



Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

AISLAMIENTO DEL ADNc DEL GEN SERK1 DE  
*Coffea canephora* L.

Tesis que presenta:

DANIEL PÉREZ PASCUAL

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y

Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Febrero del 2013



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



### RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: "AISLAMIENTO DEL ADNc DEL GEN SERK1 DE *Coffea canephora* L.", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, dentro de la Opción Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas de este Centro.

Atentamente,

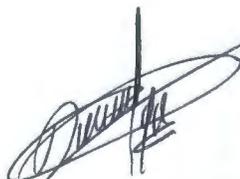
A handwritten signature in black ink, appearing to read "Felipe", is written over a horizontal line.

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota  
Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, Febrero de 2013

## DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones **Materiales y Métodos Experimentales, Resultados y Discusión** de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. En el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



---

I.BQ. Daniel Pérez Pascual

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado "Identificación de procesos celulares modificados por la activación ectópica del dominio de cinasa del receptor SERK durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*", bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, a quien agradezco infinitamente el apoyo que me brindó durante la realización de este trabajo.

Este trabajo forma parte del proyecto "Identificación de procesos celulares modificados por la activación ectópica del dominio de cinasa del receptor SERK durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*", que cuenta con financiamiento del CONACYT, con clave 156029.

Daniel Pérez Pascual tuvo una beca de Maestría del CONACYT (242977).

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de esta Tesis.

Agradezco a:

Al director de Tesis, por guiarme en mis primeros pasos en el camino de la investigación y por ser un apoyo constante en la realización de las actividades aquí desarrolladas.

Al Dr. Gabriel Lizama Uc y en especial al Dr. Víctor M. Loyola Vargas, por sus comentarios enriquecedores, sugerencias y sabios consejos durante la elaboración de este trabajo.

Al grupo del Dr. Víctor M. Loyola Vargas, por todo el apoyo brindado como colaborador de este proyecto, por compartir con nosotros el modelo de embriogénesis somática, así como los reactivos para establecer el sistema. A Geovani y en especial a Benjamín, quienes como parte del grupo del Dr. Loyola, me proporcionaron gran parte del material biológico inicial y por su apoyo en la realización de la embriogénesis somática de café.

Quiero agradecer a la M.C. Elidé Avilés Berzunza por el apoyo brindado en la transformación genética y el procesamiento estadístico de los datos obtenidos (Datos no mostrados en la tesis).

Al M.C. Ramón Souza Perera que desde la residencia profesional me apoyo en la parte de Biología Molecular y sus sugerencias siempre fueron para mejorar, a la Ing. Wilma A. González Kantún por su apoyo técnico.

Al técnico Robert Armando Us Santamaría, por el apoyo técnico.

A todos mis compañeros del Laboratorio 26 por sus comentarios y sugerencias en cada seminario de grupo.

A todos aquellos que de alguna manera han contribuido, gracias.

## **DEDICATORIAS**

*Al creador de todas las cosas por su infinita misericordia.*

*A Doribet por su gran amor, amistad, tiempo, compañía y su apoyo incondicional en todo momento.*

*A mis padres, a mis hermanos y a toda mi gran familia; por su valioso apoyo y porque sé que siempre puedo contar con ellos en todo momento.*

*A Domingo Álvaro Luna, un gran amigo que aunque ya no esté entre nosotros, siempre estuvo ahí en aquellos momentos difíciles, donde quieras que estés amigo, ya ves, sí se pudo.*

**ÍNDICE**

RESUMEN.....

ABSTRACT.....

INTRODUCCIÓN.....1

**CAPÍTULO I**

**ANTECEDENTES**

1.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....3

1.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *COFFEA SPP*.....4

1.3 ADQUISICIÓN DE LA COMPETENCIA EMBRIOGÉNICA.....5

1.4 EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....8

1.5 LA CINASA TIPO RECEPTOR DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA 1 (SERK1).....11

JUSTIFICACIÓN.....14

OBJETIVOS.....16

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....17

BIBLIOGRAFÍA.....18

**CAPÍTULO II**

**AISLAMIENTO DE LOS EXTREMOS 3' Y 5' DEL ADN<sub>c</sub> DE SERK1 DE *COFFEA CANEPHORA L.***

2.1 INTRODUCCIÓN.....29

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....30

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....30

2.2.2 METODOLOGÍA.....30

---

2.2.2.1 AISLAMIENTO DEL ARN TOTAL.....	30
2.2.2.2 SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA Y AMPLIFICACIÓN RÁPIDA DE EXTREMOS DE ADNc 3' Y 5'-RACE.....	32
2.2.2.3 PURIFICACIÓN DE ADN DESDE GELES DE AGAROSA.....	32
2.2.2.4 LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE LA AMPLIFICACIÓN AL PLÁSMIDO VECTOR.....	32
2.2.2.5 TRANSFORMACIÓN DE ESCHERICHIA COLI POR CHOQUE TÉRMICO.....	33
2.2.2.6 PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO.....	34
2.2.2.7 ANÁLISIS DE LAS CLONAS RECOMBINANTES.....	34
2.2.2.8 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	34
2.3 RESULTADOS.....	35
2.3.1 AISLAMIENTO DE LOS EXTREMOS 3' Y 5' DEL ADNc DE SERK1 DE <i>C. CANEPHORA</i> .....	35
2.3.1.1 OBTENCIÓN DEL EXTREMOS 3'.....	35
2.3.1.1.1 SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA ADNc Y AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 3' MEDIANTE LA METODOLOGÍA RACE.....	35
2.3.1.2 OBTENCIÓN DEL EXTREMO 5'.....	37
2.3.1.2.1 SÍNTESIS DE LA PRIMERA CADENA ADNc Y AMPLIFICACIÓN DEL EXTREMO 5' MEDIANTE LA METODOLOGÍA RACE.....	37
2.3.2 ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LAS CLONAS RECOMBINANTES.....	40
2.3.2.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS INSERTOS POR PCR, MEDIANTE CEBADORES M13 Y CEBADORES ESPECÍFICOS.....	40
2.3.3 ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS DE ADNc OBTENIDAS DE LAS CLONAS 3' Y 5'.....	42
2.3.4 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	50
2.4 DISCUSIÓN.....	54

BIBLIOGRAFÍA.....57

**CAPÍTULO III**

**AISLAMIENTO DEL ADNc COMPLETO DE SERK1 DE *COFFEA CANEPHORA* L.**

3.1 INTRODUCCIÓN.....61

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....62

3.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO.....62

3.2.2 METODOLOGÍA.....62

3.2.2.1 AMPLIFICACIÓN POR PCR CON CEBADORES ESPECÍFICOS DEL FRAGMENTO 5' CcSERK1.....63

3.2.2.2 REACCIÓN DE DIGESTIÓN MEDIANTE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....64

3.2.2.3 PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (CON COLUMNAS QUANTUM PREP PCR KLEEN SPIN).....64

3.2.2.4 LIGACIÓN DE LOS FRAGMENTO 3' Y 5'-CcSERK1 CON ADN LIGASA.....65

3.3 RESULTADOS.....66

3.3.1 OBTENCIÓN DEL ADNc COMPLETO CORRESPONDIENTE AL GEN CcSERK1.....66

3.4 CONCLUSIÓN.....72

BIBLIOGRAFÍA.....73

**CAPÍTULO IV**

**CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS**

4.1 CONCLUSIONES GENERALES.....75

4.1 PERSPECTIVAS.....76

ANEXO I.....77

ANEXO II.....85

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1</b> Estrategia Experimental.....	17
<b>Figura 2.1</b> Integridad del ARN total aislado.....	35
<b>Figura 2.2</b> Síntesis de la primera cadena de ADNc y amplificación por PCR del extremo 3' correspondiente al transcrito de SERK1 de <i>C. canephora</i> .....	36
<b>Figura 2.3</b> Verificación de la integridad del ARN total aislado y síntesis de la primera cadena de ADNc para la amplificación del extremo 5'.....	38
<b>Figura 2.4</b> Amplificación por PCR del extremo 5' correspondiente al transcrito de SERK1 de <i>C. canephora</i> .....	39
<b>Figura 2.5</b> Extracción de ADN plasmídico y amplificación por PCR de los insertos de las clonas recombinantes 3'-RACE.....	41
<b>Figura 2.6</b> Aislamiento de ADN plasmídico y amplificación por PCR de los insertos en las clonas recombinantes del extremo 5'.....	42
<b>Figura 2.7</b> Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la clona 3'-CcSERK1.....	43
<b>Figura 2.8</b> Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la clona 5'-CcSERK1.....	44
<b>Figura 2.9</b> Secuencia nucleotídica del completa del ADNc de SERK1 de <i>C. canephora</i> .....	45
<b>Figura 2.10</b> Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos del ADNc de CcSERK1.....	48
<b>Figura 2.11</b> Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1, con secuencias reportadas.....	50
<b>Figura 2.12</b> LRR-RLKs de <i>Arabidopsis thaliana</i> y sus relaciones filogenéticas.....	52
<b>Figura 2.13</b> Análisis filogenético de CcSERK1 y SERKs de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	53

---

<b>Figura 3.1</b> Representación esquemática de la estrategia utilizada para obtener la secuencia completa del ADNc de CcSERK1.....	63
<b>Figura 3.2</b> Amplificación por PCR de un fragmento grande de la clona 5'-CcSERK1.....	67
<b>Figura 3.3</b> Digestión enzimática de los productos de PCR 3'-CcSERK1 y 5'-CcSERK1 con la enzima BamHI.....	68
<b>Figura 3.4</b> Ligación de los fragmentos 3'-CcSERK1 y 5'-CcSERK1 digeridos con BamHI y amplificación por PCR con cebadores específicos a partir de la ligación.....	69
<b>Figura 3.5</b> Corroboración de la clonación del ADNc completo de CcSERK1.....	70

---

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 2.1</b> Resultados del análisis BLAST para la identificación de SERK1 de <i>Coffea canephora</i> .....	46
<b>Cuadro A1</b> Secuencia nucleotídica de los cebadores específicos de CcSERK1 y los cebadores universales provistos en el kit.....	85
<b>Cuadro A2</b> Cebadores específicos de CcSERK1 con sitio de corte para enzimas de restricción.....	85

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico.
<b>ADNc</b>	ADN complementario.
<b>AGP</b>	Arabinogalactoproteína.
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico.
<b>ANA</b>	Ácido naftalenacético.
<b>BA</b>	Benciladenina.
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool.
<b>DIC</b>	Días de cultivo.
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato.
<b>DNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos.
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfóxido.
<b>DTT</b>	1,4-ditiotreitol.
<b>EDTA</b>	Sal disódica del ácido etilén diamino tetra-acético.
<b>ES</b>	Embriogénesis somática.
<b>EtBr</b>	Bromuro de etidio.
<b>GSP</b>	Cebador específico del gen.
<b>GFP</b>	Proteína Verde Fluorescente.
<b>Gus</b>	$\beta$ -glucuronidasa.
<b>G</b>	Gravedades.
<b>IPTG</b>	Isopropil 3-D-tiogalactósido.
<b>Kbp</b>	Kilopares de bases.
<b>KIN</b>	Cinetina.
<b>LB</b>	Medio Luria-Bertani.
<b>LRR</b>	Región con Repeticiones Ricas en Leucina.
<b>LZ</b>	Cierre de Leucina.

---

<b>M</b>	Concentración Molar.
<b>MS</b>	Medio de cultivo de Murashige y Skoog.
<b>NCBI</b>	Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
<b>NUP</b>	Cebador anidado universal.
<b>NGSP</b>	Cebador anidado del gen específico.
<b>Pb</b>	Pares de bases.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa.
<b>RACE</b>	Amplificación rápida de extremos de ADNc.
<b>RLK</b>	Cinasas tipo Receptor.
<b>Rpm</b>	Revoluciones por minuto.
<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa con Transcripción Reversa.
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio.
<b>SERK1</b>	Cinasa tipo Receptor de la embriogénesis somática 1.
<b>SN</b>	Sobrenadante.
<b>SPP</b>	Motivo Serina-Prolina-Prolina.
<b>TA</b>	Temperatura ambiente.
<b>Tm</b>	Temperatura media de fusión.
<b>UPM</b>	Mezcla del cebador universal.
<b>UV</b>	Ultravioleta.
<b>Vol</b>	Volumen.
<b>v/v</b>	Relación volumen/volumen.
<b>X-GAL</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-galactosa.

## RESUMEN

La Embriogénesis Somática (ES) en vegetales es un proceso en el cual se forma una estructura bipolar que asemeja en su estructura y en su desarrollo a un embrión cigótico, sin incluir la fusión de gametos. Un embrión somático normal debe ser capaz de regenerar una planta completa. Debido a que el establecimiento y desarrollo de la ES implica un cambio continuo en los patrones de diferenciación, puede sugerirse que los cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos que ocurren durante la ES son el resultado de alteraciones en la expresión génica.

La utilización de modelos de ES *in vitro*, como zanahoria y *Arabidopsis*, así como el empleo de diversas técnicas moleculares han resultado decisivos para el estudio de los mecanismos moleculares de la ES. Sin embargo, a pesar del gran número de estudios realizados a la fecha, aún se desconocen los mecanismos celulares que regulan el proceso de diferenciación mediante la cual una célula somática se convierte en una célula embriogénica. Por ello, es necesario generar un conocimiento más amplio de los eventos que gobiernan este proceso.

Uno de los genes candidatos para regular el establecimiento de la ES, que se expresa en la embriogénesis temprana, y que hasta ahora se ha demostrado que puede desempeñar un papel en la adquisición de la competencia embriogénica en células vegetales, es el gen que codifica a la cinasa tipo receptor de la embriogénesis somática 1 (SERK1), nombrado así por la similitud de su secuencia con la familia de cinasas tipo receptor de plantas.

No obstante, SERK1 es en la actualidad es un receptor "huérfano" pues aún se desconoce su ligando, por lo que es de gran interés determinar qué señal percibe directamente o indirectamente el receptor SERK, así como los mecanismos de transducción de señales disparados tras la activación de SERK1.

Como antecedentes directos de este trabajo, en nuestro laboratorio se clonó un fragmento de 776 pb del ADNc de SERK1 y se analizó su expresión a lo largo de la ES, encontrando que se expresa durante etapas tempranas de la ES, sugiriendo que podría estar involucrado en el disparo del proceso.

---

Con base en estos antecedentes, los objetivos del presente trabajo consistieron en aislar el ADNc completo correspondiente al transcrito de CcSERK1 y establecer un protocolo de transformación que permita sobre-expresarlo en explantes foliares de *Coffea canephora* que serán sometidos al proceso de ES.

La estrategia para la clonación del ADNc completo de CcSERK1 consistió en aislar los extremos 3' y 5' no traducibles mediante la metodología de RACE, empleando cebadores específicos diseñados a partir de la secuencia parcial. Como resultado, se logró aislar el ADNc completo del gen CcSERK1, el cual tiene un tamaño de 2,548 pb, incluyendo las regiones 3' y 5' no traducibles (UTR). La secuencia deducida de aminoácidos codifica una proteína con un tamaño de 360 aminoácidos y presenta todos los dominios característicos de las proteínas SERK1 reportadas.

---

**ABSTRACT**

Plant somatic embryogenesis (SE) is a process in which a bipolar structure with similar development stages of those in zygotic embryogenesis is generated, but excluding the fusion of gametes. A normal somatic embryo must be able to regenerate a whole plant. Because the establishment and development of ES implies a continuous change in the developmental processes, it may be suggested that the morphological, physiological and biochemical changes occurring during the ES are the result of altered gene expression.

