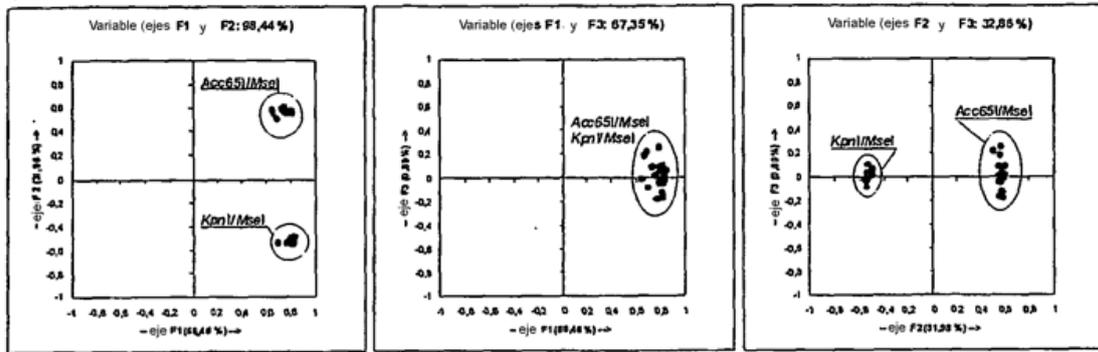


Fig. 5

Adaptadores/cebadores	Secuencia 5'→3'
Adaptador 1 de Acc65I	CTC GTA GCA TGC GTA CA
Adaptador 2 de Acc65I	GTA CTG TAC GCA TGC TAC
Adaptador 1 de KpnI	CTC GTA GCA TGC GTA CAG TAC
Adaptador 2 de KpnI	ACT CGT ACG ACT GT
Adaptador 1 de MseI	TAC TCA GGA CTC ATC
Adaptador 2 de MseI	GAG TCC TGA GTA GCA G
Cebador preselectivo de Acc65I/KpnI	GCA TGC GTA CAG TAC C
Cebador preselectivo de MseI	GAT GAG TCC TGA GTA AC
CpXpG-AGA	CA TGC GTA CAG TAC CAG A
CpXpG-AGC	CA TGC GTA CAG TAC CAG C
CpXpG-AGG	CA TGC GTA CAG TAC CAG G
CpXpG-TGC	CA TGC GTA CAG TAC CTG C
CpG-GCA	CA TGC GTA CAG TAC CGC A
CpG-GGC	CA TGC GTA CAG TAC CGG C
M-CAA	GAT GAG TCC TGA GTA ACA A
M-CAC	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
M-CAG	GAT GAG TCC TGA GTA ACA G
M-CCA	GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
M-CCG	GAT GAG TCC TGA GTA ACC G
M-CGC	GAT GAG TCC TGA GTA ACG C

Fig. 6

Patrón de AFLP	Tipo de acontecimiento	ACONTECIMIENTOS			% DE ACONTECIMIENTOS		
		E	A	Σ	%E	%A	%Σ
0011	herencia del estado de met+ (sin cambio)	98	166	264	5.2	5.1	5.1
1100	herencia del estado de met+ y met- (inequívoca - sin cambio)	146	245	391	7.7	7.5	7.6
0001	secuencia (un único cambio)	4	15	19	0.2	0.5	0.4
0010	secuencia (un único cambio)	0	0	0	0	0	0
0101	secuencia (un único cambio)	2	5	7	0.1	0.2	0.1
1010	secuencia (un único cambio)	7	12	19	0.4	0.4	0.4
1110	secuencia (inequívoca - un único cambio)	14	22	36	0.7	0.7	0.7
1101	secuencia (inequívoca)	10	10	20	0.5	0.3	0.4
1001	mixto (inequívoco)	0	0	0	0	0	0
0110	mixto (inequívoco)	0	0	0	0	0	0
0100	mixto	9	18	27	0.5	0.6	0.5
1000	mixto	19	45	64	1.0	1.4	1.2
0111	desmetilación (un único cambio)	7	14	21	0.4	0.4	0.4
1011	metilación de novo (un único cambio)	20	42	62	1.1	1.3	1.2
TIPO DE VARIACIÓN (patrones)							
VARIACIÓN DE SECUENCIA (0001, 0010, 0101, 1010, 1110, 1101)		37	64	101	1.9	2.1	2.0
VARIACIÓN MIXTA (0110, 1001, 1000)		28	63	91	1.5	2.0	1.7
HERENCIA DE MET. (0011)		98	166	264	5.2	5.1	5.1
MET+/- HER(1100)		146	245	391	7.7	7.5	7.6
DESMETILACIÓN(0111)		7	14	21	0.4	0.4	0.4
METILACIÓN DE NOVO(1011)		20	42	62	1.1	1.4	1.2
SUMAS							
Variación de secuencia (basado en el patrón de productos digeridos de KpnI/MseI)		37	64	101	1.9	2.1	2.0
Variación inducida en cultivo tisular total (0001, 0010, 0111, 0101, 0110, 0100, 1011, 1010, 1001, 1110, 1101)		92	183	275	4.9	5.6	5.3
Variación total en patrón de metilación (TTCV - SV basado en producto digerido de KpnI/MseI)					3.0	3.6	3.4
Sitios conservados (100%- % TTCV)					95.1	94.4	94.7

Fig. 7