The use of *in vitro* models of SE, such as carrot and Arabidopsis, and the use of different molecular techniques have been crucial for studying the molecular mechanisms of the SE. However, despite the large number of studies reported to date, the cellular mechanisms that regulate the differentiation steps by which a somatic cell becomes an embryogenic cell are still unknown. Therefore, it is necessary to generate a bigger knowledge of the events that govern this process.

One of the candidate genes to regulate the establishment of the ES, which is expressed in early embryogenesis, and so far has been suggested to play a role in the acquisition of competence when overexpressed in embryogenic plant cells, is the gene encoding the Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase 1 (SERK1), named after its sequence similarity with members of the plant receptor-like kinases (RLK).

Nevertheless, SERK1 is an "orphan" receptor at present because its ligand is still unknown; thus, it is of great interest to determine which signal is perceived directly or indirectly by the SERK1 receptor, and also which signal transduction pathways are triggered by the activation of SERK1.

As direct antecedents of this work, a 776 bp fragment of the SERK1 cDNA was cloned and its expression was analyzed throughout the ES, finding that it is expressed during early stages of ES, suggesting it might be involved in the triggering of the SE.

---

## ABSTRACT

---

Based on these findings, the objectives of this work were to isolate the complete cDNA sequence corresponding to the CcSERK1 transcript, and to establish a suitable transformation protocol for its over-expression in leaves of *Coffea canephora*, which are used as explants to initiate the ES.

The experimental strategy to clone the cDNA of CcSERK1 consisted in isolating the 3' and 5' extremes by the RACE technique, using specific primers designed from the partial sequence. As a result, the complete cDNA sequence of CcSERK1 was isolated, having a size of 2,548 bp, including the 3' and 5' untranslatable regions (UTR). The deduced amino acid sequence encodes a protein with a size of 360 amino acids and presents all domains characteristic of reported SERK1 proteins.

---

### INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática (ES) se define como el proceso mediante el cual se forma un embrión viable a partir de una o varias células somáticas, sin incluir la fusión de gametos (Zimmerman, 1993); el embrión puede germinar y producir una planta genéticamente idéntica a su progenitora. Los embriones somáticos se desarrollan al pasar por fases (globular, corazón torpeda y cotiledonar en células provenientes de plantas dicotiledóneas) idénticas a las del embrión cigótico (Ammirato, 1983).

El desarrollo de la ES presenta semejanzas con el de la embriogénesis cigótica (EC) (Mordhorst, *et al.*, 1997; Zimmerman, 1993), probablemente debido a la conservación en los mecanismos celulares y moleculares entre los dos procesos. Por otra parte, la ES proporciona un modelo atractivo de estudio que puede ofrecer información valiosa para elucidar la regulación de la EC. Además, la ES puede constituir una valiosa metodología para la generación de nuevas variedades o híbridos de plantas de importancia agrícola.

Desafortunadamente, al igual que para la EC, los mecanismos celulares que regulan el inicio y el establecimiento exitoso de la ES aún se desconocen; fundamentalmente, se desconoce la naturaleza de la(s) señal(es) extracelular(es) que dispara(n) el proceso de diferenciación en las células somáticas, así como las vías de transducción de señales que, al ser activadas en las células competentes, conducen a la activación de la expresión génica en el núcleo.

Durante la ES ocurren cambios bioquímicos y morfológicos en los tejidos sometidos al proceso de diferenciación (Sharp *et al.*, 1980), que están fuertemente relacionados con alteraciones en los patrones de expresión génica (Zimmerman, 1993). Por lo tanto, algunos genes se expresan de manera diferente durante la inducción de la ES, mientras que otros se expresan durante la diferenciación de embriones maduros hasta el desarrollo de la planta completa (Zimmerman, 1993).

Uno de los genes expresados durante la inducción de la ES, es la cinasa tipo Receptor de la Embriogénesis Somática (*SERK*).

En suspensiones celulares de zanahoria, transformadas con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de *SERK*, el gen reportero se expresa a lo largo del proceso embriogénico hasta la formación de estructuras globulares; sin embargo, su función sigue siendo confusa (Schmidt *et al.*, 1997).

El gen *SERK*, que codifica una proteína perteneciente a la familia de las cinasas tipo receptor (receptor-Like kinases, RLK), es considerado actualmente como el mejor marcador molecular de "competencia" embriogénica.

Debido a que *SERK* es uno de los genes candidato que participa en la regulación de la transición embriogénica, la búsqueda de su ligando, de sus sustratos celulares y de los genes que se expresan diferencialmente tras su activación son temas de investigación actual de gran importancia. Con base en lo anteriormente expuesto, en el presente proyecto se aisló el ADNc del gen *CcSERK1* en explantes foliares de *C. canephora* sometidos al proceso de ES (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006), un modelo experimental en el que se propone que este receptor desarrolla su función biológica (Villanueva-Alonzo *et al.*, en proceso).

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 Embriogénesis somática

La ES es el proceso mediante el cual las células somáticas se diferencian para producir un embrión completo. En la ES, cuyo origen puede ser unicelular (Schmidt *et al.*, 1997) o multicelular (Taylor y Vasil 1996), las estructuras embriogénicas logran la bipolaridad desde etapas tempranas como sucede en la embriogénesis cigótica, pero sin la fusión de gametos (Sharp *et al.*, 1980; Williams y Maheswaran, 1986). La ES fue descrita por primera vez en cultivos de suspensiones celulares de zanahoria (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958; Krikorian y Simola, 1999) cuando se observó el desarrollo de estructuras embriogénicas *in vitro*.

La ES puede obtenerse, de manera general, por medio de dos estrategias, dependiendo del estado de diferenciación del tejido de partida (Williams y Maheswaran, 1986): una vía es de forma directa, la cual implica una baja desorganización del explante antes de formar los embriones somáticos y es inducida en parte por una herida; la otra vía es la indirecta, la cual implica el paso por un estadio de proliferación celular intermedio sin organizar (callo) antes de formar el embrión somático (Sharp *et al.*, 1980).

Para su estudio, el proceso de ES puede dividirse en dos fases: inducción y expresión. En la primera fase ocurre un fenómeno de polaridad celular (Dijak *et al.*, 1990) y se presenta una primera división celular asimétrica (Komamine *et al.*, 1990); una de las dos células somáticas diferenciadas, que es pequeña, isodiamétrica, con núcleo y nucléolo grandes y con un citoplasma denso, adquiere la competencia embriogénica y puede proliferar como célula embriogénica, mientras que la otra célula, que es grande y vacuolizada, fenecerá (Halperin y Jansen, 1967).

En la segunda fase, las células embriogénicas desarrollan la competencia embriogénica y establecen el programa de diferenciación para el desarrollo del embrión somático, con todas las etapas anatómicas características de la embriogénesis cigótica (Jiménez, 2001).

Finalmente, al completar la última etapa del proceso de maduración, en los embriones somáticos se establece el proceso de "conversión" (proceso equivalente a la germinación de los embriones cigóticos en las semillas), para dar lugar a los procesos de desarrollo de la planta adulta (Dodeman *et al.*, 1997).

Se sabe que hay varios factores que influyen en la inducción de la ES, dentro de los cuales se pueden mencionar: el tipo de explante, el medio de cultivo, las condiciones de cultivo, la adición de reguladores de crecimiento, el genotipo, entre otras.

Debido a que los estadios de desarrollo de los embriones somáticos (globular, acorazonado y cotiledonario) tienen patrones fisiológicos similares a los estadios cigóticos (Zimmerman, 1993), es muy probable que en los ámbitos molecular y bioquímico ocurran eventos similares.

Desafortunadamente los mecanismos celulares que regulan el inicio y el establecimiento exitoso de la ES son aún desconocidos; fundamentalmente, se desconoce la naturaleza de la (s) señal (es) extracelular (es) que dispara (n) el proceso de diferenciación en las células somáticas, así como las vías de transducción de señales que al ser activadas en las células competentes conducen a la activación de la expresión génica en el núcleo.

## **1.2 Embriogénesis somática en *Coffea ssp.***

Se han reportado varios sistemas de producción de embriones somáticos en *Coffea ssp.* Staritsky (1970) fue el primero en reportar el desarrollo de embriones somáticos en *Coffea canephora* a partir de tallos ortotrópicos, mientras que Herman y Haas (1975) obtuvieron ES en *C. arabica* a partir de cultivos de callos derivados de explantes de hojas.

Posteriormente, Söndahl y Sharp (1977) describieron un procedimiento para obtener callos con alta frecuencia embriogénica a partir de explantes foliares de *C. arabica*. Söndahl *et al.*, (1979) demostraron que los embriones somáticos en café se originan de las células del mesófilo.

---

Posteriormente, se han realizado diversos trabajos acerca de la inducción de embriones somáticos en cafeto (Dublín, 1981; Pierson, 1983; Yasuda, 1985; García y Menéndez, 1987; Hatanaka *et al.*, 1991; Neuenschwander y Baumann, 1992; Bieysse *et al.*, 1993; Menéndez y Nieto, 1994; Menéndez y García, 1997).

Quiroz Figueroa *et al.*, (2002) reportaron un estudio histológico sobre el desarrollo de la ES, tanto directa como indirecta, en *C. arabica*, en el cual a la primera semana se pudo caracterizar una célula relativamente isodiamétrica con un prominente núcleo, un citoplasma denso, una gruesa pared celular y con signos de polaridad, lo cual les permitió concluir que el origen de la ES en *C. arabica* es unicelular.

### 1.3 Adquisición de la competencia embriogénica

A pesar de que el proceso de ES fue descrito hace más de 50 años (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958, Krikorian y Simola, 1999), aún se desconoce la identidad de la(s) "señal(es)" que dispara(n) la diferenciación celular en las células somáticas para iniciar el proceso embriogénico (Vogel, 2005). Se sabe que hay varios factores que influyen en la inducción de la ES, como son la adición de reguladores del crecimiento, el tipo de explante y el estadio de desarrollo de la planta, requerimientos nutricionales y el genotipo (Ammirato, 1983; Rose *et al.*, 1999). La relación entre los diferentes tipos de extremos ambientales y la ES aún no se entiende. Las evidencias que muestran que las condiciones de cultivo de tejido *in vitro* expone a los explantes a importantes tensiones y diferentes tipos de estrés, ya que son aislados de su medio ambiente original al ser colocados en un medio sintético conteniendo concentraciones no fisiológicas de reguladores de crecimiento, sales y los componentes orgánicos, pueden inducir a las células somáticas a convertirse en células embriogénicas. El incremento en la expresión de diversos genes relacionados con el estrés, confirma la hipótesis de que la ES es un proceso de adaptación a un nuevo entorno (Feher *et al.*, 2003).

Las auxinas y citocininas (solas o combinadas) son los principales reguladores del crecimiento involucradas en la regulación de la división y diferenciación celular. Las influencias de las auxinas aplicadas exógenamente, preferentemente el 2,4-D, en la inducción de la ES están bien documentados (Dudits *et al.*, 1991; Yeung, 1995).

Sin embargo, el desarrollo de embriones somáticos en los tejidos también se ha reportado en ausencia de reguladores del crecimiento (Choi *et al.*, 1998), así como en la presencia de reguladores del crecimiento tales como citocininas (Sagare *et al.*, 2000) o ácido abscísico (Nishiwaki *et al.*, 2000). Aunque las auxinas son necesarias para la transición hacia un estado embrionógico, también actúan inhibiendo el desarrollo ulterior del embrión después del estadio globular (Komamine *et al.*, 1990).

Durante los últimos años, se han acumulado una gran cantidad de observaciones experimentales en los papeles centrales que juegan el ácido indolacético (IAA) endógeno y los niveles de ácido abscísico (ABA) durante las primeras fases de la embriogénesis.

Una concentración endógena alta de IAA ha demostrado estar asociada con el aumento de la respuesta embrionógica en varias especies/explantos (Rajasekaran *et al.*, 1987; Ivanova *et al.*, 1994; Michalczuk y Druart, 1999; Jiménez y Bangerth, 2001a, b, c). Por otro lado, se han utilizado otros inductores para promover la transición somático-embriónica: por ejemplo, la concentración de sacarosa o la presión osmótica, metales pesados (Kiyosue *et al.*, 1990; Pasternak *et al.*, 2002; Kamada *et al.*, 1993.) y temperaturas elevadas (Kamada *et al.*, 1989). La activación simultánea de las respuestas de auxinas y el estrés puede ser un evento clave en la adaptación celular, causando cambios genéticos, metabólicos y fisiológicos, en una reprogramación que se traduce en la competencia embrionógica de las células vegetales somáticas.

Existen evidencias que señalan que la adquisición de un estadio embrionógico no es un proceso celular autónomo, sino que requiere la comunicación entre células (Mordhorst *et al.*, 1997) y de moléculas señalizadoras solubles para el inicio del proceso (Matthys-Rochon, 2005). Por ejemplo, se ha observado que un medio condicionado proveniente de un cultivo altamente embrionógico puede inducir la ES cuando es adicionado a cultivos no embrionógicos (De Jong *et al.*, 1992). Por otro lado, hay resultados que indican que sustancias secretadas al medio de cultivo son esenciales para establecer y mantener la competencia embrionógica. Las arabinogalactoproteínas (AGPs) juegan un papel importante en la ES (Kreuger y Holst van, 1993; Kreuger y Holst van, 1995; Vroemen *et al.*, 1999); por ejemplo, se determinó que líneas celulares no embrionógicas de zanahoria pueden convertirse en embrionógicas después de la adición de ciertas AGPs (Kreuger y Holst van, 1993).

Varios anticuerpos se han diseñado contra ciertos epítopes AGPs presentes en cultivos embriogénicos y para marcar células específicas (Knox, 1997; Showalter, 2001). Por ejemplo en las células embriogénicas de maíz, se ha demostrado que la superficie de la matriz contiene AGPs y JIM4, que no están presentes en la superficie de las células no embriogénicas (Samaj *et al.*, 1999). Otro epítipo AGP reconocido por el anticuerpo fue JIM8, descrito originalmente como un marcador de la etapa temprana de la transición de células cultivadas de zanahoria después de la inducción embriogénica (Pennell *et al.*, 1992).

Finalmente, se demostró que la mayoría de los embriones que se desarrollaban carecían de JIM8 (Toonen *et al.*, 1996) y que la fracción AGP que contenía el epítipo en realidad tenía un efecto inhibitorio sobre la ES en zanahoria (Toonen *et al.*, 1997b). Lo que sugirió que células marcadas con JIM8 realizan una función accesoria en la ES.

En zanahoria, el gen EP3 que codifica una endoquitinasa (una glucoproteína de 32 kDa con actividad de quitinasa ácida) se expresa en cultivo embriogénicos, pero su expresión no está correlacionada con las células embriogénicas y está ausente en embriones somáticos (Van Hengel *et al.*, 1998). La EP3 es secretada en el medio de cultivo y la adición de EP3, purificada de suspensiones celulares de una mutante embriogénica de zanahoria sensible a la temperatura y cultivada a 24 °C (la mutante *ts11*), al cultivo de la mutante cultivada a 32 °C recupera el desarrollo del proceso embriogénico. Por lo tanto, la expresión de EP3 en las células no embriogénicas y su importancia para la ES volvió a traer a la mesa de discusión que la comunicación célula-célula es esencial para la ES (De Jong *et al.*, 1992; De Jong *et al.*, 1995).

En *C. arabica*, Rojas-Herrera *et al.*, (2002) observaron la expresión de una quitinasa clase III, la cual pudiera tener un papel importante en el establecimiento de la ES. En el caso de *C. canephora* var. Robusta se ha reportado la presencia de EP3 y EP32 a partir del momento en que se expresaron en los agregados celulares embriogénicos (Rodríguez *et al.*, 2000), la detección disminuyó cualitativamente en los estadios correspondientes a la fase de torpedo del desarrollo embrionario. La presencia de estas dos proteínas durante casi todo el desarrollo del proceso embriogénico condiciona, al parecer, el medio desde sus etapas iniciales, para el posterior progreso de la ES. Resultados similares han sido informados en cultivos celulares de *Saccharum* sp. (Blanco *et al.*, 1997).

En cultivos embriogénicos de *Cichorium*, se identificaron diversas proteínas secretadas al medio, como quitinasas, glucanasas y una proteína similar a osmotina, acumuladas en niveles significativamente más altos en cultivos embriogénicos en comparación a los no embriogénicos (Helleboid *et al.*, 2000). Del mismo modo, en cultivos embriogénicos de alfalfa, se ha encontrado alteraciones en los niveles de proteínas extracelulares homólogas a endoquitinasas de zanahoria, después de la eliminación del 2,4-D del medio de cultivo (Poulsen *et al.*, 1996).

La búsqueda de genes que marquen las células somáticas que posean la competencia para convertirse en células embriogénicas llevó al descubrimiento del gen que codifica a la cinasa tipo receptor de la ES (*SERK*). *SERK* se expresa transitoriamente en una subpoblación de células grandes y vacuoladas en un cultivo embriogénico derivado de un cultivo de explantes de hipocótilo de zanahoria (Schmidt *et al.*, 1997). *SERK* marca células individuales de tejido de hipocótilo provascular, sólo después de la exposición prolongada al 2,4-D (Schmidt *et al.*, 1997), con un tiempo de exposición al regulador de crecimiento similar al reportado por Guzzo *et al.*, (1994) para generar células embriogénicas (Schmidt *et al.*, 1997). Experimentos de monitoreo celular mostraron que *SERK* se expresa sólo en las células que podrían iniciar la ES. *SERK* se expresa en las células con morfología diferente, pero sólo las de tipo grande y vacuolado formaron embriones somáticos. Debido a que la expresión de *SERK* ha sido asociada con el establecimiento de la ES (Hecht *et al.*, 2001; Nolan *et al.*, 2009), es muy probable que su activación tenga un papel determinante en el disparo del proceso de diferenciación, por lo que en la actualidad, la identificación del ligando del receptor *SERK* es uno de los temas de investigación de mayor interés en la biología.

#### **1.4 Expresión génica durante de la embriogénesis somática**

El cambio de las células somáticas hacia la vía embriogénica implica la expresión génica diferencial que confiere a las células somáticas la capacidad de manifestar el potencial embriogénico.

Por lo tanto, la ES involucra una gran cantidad de eventos moleculares que abarca no sólo la expresión diferencial de genes, sino diferentes vías de transducción de señales, las cuales pueden activar o reprimir numerosos conjuntos de genes, muchos de los cuales aún no han sido identificados y caracterizados.

El desarrollo de técnicas moleculares ha sido crucial en la identificación de genes que exhiben actividad diferencial, por ejemplo, la construcción de bibliotecas de ADNc, el análisis por despliegue diferencial, los análisis por sondas substractivas, PCR y sus modificaciones, etc., han sido empleadas para identificar y caracterizar genes estructurales y funcionales como genes de respuesta a reguladores de crecimiento, los genes homeóticos, los genes LEA, los genes que codifican quitinasas, cinasas que regulan la ES y muchos otros (Chugh y Khurana, 2002).

El uso de mutantes es un enfoque muy poderoso para identificar y aislar genes y elucidar sus funciones biológicas (Lotan *et al.*, 1998). Sin embargo, estudios realizados en mutante sólo puede explicar el papel de un gen involucrado en un evento durante todo el proceso de embriogénesis. Este estudio ha aumentado en gran medida nuestra comprensión de la actividad funcional de numerosos genes, que no podrían ser investigados por otras técnicas.

Debido que los primeros estadios de desarrollo de los embriones somáticos tienen patrones fisiológicos similares a los estadios cigóticos, es muy probable que en los ámbitos molecular y bioquímico ocurran los mismos eventos. Por lo que los genes expresados en la embriogénesis cigótica podrían estar relacionados en el establecimiento de la ES.

Los genes expresados durante la embriogénesis cigótica pueden clasificarse en cinco clases (Dure III 1985; Goldberg *et al.*, 1989):

Clase 1. Genes expresados constitutivamente, expresados en todas las etapas y tienen funciones de mantenimiento requeridas durante el desarrollo normal vegetativo de diferentes tipos celulares.

Clase 2. Genes específicos de la embriogénesis, expresados exclusivamente en los embriones, hasta antes de la germinación.

---

Clase 3. Genes altamente expresados en etapas tempranas de la embriogénesis, hasta la etapa cotiledonar.

Clase 4. Genes que codifican proteínas de la semilla, expresados durante la expansión de los cotiledones y la maduración de la semilla.

Clase 5. Genes expresados abundantemente en las etapas tardías de la embriogénesis, su expresión es activada por el ABA.

Sin duda, la mayor atención se centra en la identificación y estudio de los genes relacionados con las clases dos y tres de la embriogénesis cigótica, por tener mayores posibilidades de éxito en la identificación de los genes responsables del establecimiento de la ES.

Adicionalmente, en la búsqueda de los “genes responsables” del establecimiento de la ES se han implementado diversas metodologías enfocadas a la detección de la expresión diferencial; sin embargo, la mayoría de los genes identificados de esta manera poseen funciones diversas, que no son exclusivas de la embriogénesis (Ikeda M *et al.*, 2006).

La identificación de los genes expresados diferencialmente durante la ES, permite agruparlos de acuerdo con su función (Chugh y Khurana, 2002):

- ❖ Responsivos a reguladores del crecimiento: DcArg-1, homólogos de pJCW1, pJCW2, DcECP63, Em, DcECP40, DcECP31;
- ❖ De mantenimiento: Top I, EF-1a, CEM6, H3-1, CGS102, CGS103, CGS201;
- ❖ Transducción de señales: SERKs, swCDKs, CRKs, MsCPK3;
- ❖ Homeóticos: Sbh1, CHB1-CHB6, DcDB1;
- ❖ De proteínas extracelulares: EP3-1, EP3-2, PgChi-1, PgGlu-1, EP2, DcAGP1;
- ❖ De maduración: Mat1, Dc2.15, Dc3, Dc8, DcEMB1, Em, DcECP31, DcECP40, MsLEC1, MsLEC2
- ❖ Hsps y germinas: Mshsp18, Dchsp1, PcGER1;
- ❖ Mutantes cigóticas: clv, lec, pkl, pt, stm, wus, zll/pnh.

Aunque los genes homeóticos confieren un desarrollo embriogénico cuando son expresados ectópicamente en tejidos somáticos (Arroyo-Herrera *et al.*, 2008; Boutilier *et al.*, 2002; Lotan T *et al.*, 1998), el hecho de que tengan funciones en estadios posteriores del desarrollo implica que sus funciones no son específicas de las etapas tempranas, decisivas para la diferenciación (Ikeda *et al.*, 2006). Al respecto, es cada vez más claro que SERK es el único gen que por sus características biológicas (receptor celular con actividad de cinasa intracelular), sus niveles de expresión (se expresa en células con competencia embriogénica y solamente en estadios tempranos de la ES, hasta el estadio preglobular) y la capacidad de su proteína codificada para conferir competencia embriogénica a los cultivos, posee el potencial para ser considerado como responsable del disparo de la ES (Hecht *et al.*, 2001).

### 1.5 La cinasa tipo receptor de la Embriogénesis Somática 1 (SERK1)

Entre los genes implicados en el proceso de inducción de la ES, el gen *SERK1* se considera uno de los mejores marcadores moleculares relacionados con este proceso. El primer reporte sobre el gen SERK provino de un estudio en *Daucus carota* (Schmidt *et al.*, 1997), en el que se reportó que únicamente aquellas células de explantes de hipocótulo que expresaban SERK1 podían desprenderse del tejido y dar lugar a un embrión somático. Además, suspensiones celulares transformadas con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de SERK, expresaban el gen reportero a lo largo del proceso embriogénico hasta la formación de estructuras globulares (Schmidt *et al.*, 1997).

La proteína codificada por SERK posee un dominio amino terminal con cinco regiones de aminoácidos ricos en leucina (LRRs), que actúa como una región de unión a proteínas. Un dominio intracelular y el motivo LRR posee sitios potenciales de *N*-glucosilación. Una característica única de la proteína SERK es que presenta una región rica en prolina entre el dominio extracelular LRR y la región transmembranal, lo cual es una característica conservada de las proteínas de la pared celular vegetal conocidas como extensinas (Schmidt *et al.*, 1997). Aunque presenta un dominio transmembranal, no muestra ningún rasgo característico de péptido señal.

El dominio intracelular de SERK contiene once subdominios característicos del sitio catalítico de las proteínas cinasas de serina/treonina y la segunda parte del extremo carboxilo terminal puede estar mediando la interacción proteína-proteína, un prerequisite para la transmisión de una cascada de fosforilación intracelular (Schmidt *et al.*, 1997).

La proteína SERK, como otros receptores RLK, posee actividad catalítica de autofosforilación (Shah *et al.*, 2001). La secuencia LRR de SERK presenta homología con *RLK5* y genes *ERECTA* de *Arabidopsis* (Walker, 1994; Torii *et al.*, 1996).

El gen *SERK* ha sido vinculado a la ES en un gran número de especies, incluyendo *Dactylis glomerata* (Somleva *et al.*, 2000), *Arabidopsis thaliana* (Hecht *et al.*, 2001), *Medicago truncatula* (Nolan *et al.*, 2003), girasol (*Helianthus annuus*) (Thomas *et al.*, 2004), *Ocotea catharinensis* (Santa Catarina *et al.*, 2004), *Citrus unshiu* (Shimada *et al.*, 2005), *Theobroma cacao* (De Oliveira Santos *et al.*, 2005) entre otros.

El gen *SERK* también se ha descrito en relación con la apomixis en *Hieracium* (Tucker *et al.*, 2003) y *Poa pratensis* (Albertini *et al.*, 2005), así como en la embriogénesis cigótica en zanahoria, *Arabidopsis*, y trigo (*Triticum aestivum*) (Schmidt *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 2001; Singla *et al.*, 2008).

La identificación de *SERK* en *Dactylis glomerata* (Somleva *et al.*, 2000) indica que *SERK* también funciona en plantas monocotiledóneas. En *A. thaliana*, se encontró que *AtSERK1* se expresa normalmente en óvulos y durante el inicio de las embriogénesis cigótica y somática. Se han identificado cinco miembros de la familia *SERK* en su genoma (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3*, *AtSERK4* y *AtSERK5*). Varios estudios indican que *AtSERK1* es capaz de formar homodímeros y también heterodímeros con otros RLKs. La heterodimerización de *AtSERK1* con *AtSERK2*, con *AtSERK3* y con *BRI1* (*BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1*), que media la transducción de señales de brasinoesteroides (BR) (Karlova *et al.*, 2006). Por otro lado, Hecht *et al.*, (2001) encontraron que la sobre-expresión de *AtSERK1* aumenta de 3 a 4 veces el potencial embriogénico en *A. thaliana*, lo cual indica que *AtSERK1* no sólo marca la competencia embriogénica, sino que también promueve la transición de las células somáticas a un estadio embriogénico (Hecht *et al.*, 2001), este resultado refuerza la hipótesis de que *AtSERK1* funciona como un promotor de la competencia embriogénica.

---

Por otro lado, en estudios realizados con *Medicago truncatula* se ha encontrado que la expresión de *MtSERK* es inducida por el ácido naftalénacético (ANA, una auxina), mientras que la citocinina benciladenina (BA) no tiene efecto alguno sobre su expresión; sin embargo, cuando se emplearon simultáneamente el ANA y la BA se observó un efecto de sinergia en la expresión de *MtSERK*, aumentando al doble la expresión de *SERK* en comparación de cuando sólo se empleó ANA. A través de este trabajo se pudo determinar que existe una correlación entre la expresión de *MtSERK* y la ES, y se sugirió que *MtSERK* puede jugar un papel en la morfoogénesis, ya que la formación de raíz de *M. truncatula* es regulada por auxinas (Nolan *et al.*, 2003).

Por otro lado en girasol, se pudo observar la expresión de *SERK* en las primeras horas de inducción de la ES así como en la organogénesis, indistintamente. En maíz, los patrones de expresión de *SERK* son diferentes a los de *DcSERK*; se expresa sólo en el callo embriogénico y se han identificado tres copias de este gen en este modelo. Se determinó que *ZmSERK1* y *ZmSERK2* se expresaron tanto en callo embriogénico como en el no embriogénico, (Baudino *et al.*, 2001).

Estos estudios sugieren que *SERK* constituye una familia de genes con funciones conservadas en las plantas, con un papel específico en la embriogénesis y posiblemente en otros procesos (Hu *et al.*, 2005). Al parecer, las posibles funciones de *SERK* no se limitan al proceso embriogénico; por ejemplo en *Oryza sativa* se demostró que *OsSERK1* y *OsBISERK1*, además de intervenir en la regulación de la ES, pueden mediar parcialmente la traducción de señales en la defensa contra patógenos (Hu *et al.*, 2005; Song *et al.* 2008). En *Lactuca sativa* transgénica se demostró que la supresión endógena de la expresión de *LsSERK* aumenta la susceptibilidad en contra del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Santos *et al.*, 2008).

Recientemente, en la ES de *Coffea canephora* inducido por citocininas (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006), Villanueva-Alonzo, (2006) determinó que el gen que codifica a la cinasa *SERK* se expresa entre los cinco y los diez días después de la adición de citocininas, por lo que se sugirió que la transición embriogénica debe ocurrir alrededor de los 5 días en el cultivo.

## JUSTIFICACIÓN

A la fecha se desconocen los procesos regulatorios que conducen al establecimiento de la ES en vegetales. La utilización de modelos de ES in vitro ha resultado decisiva para el estudio de los eventos metabólicos que se desencadenan en las células competentes después del disparo del proceso embriogénico. No obstante, con ninguno de los modelos de estudio empleados se ha podido identificar las rutas de señalización que conducen a la expresión génica diferencial. Sin embargo, los modelos vegetales que podrían aportar mejores oportunidades experimentales para identificar los procesos regulatorios, como zanahoria y *Arabidopsis*, han sido limitados (Raghavan, 2006).

En zanahoria existe el problema del traslape de los genes que son expresados durante el desarrollo de células somáticas con el de los genes que se expresan durante la transición embriogénica, dificultando la identificación de los genes regulatorios. Por ello, a pesar de que fue uno de los primeros modelos de ES descubierto y que la producción de embriones somáticos es muy elevada, el modelo de ES de zanahoria ha aportado datos relevantes sobre la regulación de la transición embriogénica, pero no han sido suficientes.

En *Arabidopsis* se conoce la secuencia del genoma completo y se han identificado genes que promueven un desarrollo tipo embriogénico cuando son expresados ectópicamente en tejidos somáticos; sin embargo, aún con los modelos de ES desarrollados (que son solo aceptablemente eficientes), los resultados de experimentos basados en el cultivo de tejidos han demostrado que las células proembriogénicas son también las precursoras de tejidos foliares (Meinke, 1992), lo que evidentemente genera un problema para separar los genes responsables del establecimiento de la ES de los genes responsables de la biogénesis foliar.

Por otro lado y dado que en muchas especies vegetales el gen SERK marca a las células vegetales que adquieren la competencia embriogénica, es de gran interés determinar qué señal percibe directamente o indirectamente el receptor SERK y cuál es el mecanismo de transducción de señales mediada por SERK.

En nuestro modelo de estudio se está interesado en la identificación de eventos bioquímicos y moleculares inducidos por la activación ectópica del dominio de cinasa del receptor SERK1 de *Coffea canephora* y analizar su relación con el establecimiento de la embriogénesis somática.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se empleó como modelo de estudio cultivos de *Coffea canephora*, con un protocolo de ES directa extremadamente eficiente, generado en el laboratorio del Dr. Víctor M. Loyola. La ES se consigue adicionando citocininas a explantes foliares previamente "condicionados" (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). En este modelo de ES se ha aislado una secuencia parcial de 776 pb, además se ha podido determinar que el gen que codifica al receptor SERK se expresa entre los cinco y los diez días después de la adición de citocininas y se mantiene en un nivel constante hasta los 25 días, de igual manera se observó que los primeros estadios (embriones globulares) empiezan a parecer entre los 25 y 30 DIC, siendo un proceso asincrónico (Villanueva-Alonzo, 2006). Estos resultados parecen indicar que las células con potencial embriogénico deberían diferenciarse antes de estos períodos (alrededor de los 5 días), para posteriormente desarrollarse y generar embriones.

En este trabajo la estrategia experimental consistió en aislar la secuencia completa del gen SERK incluyendo las regiones no traducibles.

## OBJETIVOS

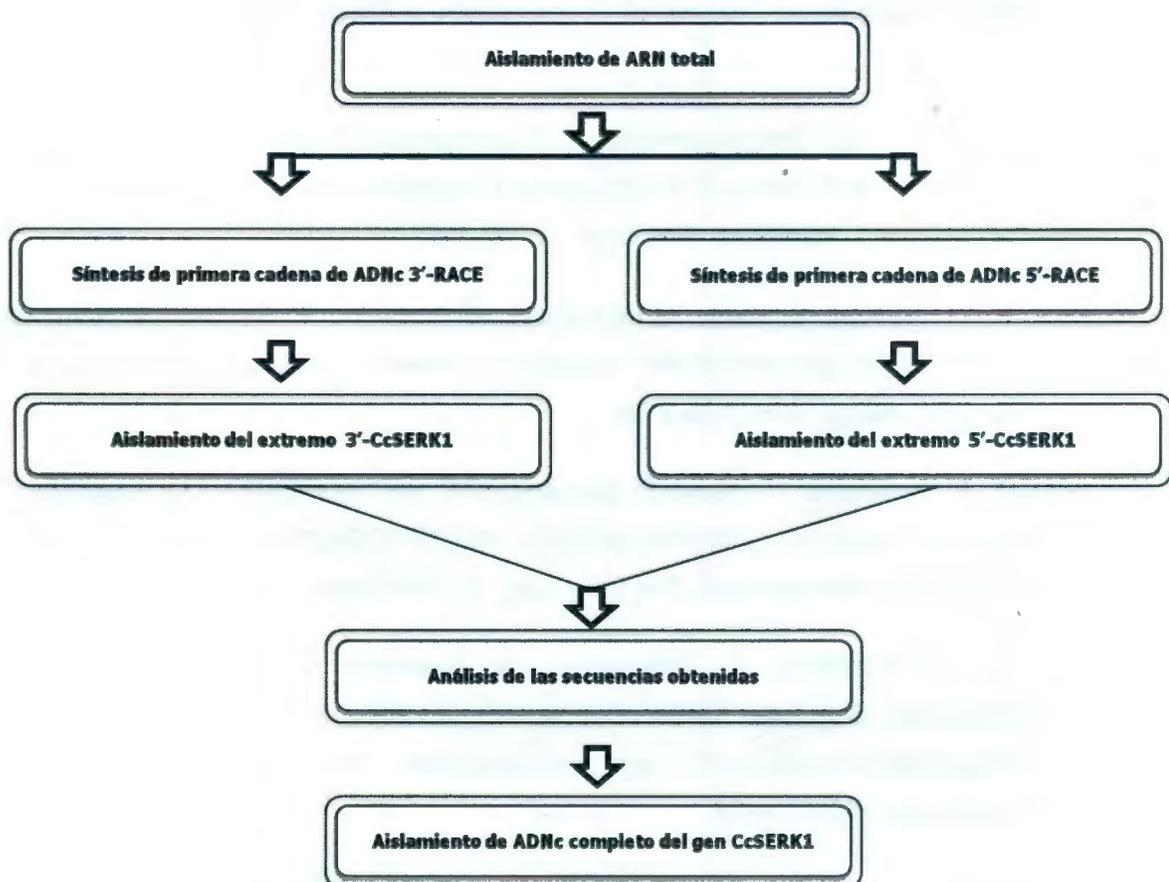
### Objetivo general

Aislar el ADNc correspondiente al gen *SERK1* de *Coffea canephora* a partir de ARN total aislado de explantes foliares sometidos al proceso de embriogénesis somática.

### Objetivos específicos

- ❖ Aislar el ARN total de explantes foliares de café sometidos al proceso de embriogénesis somática.
- ❖ Sintetizar la primera cadena de ADNc para la amplificación de los extremos 3' y 5' correspondientes al gen *CcSERK1*.
- ❖ Aislar los extremos 3' y 5' del ADNc correspondiente al gen *CcSERK1* mediante la técnica de amplificación rápida de extremos de ADNc.
- ❖ Integrar el ADNc completo correspondiente al gen *CcSERK1* a un vector de clonación.

## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



**Figura 1.1** Estrategia Experimental para aislar el ADNc correspondiente al gen SERK1 de *Coffea canephora* L.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Abdelnour, A. y J. V. Escalant (1994). Conceptos Básicos de Cultivo de Tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) Turrialba, C.R. 38 p.
- Ammirato, P. V. (1983). Embryogenesis, In: Techniques in Propagation and Breeding, D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato, Y. Yamada, eds. Handbook of Plant Cell Culture, Vol 1. MacMillan, New York. pp. 82-123.
- Albertini, E., G. Marconi, L. Reale, G. Barcaccia, A. Porceddu, F. Ferranti, M. Falcinelli (2005). SERK and APOSTART Candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. Plant Physiology, 138:2185-2199.
- Albrecht, C., E. Russinova, V. Hecht, E. Baaijens, S. C. de Vries (2005). The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES 1 and 2 control male sporogenesis. The Plant Cell, 17:3337-3349.
- Albrecht, C., E. Russinova, B. Kemmerling, M. Kwaaitaal, S. C. de Vries (2008). *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE proteins serve brassinosteroid-dependent and -independent signaling pathways. Plant Physiology, 148:611-619.
- Arroyo-Herrera, A., A. Ku-González, R. Canche-Moo, F. R. Quiróz-Figueroa, V. M. Loyola Vargas, L. C. Rodríguez Zapata, C. Burgeff D'Hondt, V. M. Suarez-Solis, E. Castaño (2008). Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. Plant Cell Tissue Organ Cult, 94:171-180.
- Baudino, S., S. Hansen, R. Brettschneider, V. F. G. Hecht, T. Dresselhaus, H. Lörz, C. Dumas and P. M. Rogowsky (2001). Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinase, which belong to the SERK gene family. Planta, 213:1-10.

- 
- Bleysse, D., A. Gofflot and N. Michaux-Ferriere (1993). Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Can. J Bot.*, 71: 1496-1502.
- Boutilier, K., R. Offringa, V. K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C. M. Liu, A. A. M. van Lammeren, B. L. A. Miki, J. B. M. Custers and M. M. van Lookeren Campagne (2002). Ectopic Expression of *BABY BOOM* Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *Plant Cell*, 14: 1737-1749.
- Blanco, M. D. A., N. Nieves, M. Sánchez, C. G. Borroto, R. Castillo, J. L. González, M. Escalona, E. Báez, y Z. Hernández (1997). Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum* sp.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 51:153-158.
- Choi, Y.E., D. C. Yang, J. C. Park, W. Y. Soh & K. T. Choi (1998). Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. *Plant Cell Rep.*, 17: 544-551.
- Chugh, A., P. Khurana, (2002). Gene expression during somatic embryogenesis-recent advances. *Current Science*, 83: 715-730.
- De García, E., y A. Menendez (1987). Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto "Catimor". *Café Cacao Thé*, 31:15-22.
- De Jong, A. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Van Kammen & De Vries S. C. (1992). A *Daucus carota* somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, 4:425-433.
- De Jong, A J, T. Hendriks, EA. Meijer, M. Penning, F. Lo Schiavo, M. Terzi, A. van Kammen, S. C. de Vries (1995). Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant *tsll*. *Dev Genet.*, 16:332-343
- Denchev, P., A. Kuklin y A. Scragg (1992). Somatic embryo production in bioreactor. *Journal of Biotechnology*, 26:99-109.

- 
- Dijak, M., & D. H. Simmonds (1988). Microtubule organization during early direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa* L. *Plant Sci*, 58: 183-191.
- Dodeman, V. L., G. Ducreux & M. Kreis (1997). Zygotic embryo-genesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 48:1493-1509.
- Dudits, D., Z. Magyar, M. Deak, T. Meszaros, P. Miskolczi, A. Feher, S. Brown, E. Kondorosi, A. Athanasiadis, S. Pongor, L. Bako, C. Koncz & J. Gyorgyey (1998). Cyclin-and calcium-dependentkinase families: response of cell division cycle to hormone and stress signals. In: *Plant Cell Division*, Francis D., D. Dudits & D. Inze (eds). Portland Press, London, UK. pp. 21-47.
- Dublin, P. (1981). Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de cafeier arabusta. *Café Cacao Thé*, 25:237-242.
- Dure, III L. (1985). Embryogenesis and gene expression during seed formation. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 2:179-197.
- Fehér, A., T. P. Pasternak, D. Dudits (2003). Transition of somatic plant cell to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74:201-228
- Guzzo, F., B. Baldan, P. Mariani, F. LoSchiavo, and M. Terzi (1994). Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *J. Exp. Bot.*, 45:1427-1432
- Goldberg, R. B., S. J. Barker & L. Perez-Grau (1989). Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, 56:149-160.
- Halperin, W., W. A. Jensen (1967). Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J Ultrastruct Res.*, 18:428-443
- Hatanaka, T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida and Yamaguchi T. (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.*, 10: 179-182.

- 
- He, Z., Z. Y. Wang, J. Li, Q. Zhu, C. Lamb, P. Ronald and J. Chory (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor-like kinase BRI1. *Science*, 288: 2360-2363.
- Hecht, V., J. P. Vielle-Calzada, M. V. Hartog, E. D. L. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus, S. C. de Vries (2001). The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127:803-816.
- Helleboid, S, T. Hendriks, G. Bauw, D. Inze, J. Vasseur & J. L. Hilbert (2000). Three major somatic embryogenesis related proteins in *Cichorium* identified as PR proteins. *J. Exp. Bot.*, 51:1189-1200.
- Herman, E. B. y G. J. Haas (1975). Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*. 10: 588-589.
- Hu, H, L. Xiong, Y. Yang (2005). Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* 222:107-117.
- Ikeda, M, M. Umehara, H. Kamada (2006). Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23:153-161.
- Ivanova, A., M. Velcheva, P. Denchev, A. Atanassov & H. Van Onckelen (1994). Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiol. Plant.*, 92: 85-89
- Jack, T (2001) Plant development going MADS. *Plant Mol. Biol.*, 46: 515–520.
- Jimenez, V. M. (2001). Regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on to the role of endogenous hormones. *Revista Brasileira de Fisiología Vegetal*, 13:196

- 
- Jiménez, V. M., & F. Bangerth (2001a). Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 67: 37-46.
- Jiménez, V. M., & F. Bangerth (2001b). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiol. Plant.*, 111: 389-395.
- Jiménez, V. M., & F. Bangerth (2001c). Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci*, 160:247-257.
- Kamada, H., K. Kobayashi, T. Kiyosue & H. Harada (1989). Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 25:1163-116.
- Kamada, H, K. Ishikawa, H. Saga & H. Harada (1993). Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tiss. Cult. Lett.*, 10:38-44.
- Karlova, R., S. Boeren, E. Russinova, J. Aker, J. Vervoort, S. C. de Vries (2006). The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE 1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 1. *The Plant Cell*, 18:626-638.
- Kiyosue, T., K. Takano, H. Kamada & H. Harada (1990). Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can. J. Bot.*, 68:230.
- Komamine, A., M. Matsumoto, M. Tsukahara, A. Fujiwara, R. Kawahara, M. Ito, K. Nomura and T. Fujimura (1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures-physiology, biochemistry and molecular biology. In *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Nijkamp, H. J. J., L. H. W. Van Der Plas, A. Van Aartrijk (ed), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 307-313.
- Knox, J. P. (1997). The use of antibodies to study the architecture and developmental regulation of plant cell walls. *Int. Rev. Cytol.*, 171:79-120.

- 
- Kreuger, M., & G. J. Van Holst (1993). Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 189:243-248.
- Kreuger, M., & G. J. Van Holst (1995). Arabinogalactan proteins epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 197:135-141.
- Krikorian, A.D., y L.K. Simola (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiol. Plant.*, 105:348-355.
- Lin, X., G. J. Hwang and J. L. Zimmerman (1996). Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. *Plant Physiol.*, 112:1365-1374.
- Litz, R.E y R.L. Jarret (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT. Cali, Colombia. pp. 143-173.
- Lotan, T., M.A. Ohto, K.M. Yee, M. A. L. West, R. Lo, R.W. Kwong, K. Yamagishi, R.L. Fischer, Goldberg R.B. and J.J. Harada. (1998). Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93: 1195-1205.
- Matthys-Rochon, E. (2005). Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a mini review. *Acta Biol. Cracov. Bot.*, 47: 23-29.
- Quiroz-Figueroa F., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2006). DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *COFFEA CANEPHORA*. Plant tissue culture protocols 2nd edition, Serie: Methods in molecular biology vol. 318, V. M. Loyola Vargas y F. Vázquez-Flota (Eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, EEUU, pp. 111- 117.
- Rajasekaran K, M. B. Hein, G. C. Davis, M. G. Carnes & I. K.Vasil (1987). Exogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *J. Plant Physiol.*, 130: 13-25.

- 
- Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta* 53, 318–333.
- Rojas-Herrera, R., F. R. Quiroz-Figueroa, M. Monforte González, F. Sánchez-Teyer and V. M. Loyola-Vargas (2002). Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotechnol.*, 21: 43-50.
- Rojas-Herrera, R., y V. M. Loyola-Vargas (2002). Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. *Plant Sci*, 163:705-711.
- Rose, R.J., K.E. Nolan and L. Bicego (1999). The development of the highly regenerable seed line Jemalong 2HA for transformation of *M. truncatula*: implications for regenerability via somatic embryogenesis. *J. Plant Physiol.*, 155: 788-791
- Rodríguez, M., A. M. Cevallos y S. Montes (2000). Proteínas extracelulares marcadoras del potencial embriogénico en suspensiones celulares de *coffea spp.* *Cultivos tropicales*, 21(2): 11-15.
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, T. C. Lin, C. C. Chen & H. S. Tsay (2000). Cytokinin-induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) a medicinal plant. *PlantSci*. 160:139–147.
- Santa-Catarina, C., L. R. Hanai, M. C. Dornelas, A. M. Viana, E. I. S. Floh (2004). SERK gene homolog expression, polyamines and amino acids associated with somatic embryogenic competence of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79:53-61.
- Santos, M. O., E. Romano, L. S. Vieira, A. B. Baldoni, F. J. L. Aragão (2008). Suppression of SERK gene expression affects fungus tolerance and somatic embryogenesis in transgenic lettuce. *Plant Biol.*, 11: 83-89.
- Sharp, W. R., M. R. Sondhal, L. S. Caldas and G. B. Maraffa (1980). The physiological of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 2:268-310.
-

- 
- Singla, B., J. P. Khurana, P. Khurana (2008). Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 27:833-843.
- Song, D., G. Li, F. Song, Z. Zheng (2008). Molecular characterization and expression analysis of OsBISERK1, a gene encoding a leucine rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice. *Mol Biol Rep*, 35:275-283
- Schmidt, E. D. L., F. Guzzo, M. A. J. Toonen and S. C. de Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase mark somatic plant cell competent to form embryos. *Develop*. 124: 2049-2062.
- Shah, H, T. W. J. Gadella, H. van Erp, V. Hecht, S. C. de Vries (2001). Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. *Journal of Molecular Biology*, 309:641-655.
- Shah, K., E. Russinova, T.W. Gadella Jr., J. Willemse and S. C. de Vries (2002). The *Arabidopsis* kinase-associated protein phosphatase 1 controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes Dev.*, 16:1707-1720.
- Sharp, W. R., M. R. Sondhal, L.S. Caldas and G.B. Maraffa (1980). The physiological of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 2:268-310.
- Shimada, T, T. Hirabayashi, T. Endo, H. Fujii, M. Kita, M. Omura (2005). Isolation and characterization of the somatic embryogenesis receptor-like kinase gene homologue (CitSERK1) from *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae*, 103:233-238.
- Söndahl, M.R., W. R. Sharp (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 81:395-408.
- Söndahl, M. R., D. Spahlinger, W. R. Sharp (1979). A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie*, 94: 101-108.

- 
- Showalter, A. M. (2001). Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell Mol Life Sci*, 58:1399-1417.
- Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of *coffee*. *Acta Bot. Ned.*, 19: 509-514.
- Steward, F. C., M. O. Mapes and K. Mears (1958). Growth and organized development of cultured cells: II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45:705-708.
- Taylor M. G., I. K. Vasil (1996). The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*: Poaceae). *Am J Bot* 83:28-44
- Thomas, T. L. (1993). Gene expression during plant embryogenesis and germination: an overview. *Plant Cell*, 5:1401-1410.
- Thomas, C., D. Meyer, C. Himber, A. Steinmetz (2004). Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol Biochem.*, 42(1):35-42.
- Toonen, M. A. J, E. D. L Schmidt, T. Hendriks, H. A. Verhoeven, A. van Kammen & S. C. de Vries (1996). Expression of the JIM8 cellwall epitope in carrot somatic embryogenesis. *Planta*, 200:167-173
- Toonen, M. A., J.A. Verhees, E.D.L. Schmidt, A. van Kammen & S. C. de Vries (1997a). AtLTP1 luciferase expression during carrot somatic embryogenesis. *Plant J.* 12: 1213-1221.
- Toonen, M. A., J.A. Verhees, E.D.L. Schmidt, A. van Kammen & SC. de Vries (1997b). Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactanproteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta*, 203:188-195
- Torii, K. U., N. Mitsukawa, T. Oosumi, Y. Matsuura, R. Yokoyama, R.F. Whittier, Y. Komeda (1996). The *Arabidopsis* ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular leucine-rich repeats. *Plant Cell*. 8(4):735-746.
-

- Ullrich, A., & J. Schlessinger (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 61:203-12.
- Van Hengel, A. J., F. Guzzo, A. Van Kammen & S. C. de Vries (1998). Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiol.*, 117:43-53.
- Van Hengel, AJ, Z. Tadesse, P. Immerzeel, H. Schols, A. van Kammen & S. C. de Vries (2001). N-Acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.*, 125: 1880-1890.
- Villanueva-Alonzo, H. J. (2006). Aspectos bioquímicos y moleculares en el inicio de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. Tesis de maestría en ciencias y biotecnología de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. México. 69-78 p.
- Vroemen, C., S. C. de Vries & R. Quatrano (1999). Signalling in plant embryos during the establishment of the polar axis. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 10:157-164.
- Walker, J. C. (1994). Structure and function of the receptor-like protein kinases of higher plants. *Plant Mol. Biol.*, 26:1599-160.
- Williams, E.G., and G. Maheswaran (1986). Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann. Bot.*, 57:443-462.
- Yasuda, T., Y. Fujii and T. Yamaguchi (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell. Physiol.*, 26: 595-597.
- Zhang, H. X. and J. A. D. Zeevaart (1999). An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Cell Reports*, 18:640-645.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411-1423.

Zuo, J., Q. W. Niu, G. Frugis and N. H. Chua (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 30: 349-359.

---

## CAPÍTULO II

### **AISLAMIENTO DE LOS EXTREMOS 3' Y 5' DEL ADNC DE SERK1 DE *Coffea canephora*.**

#### **2.1 INTRODUCCIÓN**

Dado que en diversas especies vegetales SERK1 marca a las células que adquieren competencia embriogénica, es de gran interés determinar qué señal percibe directamente o indirectamente al receptor SERK1 y cuál es el mecanismo de transducción mediada por SERK1. Estudios bioquímicos, de biología celular y genética han aclarado partes de la cascada de señalización de SERK1.

Estudios en protoplastos (Shah *et al.*, 2001a; Russinova *et al.*, 2004) y en planta (Kwaaitaal *et al.*, 2005) con construcciones fusionadas con fluorescencia muestran que SERK1 se localiza en la membrana plasmática y compartimientos de la membrana intracelular como endosomas. Los sitios putativos de *N*-glucosilación de los dominios LRR, son esenciales para la correcta localización de SERK1 (Shah *et al.*, 2001a).

El modelado de la proteína usando al receptor cinasa de insulina (KRI) como templatado muestra que el dominio de cinasa contiene un bucle de activación (A-loop), similar al del receptor de KRI, pero contiene treoninas en lugar de tirosinas como residuos para ser potencialmente fosforilados (Shah *et al.*, 2001b).

El dominio cinasa de SERK1 tiene actividad de auto y transfosforilación y los residuos de treonina en el bucle de activación en las posiciones 462 y 468 son necesarios para dicha actividad (Shah *et al.*, 2001). En protoplastos, aproximadamente el 15% de los receptores SERK1 están presente en un estado predimerizado, como se ha demostrado mediante diferentes técnicas de microscopía de fluorescencia, incluyendo mediciones de fluorescencia por transferencia de energía resonante (FRET: Förster Resonance Energy Transfer) (Shah *et al.*, 2001a; Russinova *et al.*, 2004) y por la técnica de correlación cruzada de fluorescencia (FCCS: Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy) y por el método de Histograma de Recuento de Fotones (PCH: Pothon Counting Histogram) (Hink *et al.*, 2008).

La dimerización de SERK1 depende del dominio extracelular LZ (Shah *et al.*, 2001a).

El inicio de la ES se puede determinar a nivel molecular, mediante la detección de SERK (Schmidt *et al.*, 1997), esto ha permitido realizar estudios bioquímicos y moleculares en estadios tempranos de la inducción, previo a la aparición de los primeros estadios embriogénicos (Villanueva-Alonzo *et al.*, en proceso), de esta manera en el modelo de ES de *C. canephora* (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006) se ha podido aislar un fragmento de ADNc de SERK a partir de ARNm extraído de los explantes sometidos al proceso de ES. Este segmento de SERK (*CcSERK1*) de 776 pb, contiene el una parte del dominio intracelular de cinasa, el dominio transmembranal y una parte del dominio extracelular de unión al ligando, pero no se conocen los extremos 5' y 3' de este ADNc. Estos extremos aún desconocidos son importantes para identificar los eventos bioquímicos y moleculares inducidos por la activación ectópica del dominio de cinasa del receptor SERK y analizar su relación con el establecimiento de la ES.

Debido a que el objetivo del presente trabajo era obtener la secuencia completa del ADNc del gen SERK de *Coffea canephora*, es necesario aislar los extremos 3' y 5' del gen.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Material biológico

Para el desarrollo del presente trabajo se empleó tejido embrionario almacenado a -80 °C originado en condiciones *in vitro* a partir del protocolo de ES establecido por Quiroz-Figueroa *et al.*, (2006).

### 2.2.2 Metodologías

#### 2.2.2.1 Aislamiento del ARN total

La extracción del ARN se realizó con el reactivo comercial basado en el método de Chomczynski y Sacchi (1987) (TRIzol). A continuación, a partir de la fase acuosa, se extrae y precipita el ARN total con cloroformo e isopropanol respectivamente.

---

El protocolo que se siguió es el siguiente:

1. Pesar  $\geq 0.1$  g de cada uno de los explantes foliares de *C. canephora*.
2. Macerar, en presencia de  $N_2$  líquido, en un mortero estéril, hasta obtener un polvo fino y uniforme.
3. Adicionar inmediatamente un mL del reactivo comercial TRIzol y  $10^4$   $\mu$ L de  $\beta$ -mercaptoetanol, continuar macerando hasta obtener una solución homogénea.
4. Transferir el macerado a un tubo Eppendorf (1.5 mL) y dejar reposando 10 min a temperatura ambiente (TA).
5. Aplicar vórtex continuamente.
6. Centrifugar a  $14,000 \times g$ , por 15 min a  $4^\circ C$  y recuperar cuidadosamente la fase acuosa (incolora) sin tocar la interfase y transferir a un tubo limpio.
7. Adicionar 0.3 mL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) por cada un mL de TRIzol, e incubar a TA por 10 min con agitación vigorosa.
8. Centrifugar a  $14,000 \times g$ , por 15 min a  $4^\circ C$ , para separar las fases, las cuales son tres, la primera fase se trata del ARN, la segunda de proteínas y la última de ADN.
9. Tomar la primera fase con mucho cuidado y transferir a un nuevo tubo Eppendorf, se mide el volumen extraído.
10. De acuerdo al volumen extraído, adicionar 0.5 vol. de isopropanol, más 0.5 vol. una mezcla de 0.8 M de citrato de sodio/1 M de NaCl.
11. Incubar a  $4^\circ C$ , por hora y media, para precipitar el ARN presente en la muestra.
12. Centrifugar a  $14,000 \times g$  por 15 min, a  $4^\circ C$ , y decantar el sobrenadante, quedando sólo la pastilla de ARN en el fondo del tubo.
13. Lavar la pastilla con un mL de etanol al 75% ( $-20^\circ C$ )
14. Centrifugar a  $12,000 \times g$  por 10 min, a  $4^\circ C$ , y decantar el sobrenadante.

15. Secar la pastilla a TA por 15 min y por último resuspender la pastilla en 20  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Sigma (libre de RNAsas).

#### 2.2.2.2 Síntesis de la primera cadena y amplificación Rápida de Extremos de ADNc 3' y 5'-RACE

La síntesis de la primera cadena (csADNc) y la amplificación Rápida de Extremos de ADNc 3' y 5'-RACE se realizó mediante el uso del kit **SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech)**, esta tecnología es utilizada para la obtención de la longitud completa de los extremos 5' y 3' del ARN mensajero de interés, la metodología se describe en el Anexo I.

#### 2.2.2.3 Purificación de ADN desde geles de agarosa

La purificación de las bandas de ADN fraccionados en gel de agarosa se realizó mediante el uso del kit NucleoTrap® Gel Extraction Trial, incluido en el kit de SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech), la metodología se describe en el ANEXO I.

#### 2.2.2.4 Ligación de los productos de la amplificación al plásmido vector

Los fragmentos obtenidos se ligaron al vector pGEM-T-Easy® (Promega), de acuerdo con el protocolo descrito a continuación.

1. Centrifugar brevemente el tubo que contiene al vector para coleccionar el líquido en el fondo del tubo.
2. Establecer reacciones de ligación como se describe en el siguiente cuadro.
3. Agregar cada reactivo como se describe en el cuadro siguiente:

---

Componente	Reacción estándar	Testigo positivo
Amortiguador de ligación 2X	5 $\mu$ L	5 $\mu$ L
Vector pGEM®-T-Easy (50ng)	1 $\mu$ L	1 $\mu$ L
ADNc obtenido	1 $\mu$ L	--
Testigo de inserto ADN	--	2 $\mu$ L
ADN ligasa T4	1 $\mu$ L	1, $\mu$ L
H <sub>2</sub> O estéril	10 $\mu$ L	10 $\mu$ L

Mezclar la reacción con la micropipeta e incubar la reacción a TA por 5 min.

Transformar células competentes inmediatamente o almacenar los productos de ligación a -20 °C.

#### 2.2.2.5 Transformación de *E. coli* por choque térmico

1. Descongelar las células competentes en hielo.
2. Agregar 1  $\mu$ L de la solución de ligación, mezclar por agitación suave.
3. Incubar por 30 min en hielo.
4. Incubar a 42 °C por 45 seg.
5. Incubar en hielo por 10 min.
6. Agregar 900  $\mu$ L de medio LB e incubar por 1.5 h a 37 °C con agitación suave.
7. Centrifugar por 10 seg a 10,000 x g y eliminar el sobrenadante.
8. Resuspender la pastilla en 100  $\mu$ L de medio LB.
9. Sembrar en cajas Petri en medio LB conteniendo 100 g·mL<sup>-1</sup> de ampicilina, 0.026% de X-Gal y 0.28% de IPTG.

#### **2.2.2.6 Purificación del ADN plasmídico**

La purificación de ADN plasmídico se realizó mediante el método de extracción en sílica, el procedimiento se describe en el Anexo I.

#### **2.2.2.7 Análisis de las clonas recombinantes**

Para saber si las colonias transformadas contienen los segmentos de ADNc correspondientes se procede a realizar una serie de análisis confirmatorios.

- a) Liberación de insertos con el uso de enzimas de restricción. El corte de los plásmidos con enzima de restricción permite determinar si se libera un fragmento y si éste tiene el mismo tamaño del fragmento amplificado.
- b) Reamplificación de insertos mediante PCR, los plásmidos obtenidos de las clonas seleccionadas se utilizan como plantillas para amplificar segmentos de ADNc, se deben obtener fragmentos del tamaño pronosticado.
- c) Secuenciación de insertos. Una vez realizadas las dos pruebas anteriores, se seleccionan las clonas positivas y se envían a secuenciar.

#### **2.2.2.8 Análisis filogenético**

La secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1 fue utilizada para el análisis filogenético utilizando el programa Mega 5. Las secuencias descritas que se utilizaron para las comparaciones se obtuvieron del NCBI. Los alineamientos fueron exportados al programa MEGA (Versión 5.0) para la construcción de la filogenia molecular, se utilizó el test "Neighbor-Joining" (NJ) con el método *p-distance* con 1000 replicas *bootstrap*,

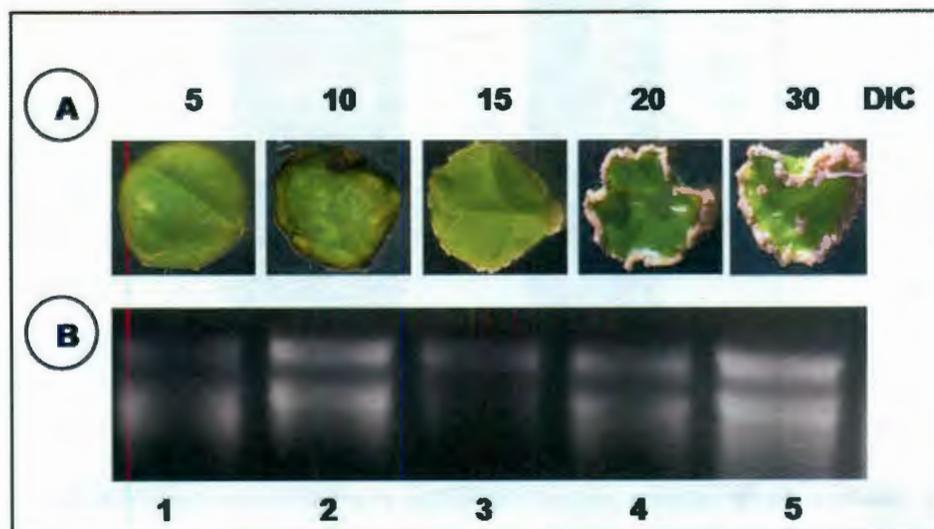
## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Aislamiento de los extremos 3' y 5' del ADNc de SERK de *C. canephora*

#### 2.3.1.1 Obtención del extremo 3'

##### 2.3.1.1.1 Síntesis de primera cadena ADNc y amplificación del extremo 3'-RACE

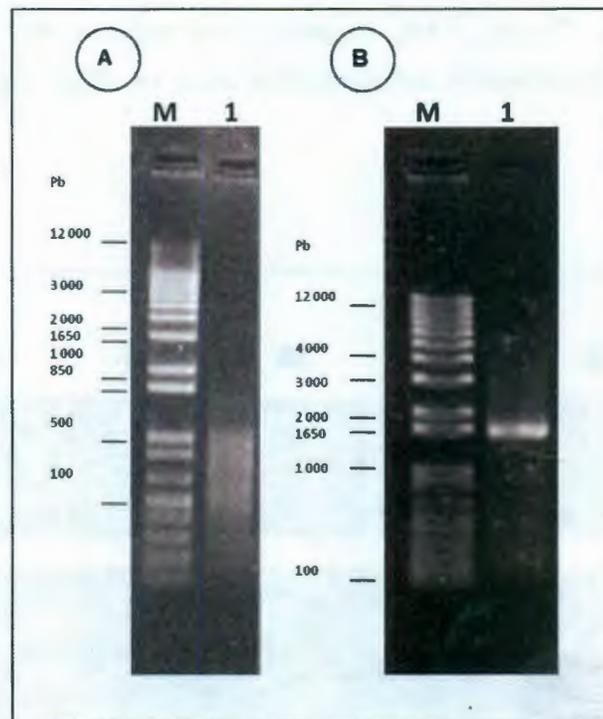
Se extrajo ARN total de explantes foliares de *C. canephora* de diferentes etapas del proceso embriogénico (5, 10, 15, 20 y 30 DIC) (Figura 2.1A). Una vez verificada la integridad de las muestras de ARN total mediante su fraccionamiento electroforético en un gel nativo de agarosa (Figura 2.1B), se generó una poza de ARN compuesta por  $0.8 \mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  de ARN de cada muestra individual. Esta poza se utilizó como templado para la síntesis del ADNc.



**Figura 2.1** Integridad del ARN total aislado. A. Muestras de explantes foliares de plántulas de café en diferentes períodos después de la inducción embriogénica, fueron utilizadas para la extracción de ARN total. B. Alícuotas de  $3 \mu\text{L}$  de cada muestra de ARN total fueron fraccionadas por electroforesis nativa en gel de agarosa al 1.5% y teñidas con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. Carril 1: día 5; carril 2: día 10; carril 3: día 15; carril 4: día 25; carril 5: día 30.

Una vez que se corroboró la integridad del ARN molde, se sintetizó la primera cadena de ADNc para la amplificación de los extremos 3' y 5', cada una por separado como se explica en Materiales y Métodos.

Para la amplificación del extremo 3' se utilizó un programa "touchdown", como templado una dilución 1:10 de la primera cadena de ADNc "3'-RACE", y la combinación de un cebador específico (GPS2) y el cebador universal UPM del kit. El producto obtenido se fraccionó por electroforesis en un gel nativo de agarosa y se visualizó bajo luz UV (Figura 2.2A).



**Figura 2.2** Síntesis de la primera cadena de ADNc y amplificación por PCR del extremo 3' correspondiente al transcrito de *SERK1* de *C. canephora*. Una alícuota del producto de PCR obtenido con el cebador específico y el cebador UPM fue fraccionada por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. A: Carril 1: Síntesis de la primera cadena 3'-RACE; B: Carril 1: fragmento obtenido del extremo 3'-CcSERK. M: Escalera de ADN de 1 Kb.

---

En el carril 1 de la Figura 2.2B se puede observar la presencia de un fragmento de aproximadamente 1,650 pb, correspondiente al extremo 3' del ADNc de CcSERK1. Este fragmento se extrajo del gel de agarosa y se clonó en el vector "pGEM-T Easy", aprovechando los residuos de adenilato que adiciona de manera inespecífica la actividad residual de la Taq polimerasa al completar el molde, mismos que alinean con los residuos de timidilato presentes en el vector. Los productos de ligación fueron utilizados para transformar la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* por medio de choque térmico.

### 2.3.1.2 Obtención del extremo 5'

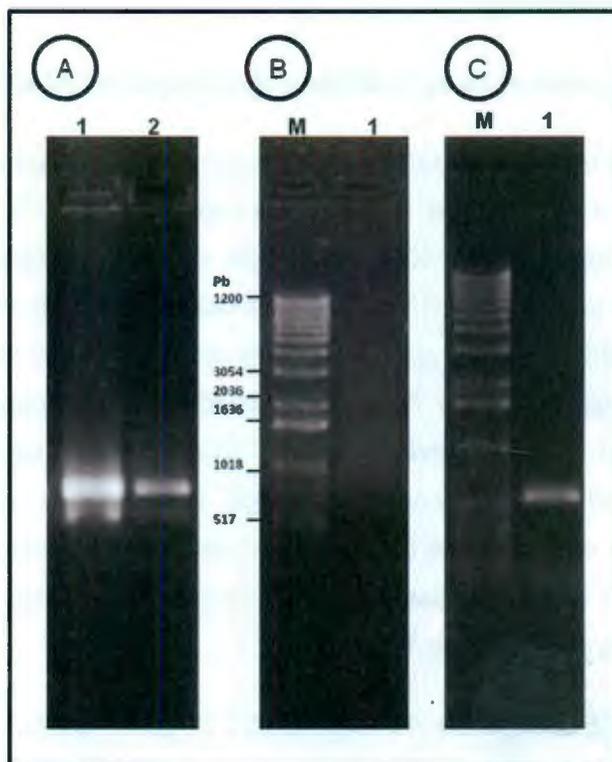
#### 2.3.1.2.1 Síntesis de primera cadena ADNc y amplificación del extremo 5'-RACE

Se aisló ARN total de explantes foliares de *C. canephora* de diferentes etapas del proceso embriogénico (20 y 30 DIC) (Figura 2.3A), de los cuales se hizo una mezcla equitativa de ARN total a una concentración de 200  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  para sintetizar la primera cadena de ADNc para la amplificación del extremo 5' del ADNc de CcSERK1 (se le nombró 5'-RACE). Se usó el cebador "5' CDS primer A", que alinea en la cola de poli-A y contiene un adaptador para la posterior amplificación por PCR con cebadores complementarios a esta región; también se utilizó el oligonucleótido cebador "SMARTer IIA" del kit, con el que se aprovecha la actividad residual inespecífica de las transcriptasas reversas, de adicionar residuos de guanilato en el extremo 3' de la nueva cadena, en ausencia de templado, una vez que llegó al final de molde. Estos oligonucleótidos cebadores son exclusivos de la estrategia para sintetizar el extremo 5' del ADNc.

A partir de la primera cadena de ADNc 5'-RACE (Figura 2.3B), se hizo una primera detección de la presencia del transcrito del gen CcSERK1 con cebadores específicos, obteniendo un producto de PCR de 575 pb (Figura 2.3C). Este resultado sugiere que dentro de la población de ADNc sí se encuentra representado el transcrito del gen CcSERK1, por lo que se procedió a la amplificación de su extremo 5'.

Para la amplificación del extremo 5'-RACE se utilizó una dilución de la primera cadena de ADNc de acuerdo a la especificación del kit, y usando el programa touchdown, con un cebador específico (GSP1, por sus siglas en inglés) y un el cebador universal (UPM, por sus siglas en inglés).

El producto que se obtuvo en la reacción de PCR fue un barrido por encima de 14,000 pb (Figura 2.5A), este resultado siempre se había obtenido en reacciones anteriores a pesar de utilizar varias concentraciones de ADNc y temperatura de alineamiento del cebador específico.



**Figura 2.3** Verificación de la integridad del ARN total aislado y síntesis de la primera cadena de ADNc para la amplificación del extremo 5'. Una alícuota de los productos de PCR fue separada por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% y teñidas con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. A: Carril 1 y 2: ARN total extraído de explantes foliares de café de los tiempos 25 y 30 días de inducción de ES, respectivamente; B: Carril 1: Síntesis de primera cadena de ADNc 5'-RACE; C: Detección de CcSERK1 con cebadores específicos; M: Escalera de ADN de 1 Kb.

Debido a que no se logró amplificar el extremo 5'-RACE de forma específica, se procedió a utilizar como templado el producto obtenido de la primera amplificación utilizando varias diluciones (1:20, 1:50; 1:75; 1:100) y modificando la temperatura de alineamiento de los cebadores específicos (60, 65, 68, 70 °C) para hacer un PCR-anidado, utilizando un cebador específico anidado (N-GSP1) y el cebador universal anidado (NUP) utilizando el segundo programa de PCR (descrito en el ANEXO I).

La dilución 1:75 fue la que dió el mejor resultado, obteniéndose un producto de PCR de aproximadamente 1,200 pb (Figura 2.4B).



**Figura 2.4** Amplificación por PCR del extremo 5' del gen SERK1 de *C. canephora*. Una alícuota de los productos de PCR fue fraccionada por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. A: Carril 1: producto de PCR obtenido a partir de la combinación de los cebadores GSP2 x UPM; B: Carril 1: Producto de la amplificación del extremo 5' mediante un PCR anidado a partir de una dilución 1:75 del producto de PCR; C: Producto de la amplificación del extremo 5' mediante un sub-PCR anidado a partir de una dilución 1:75 del producto del PCR anidado; M: Escalera de ADN de 1 Kb.

Dado que se tuvo problemas en clonar este producto se procedió en hacer un sub-PCR anidado tomando como templado una dilución 1/75 del producto obtenido en el PCR anidado, de esta manera se obtuvo un producto de aproximadamente, 900 pb (Figura 2.4C) que se ligó directamente en el vector de clonación.

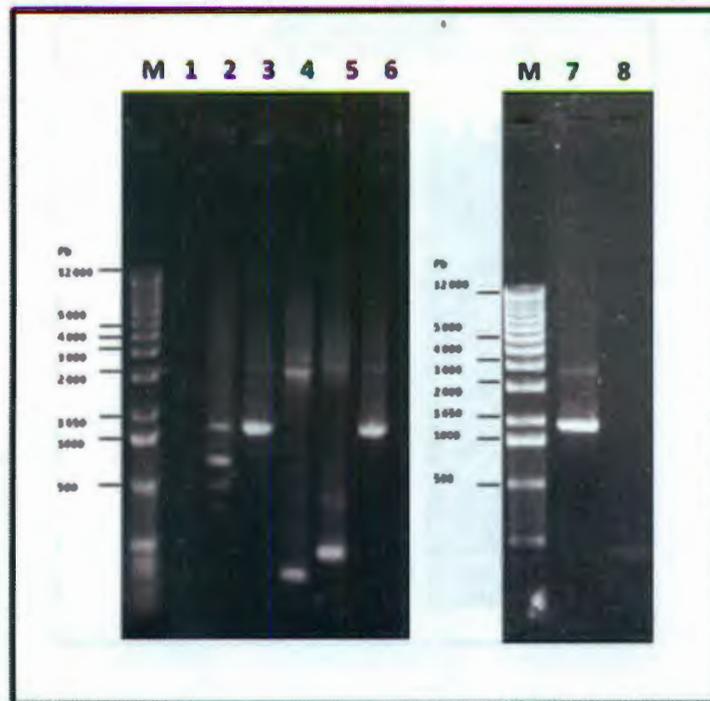
### **2.3.2 Análisis de clonas recombinantes**

#### **2.3.2.1 Amplificación por PCR mediante cebadores M13 y cebadores específicos**

De los ocho plásmidos extraídos, previo al envío para su secuenciación, se corroboró la presencia del fragmento 3'-RACE de cada clona mediante su amplificación por PCR utilizando los cebadores universales M13, estos cebadores universales reconocen una secuencia que se encuentra flaqueando la región múltiple de clonado del vector pGEM-T easy, lo que permite amplificar el fragmento de ADN clonado en esa región.

Los resultados se muestran en la Figura 2.5. Puede observarse que únicamente se obtuvo un producto del tamaño esperado en las clonas de los carriles 3, 6 y 7. Estas clonas se enviaron a secuenciar a la empresa Davis Sequencing, con las especificaciones de la compañía.

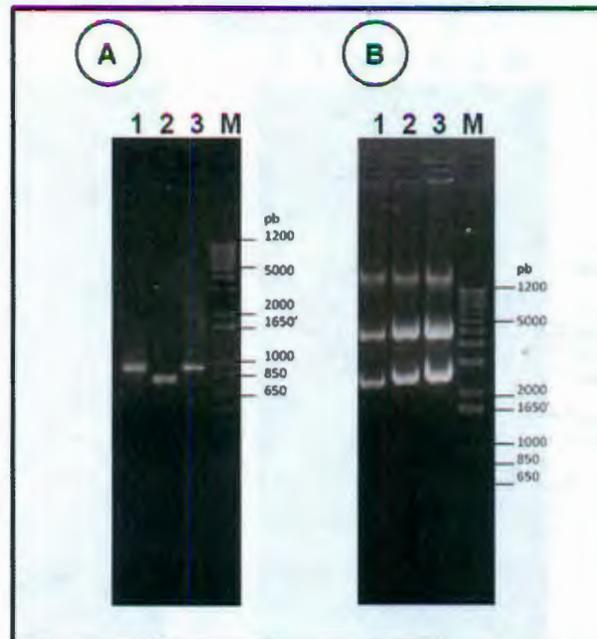
De las tres clonas enviadas a secuenciar del extremo 3', todas fueron positivas pero solo la clona 3'-1.10 (carril 3 de la Figura 2.5) fue secuenciada completamente.



**Figura 2.5** Extracción de ADN plasmídico y amplificación por PCR de los insertos en las clonas recombinantes 3'-RACE. Fraccionamiento de productos de PCR obtenidos con los cebadores M13, por electroforesis en gel nativo de agarosa al 1.1% y teñidos con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. Carriles 1-8: ADN plasmídico aislado de 8 clonas diferentes 3'-CcSERK; M: escalera de ADN de 1 Kb.

Con respecto a las clonas 5' obtenidas a partir de la ligación directa del producto de PCR, se realizó un escrutinio de ochenta clonas proveniente de tres placas diferentes, mediante PCR directo de las colonias recombinantes con cebadores M13 para amplificar el fragmento clonado.

De esta manera se obtuvo 6 clonas diferentes que dan el tamaño aproximado. Con la finalidad de tener un resultado más confiable y evitar falsos positivos, a estas seis clonas se les practicó una amplificación por PCR, con los cebadores usados para la amplificación original (Sub-NGSP1 x NUP), obteniéndose 2 clonas del tamaño esperado (900 pb) y una de 800 pb (Figura 2.6A).



**Figura 2.6** Amplificación por PCR de los insertos en las clonas recombinantes 5'-RACE y aislamiento de ADN plasmídico. Fraccionamiento electroforético de productos de PCR obtenidos con los cebadores específicos y ADN plasmídico de cada clona positiva, en gel de agarosa al 1.1% y teñidos con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. A: carril 1-3: PCR de cuatro clonas diferentes; B: carril 1-3: ADN plasmídico de cada clona positiva 5'-RACE; M: escalera de ADN de 1 Kb.

Una alícuota de las colonias positivas fue cultivada en medio LB con  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de ampicilina, a  $37^\circ\text{C}$  toda la noche, posteriormente se procedió a la extracción del ADN plasmídico mediante lisis alcalina (Figura 2.6B). Estos plásmidos se enviaron a secuenciar.

### 2.3.3 Análisis de las secuencias de ADNc de las clonas 3' y 5'.

De las tres clonas enviadas a secuenciar del extremo 3', todas fueron positivas, pero solo la clona 3'-1.10 fue secuenciada completamente. De las tres clonas correspondiente al extremo 5', también todas fueron positivas, aunque solo dos (clonas 5'-2-2 y 5'-2-40) se secuenciaron completas.

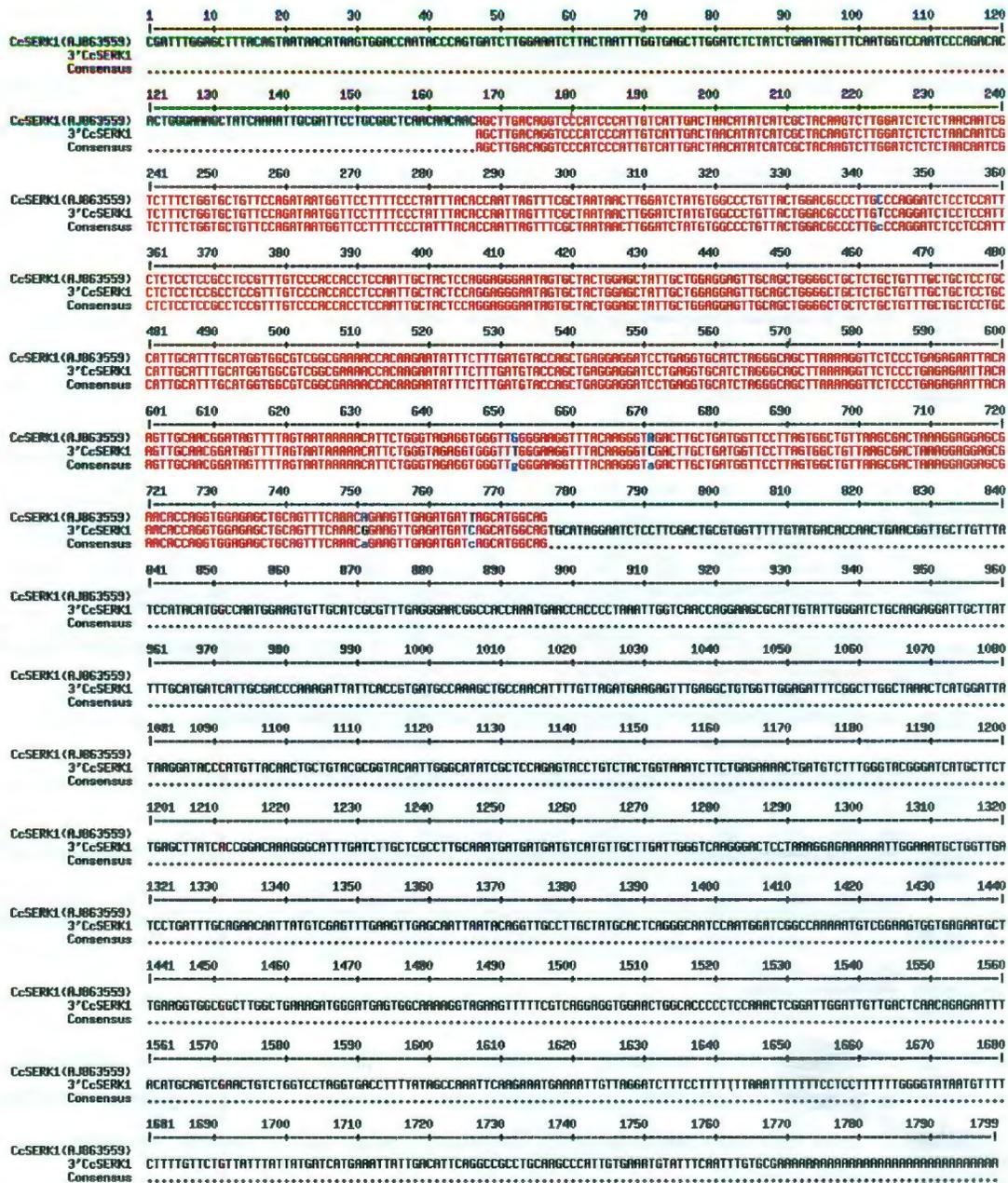
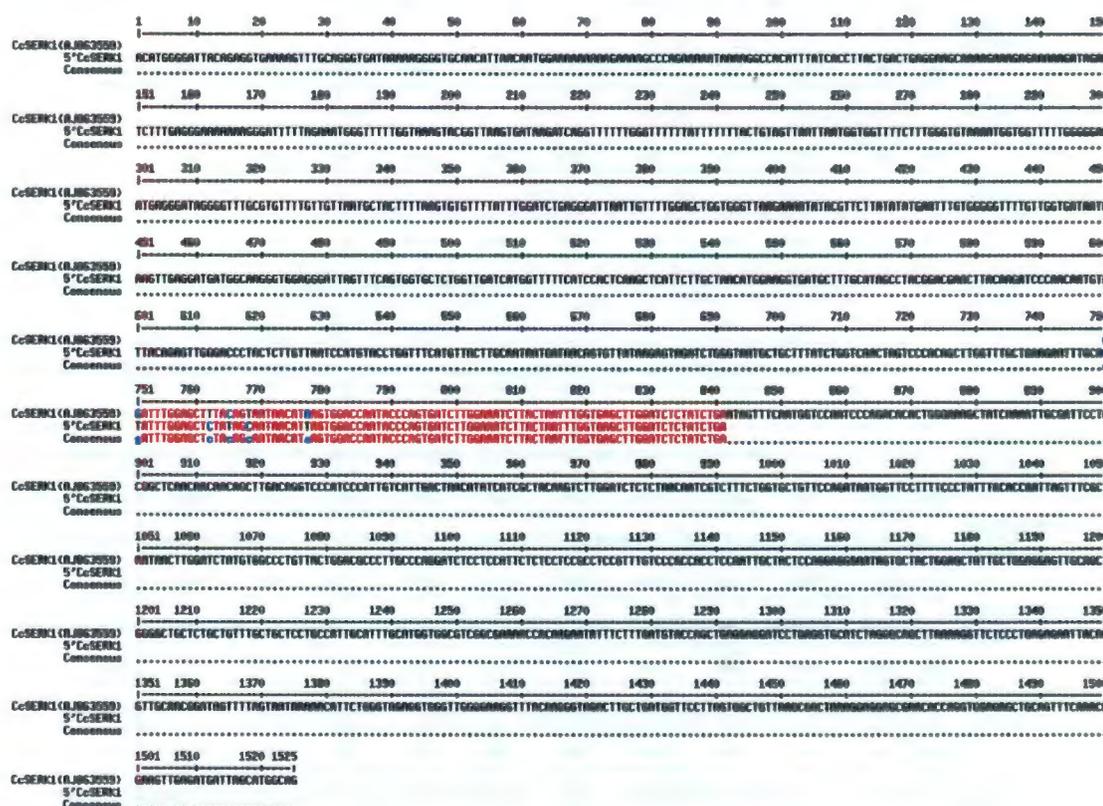


Figura 2.7 Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la clona 3'-CcSERK1. La secuencia de nucleótidos de la clona 3'-CcSERK1 fue alineada con la secuencia del fragmento de SERK1 reportada por Villanueva-Alonzo, (2006) (AJ863559). En color rojo se muestra la región de traslape de ambas secuencias y en color azul se muestra los cambios puntuales.

Después de “curar” la secuencia para eliminar la parte correspondiente al vector, la secuencia obtenida se alineó con la secuencia clonada previamente por Villanueva-Alonzo, (2006) (Accesión AJ863559), con el fin de determinar las regiones de traslape. En la Figura 2.7 se observa la secuencia obtenida del extremo 3’ y en la Figura 2.8 la secuencia del extremo 5’.



**Figura 2.8** Alineamiento de la secuencia nucleotídica de la clona 5'-CcSERK1. La secuencia de nucleótidos de la clona 5'-CcSERK1 fue alineada con la secuencia del fragmento de CcSERK1 (AJ863559). En color rojo se muestra la región de traslape de ambas secuencia y en color azul se muestra los cambios puntuales.

La secuencia obtenida del extremo 3'-CcSERK1, de 1,633 pb, se alineó con la secuencia de nucleótidos del fragmento de CcSERK1, variando solo en cinco bases (dos timinas, una en la posición 343 y la otra en la posición 652; una citosina en la posición 671; y dos guaninas, una en la posición 751 y la otra en la posición 766), de esta manera se dedujo que la parte del extremo 3' que se desconocía es de 1,030 pb (incluyendo la región 3'UTR).

1	<u>ACATGGGGAT</u>	<u>TACAGAGGTG</u>	<u>AAAAGTTTGC</u>	<u>AGGGTGATAA</u>	<u>AAAGGGGTGC</u>	<u>AACATTAACA</u>	60
61	<u>ATGGAAAAAA</u>	<u>AAAGAAAAGC</u>	<u>CCAGAAAAAT</u>	<u>AAAAGGCCAC</u>	<u>ATTTATCACC</u>	<u>TTACTGACTG</u>	120
121	<u>AGGAAGCAAA</u>	<u>AGAAAAGAAA</u>	<u>AAAGATAGAA</u>	<u>TCTTTGAGGG</u>	<u>AAAAAAGGG</u>	<u>ATTTTAGAA</u>	180
181	<u>ATGGGTTTTT</u>	<u>GGTAAAGTAC</u>	<u>GGTTAAGTGA</u>	<u>TAAGATCAGG</u>	<u>TTTTTTGGGT</u>	<u>TTTTTATTTT</u>	240
241	<u>TTTACTGTAG</u>	<u>TTAATTAATG</u>	<u>GTGGTTTTCT</u>	<u>TTGGGTGTAA</u>	<u>AATGGTGGTT</u>	<u>TTGGGGGAA</u>	300
301	<u>ATGAGGGATA</u>	<u>GGGGTTGCG</u>	<u>TGTTTTGTTG</u>	<u>TTAATGCTAC</u>	<u>TTTTAAGTGT</u>	<u>GTTTTATTTG</u>	360
361	<u>GATCTGAGGG</u>	<u>ATTAATTGTT</u>	<u>TTGGAGCTGG</u>	<u>TGGGTAAAGA</u>	<u>AAATATACGT</u>	<u>TCTTATATAT</u>	420
421	<u>GAATTTGTGG</u>	<u>GGGTTTTGTT</u>	<u>GGTGATAATG</u>	<u>AAGTTGAGGA</u>	<u>TGATGGCAAG</u>	<u>GGTGGAGGGA</u>	480
481	<u>TTAGTTTCAG</u>	<u>TGGTGCTCTG</u>	<u>GTTGATCATG</u>	<u>GTTTTTCATC</u>	<u>CACTCAAGCT</u>	<u>CATTCTTGCT</u>	540
541	<u>AACATGGAAG</u>	<u>GTGATGCTTT</u>	<u>GCATAGCCTA</u>	<u>CGGACGAACT</u>	<u>TACAAGATCC</u>	<u>CAACAATGTA</u>	600
601	<u>TTACAGAGTT</u>	<u>GGGACCCTAC</u>	<u>TCTTGTTAAT</u>	<u>CCATGTACCT</u>	<u>GGTTTCATGT</u>	<u>TACTTGCAAT</u>	660
661	<u>AATGATAACA</u>	<u>GTGTTATAAG</u>	<u>AGTAGATCTG</u>	<u>GGTAATGCTG</u>	<u>CTTTATCTGG</u>	<u>TCAACTAGTC</u>	720
721	<u>CCACAGCTTG</u>	<u>GTTTGCTGAA</u>	<u>GAATTTGCAG</u>	<u>TATTTGGAGC</u>	<u>TCTATAGCAA</u>	<u>TAACATTAGT</u>	780
781	<u>GGACCAATAC</u>	<u>CCAGTGATCT</u>	<u>TGGAAATCTT</u>	<u>ACTAATTTGG</u>	<u>TGAGCTGGA</u>	<u>TCTCTATCTG</u>	840
841	<u>AATAGTTTCA</u>	<u>ATGGTCCAAT</u>	<u>CCAGACACA</u>	<u>CTGGGAAAGC</u>	<u>TATCAAAATT</u>	<u>GCGATTCCTG</u>	900
901	<u>CGGCTCAACA</u>	<u>ACAACAGCTT</u>	<u>GACAGGTCCT</u>	<u>ATCCCATTGT</u>	<u>CATTGACTAA</u>	<u>CATATCATCG</u>	960
961	<u>CTACAAGTCT</u>	<u>TGGATCTCTC</u>	<u>TAACAATCGT</u>	<u>CTTTCTGGTG</u>	<u>CTGTTCCAGA</u>	<u>TAATGGTTCC</u>	1020
1021	<u>TTTTCCCTAT</u>	<u>TTACACCAAT</u>	<u>TAGTTTCGCT</u>	<u>AATAACTTGG</u>	<u>ATCTATGTGG</u>	<u>CCCTGTTACT</u>	1080
1081	<u>GGACGCCCTT</u>	<u>GTCCAGGATC</u>	<u>TCCTCCATTG</u>	<u>TCTCCTCCGC</u>	<u>TCCCGTTTGT</u>	<u>CCCACCACCT</u>	1140
1141	<u>CCAATTGCTA</u>	<u>TCCCAGGAGG</u>	<u>GAATAGTGCT</u>	<u>ACTGGAGCTA</u>	<u>TTGCTGGAGG</u>	<u>AGTTGCAGCT</u>	1200
1201	<u>GGGGCTGCTC</u>	<u>TGCTGTTTGC</u>	<u>TGCTCCTGCC</u>	<u>ATTGCATTTG</u>	<u>CATGGTGGCG</u>	<u>TCGGCGAAAA</u>	1260
1261	<u>CCACAAGAA</u>	<u>ATTTCTTTGA</u>	<u>TGTACCAGCT</u>	<u>GAGGAGGATC</u>	<u>CTGAGGTGCA</u>	<u>TCTAGGGCAG</u>	1320
1321	<u>CTTAAAAGGT</u>	<u>TCTCCCTGAG</u>	<u>AGAATTACAA</u>	<u>GTTGCAACGG</u>	<u>ATAGTTTTAG</u>	<u>TAATAAAAA</u>	1380
1381	<u>ATTCTGGGTA</u>	<u>GAGGTGGGTT</u>	<u>TGGGAAGGTT</u>	<u>TACAAGGGTC</u>	<u>GACTTGCTGA</u>	<u>TGGTTCCTTA</u>	1440
1441	<u>GTGGCTGTTA</u>	<u>AGCGACTAAA</u>	<u>GGAGGAGCGA</u>	<u>ACACCAGGTG</u>	<u>GAGAGCTGCA</u>	<u>GTTTCAAACG</u>	1500
1501	<u>GAAGTTGAGA</u>	<u>TGATCAGCAT</u>	<u>GGCAGTGCAT</u>	<u>AGGAATCTCC</u>	<u>TTCGACTGCG</u>	<u>TGGTTTTTGT</u>	1560
1561	<u>ATGACACCAA</u>	<u>CTGAACGGTT</u>	<u>GCTTGTTTAT</u>	<u>CCATACATGG</u>	<u>CCAATGGAAG</u>	<u>TGTTGCATCG</u>	1620
1621	<u>CGTTTGAGGG</u>	<u>AACGGCCACC</u>	<u>AAATGAACCA</u>	<u>CCCCTAAATT</u>	<u>GGTCAACCAG</u>	<u>GAAGCGCATT</u>	1680
1681	<u>GTATTGGGAT</u>	<u>CTGCAAGAGG</u>	<u>ATTGCTTATT</u>	<u>TTGCATGATC</u>	<u>ATTGCGACCC</u>	<u>AAAGATTATT</u>	1740
1741	<u>CACCGTGATG</u>	<u>CCAAAGCTGC</u>	<u>CAACATTTTG</u>	<u>TTAGATGAAG</u>	<u>AGTTTGAGGC</u>	<u>TGTGTTGGA</u>	1800
1801	<u>GATTTCCGGT</u>	<u>TGGCTAAACT</u>	<u>CATGGATTAT</u>	<u>AAGGATACCC</u>	<u>ATGTTACAAC</u>	<u>TGCTGTACGC</u>	1860
1861	<u>GGTACAATTG</u>	<u>GGCATAATCG</u>	<u>TCCAGAGTAC</u>	<u>CTGTCTACTG</u>	<u>GTAATCTTTC</u>	<u>TGAGAAAAC</u>	1920
1921	<u>GATGTCTTTG</u>	<u>GGTACGGGAT</u>	<u>CATGCTTCTT</u>	<u>GAGCTTATCA</u>	<u>CCGGACAAA</u>	<u>GGCATTGTGAT</u>	1980
1981	<u>CTTGCTCGCC</u>	<u>TTGCAAATGA</u>	<u>TGATGATGTC</u>	<u>ATGTTGCTTG</u>	<u>ATTGGGTCAA</u>	<u>GGGACTCCTA</u>	2040
2041	<u>AAGGAGAAAA</u>	<u>AATTGGAAT</u>	<u>GCTGGTTGAT</u>	<u>CCTGATTTGC</u>	<u>AGAACAATTA</u>	<u>TGTCGAGTTT</u>	2100
2101	<u>GAAGTTGAGC</u>	<u>AATTAATACA</u>	<u>GGTTGCCTTG</u>	<u>CTATGCACTC</u>	<u>AGGGCAATCC</u>	<u>AATGGATCGG</u>	2160
2161	<u>CCAAAAATGT</u>	<u>CGGAAGTGGT</u>	<u>GAGAATGCTT</u>	<u>GAAGGTGGCG</u>	<u>GCTTGGCTGA</u>	<u>AAGATGGGAT</u>	2220
2221	<u>GAGTGGCAAA</u>	<u>AGGTAGAAGT</u>	<u>TTTTCGTCAG</u>	<u>GAGGTGGAAC</u>	<u>TGGCACCCCC</u>	<u>TCCAACCTCG</u>	2280
2281	<u>GATTGGATTG</u>	<u>TTGACTCAAC</u>	<u>AGAGAATTTA</u>	<u>CATGCAGTCG</u>	<u>AACTGTCTGG</u>	<u>TCCTAGGTTGA</u>	2340
2341	<u>CCTTTTGGG</u>	<u>CCAAATTCAA</u>	<u>GAAATGAAAA</u>	<u>TTGTTAGGAT</u>	<u>CTTTCCTTTT</u>	<u>TTTTTTT</u>	2400
2401	<u>TTTCTCCTT</u>	<u>TTTTGGGGTA</u>	<u>TAATGTTTTT</u>	<u>TTTTGTTCTG</u>	<u>TTATTTATTA</u>	<u>TGATCATGAA</u>	2460
2461	<u>ATTATTGACA</u>	<u>TTCAGGCCGC</u>	<u>CTGCAAGCCC</u>	<u>ATTGTGAAAT</u>	<u>GTATTTCAAT</u>	<u>TTGTGCGAAA</u>	2520
2521	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAAAAA</u>	<u>AAAAAAA</u>				2548

**Figura 2.9** Secuencia nucleotídica del transcrito de SERK1 de *C. canephora*. Esta clona tiene una longitud de 2,548 pb. En los cuadros blancos se muestra los codones de inicio y de terminación, respectivamente. En los cuadros negros con letra blanca se muestran dos posibles sitios consenso de poliadenilación. En el extremo 3' se observa la cola de poliadenilación (en negritas). Las bases subrayadas corresponden a las regiones 3' y 5' no traducibles.

La secuencia obtenida del extremo 5'-CcSERK1 es de 841 pb, variando solo en seis bases (dos citosinas, una en la posición 750 y la otra en la posición 765; una guanina en la posición 750; dos timinas, una en la posición 761 y la otra en la posición 768; y una adenina en la posición 777), de esta manera se dedujo que la parte del extremo 5' que se desconocía es de 749 pb (incluyendo la región 5'UTR). Con base en el traslape de las secuencias de SERK1 de *Coffea canephora* se integró un segmento completo que contiene ambas secuencias, mismo que se presenta en la Figura 2.9.

A partir de esta secuencia de nucleótidos se obtuvo la secuencia deducida de aminoácidos, mediante el uso de la herramienta "Translate Tool" del servidor en internet "Expasy Translate Tool" del Swiss Institute for Bioinformatics (<http://expasy.org/tools/dna.html>). Se realizó un análisis tipo BLAST para determinar la identidad del polipéptido codificado por los dos segmentos clonados de ADNc. Los resultados se muestran en el cuadro 2.1.

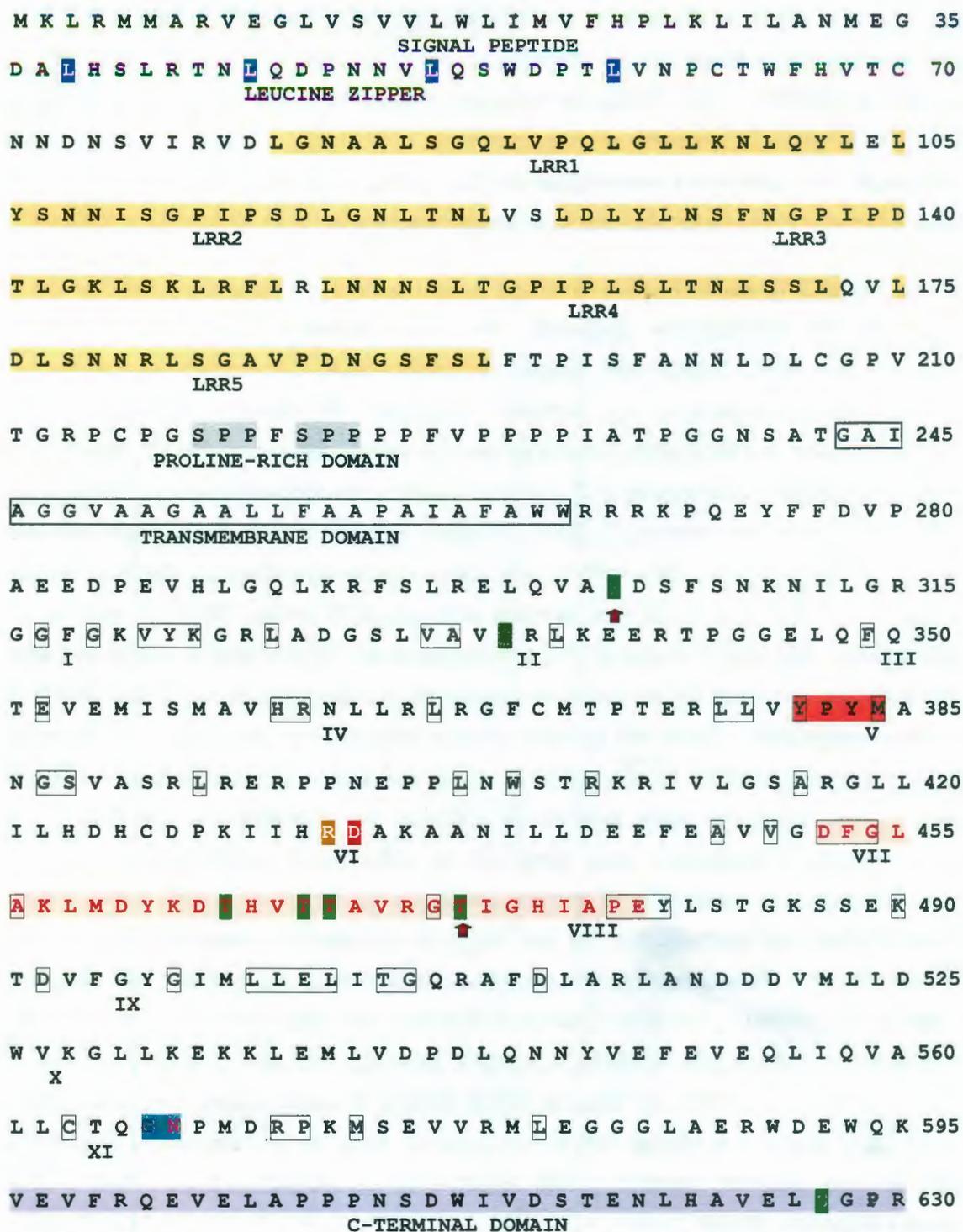
**Cuadro 2.1** Resultados del análisis BLAST de la secuencia SERK1 de *Coffea canephora*

Accesión	Descripción	Cobertura total	Cobertura problema	Valor E
ABR18800.1	Som. Emb. receptor kinase 1 [ <i>Solanun peruvianum</i> ]	1085	99%	0.0
NP001233866.1	Som. Emb. receptor kinase 1 [ <i>Solanun lycopersicum</i> ]	1080	99%	0.0
ABO14172.1	Som. Emb. receptor kinase 1 [ <i>Solanun tuberosum</i> ]	1080	99%	0.0
ACP20180.1	Som. Emb. receptor kinase [ <i>Citrus sinensis</i> ]	1077	97%	0.0
ABS32228.1	Som. Emb. receptor kinase [ <i>Carica papaya</i> ]	1076	97%	0.0
XP003556185.1	Som. Emb. receptor kinase 1-Like [ <i>Glycine max</i> ]	1070	97%	0.0
XP002270847.1	Som. Emb. receptor kinase 1 [ <i>Vitis vinifera</i> ]	1069	96%	0.0

Como puede observarse, la secuencia deducida de aminoácidos ensamblada tiene similitud con las secuencias de otras proteínas SERK1 de diversas especies reportadas en la base de datos NCBI. Los valores del parámetro E, el cual define la probabilidad de identidad entre dos secuencias, son todos igual a cero, lo que significa que efectivamente la secuencia peptídica codifica a la cinasa tipo receptor SERK1 de *Coffea canephora* (CcSERK1).

La secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1 muestra el mayor nivel de similitud con especies de la familia de las solanáceas, mientras que con las cinasas SERK1 de zanahoria (DcSERK, AAB61708) y de Arabidopsis (AtSERK1, CAB42254), tiene un 98% y un 84% de similitud, respectivamente (datos no mostrados). La comparación con las secuencias de zanahoria y Arabidopsis es pertinente porque éstas son cinasas SERK1 cuya expresión y regulación durante la embriogénesis somática ha sido mejor estudiada.

En la Figura 2.10 se analiza los dominios y los residuos conservados presentes en la secuencia de aminoácidos deducida. Se puede observar dominios y residuos característicos de las cinasas tipo receptor de plantas (RLK). Un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular. El dominio extracelular está conformada por una secuencia putativa de péptido señal, posteriormente se localiza una secuencia tipo cierre de leucina (LZ), seguido de las cinco repeticiones ricas en leucinas (LRR), como describe Hech *et al.*, (2001). Posee una región rica en prolina, conteniendo el motivo serina-prolil-prolina (SPP), este motivo es la característica distintiva de las proteínas SERKs y que la distingue de otras proteínas de la familia LRR-RLK (Hech *et al.*, 2001). El dominio transmembranal (TD) está formado por 25 aminoácidos alifáticos y está bordeada por una serie de aminoácidos hidrofílicos. En la región yuxtamembranal (en el dominio extracelular, cerca del dominio transmembranal), se encuentra una treonina (marcada de color verde), cuya posición se desconoce por no contar con la metionina de inicio como referencia. Este residuo de treonina es invariable en las RLK y es absolutamente indispensable para desplegar la actividad de autofosforilación. En el dominio intracelular se localiza el dominio de cinasa, que consta de once sub-dominios característicos del sitio catalítico de las proteínas cinasas de serina/treonina, entre el subdominio VII y VIII se encuentra el Loop crítico de activación de la proteína (letras rojas) (Shah *et al.*, 2001b), y la región C-terminal (marcado en color morado), potencialmente implicados en la interacción proteína a proteína. En el dominio de cinasa se encuentra el motivo conservado basado en Tirosina YXX $\Phi$  (Donde  $\Phi$  representa un aminoácido con una cadena lateral hidrofóbica) YPYM (marcado en rojo), esta secuencia es importante para la endocitosis del receptor, y está presente en los receptores BAK1, BRI1 y EFR (Beck y Robatzek, 2012).



**Figura 2.10** Análisis de la secuencia deducida de aminoácidos de *CcSERK1*. La secuencia deducida de aminoácidos de la proteína *CcSERK1* consta de 630 aa. Los dominios y regiones mostradas se describen en el texto.

A continuación se realizó un alineamiento múltiple con las secuencias reportadas para determinar visualmente la identidad por regiones, lo que cual es mostrado en la Figura 2.11, en donde se observa que al inicio de la secuencia, en donde se localiza el putativo péptido señal, muestra poca similitud con las demás secuencias analizadas, esta región es invariable para todas las proteínas de SERK reportadas. Por ejemplo el péptido señal y el dominio LZ está presente en *AtSERK1* (Hecht *et al.*, 2001), *MtSERK* (Nolan *et al.*, 2003), *ZmSERK1* y *ZmSERK2* (Baudinos *et al.*, 2001), y entre otros, pero no en *DcSERK* (Schmidt *et al.*, 1997). El análisis anterior confirma la clonación de los extremos 5' y 3' del ADNc del gen SERK1 de *Coffea canephora*.

	1-----	SIGNAL	PEPTIDE-----	-----	LUCINE	ZIPPER----		
<i>Coffea canephora</i>	MKLRM	ARVE	GLVSVVLWLI	MVFHPLKLI	ANMEGDALHS	LRVNLQDPNN	VLQSWDPTLV	
<i>Solanum peruvianum</i>	-MVKVMEKDT	VVVS	LVVHHLKLIY	ANMEGDALHS	LRVNLQDPNN	VLQSWDPTLV	VLQSWDPTLV	
<i>Solanum lycopersicum</i>	-MVKVMEKDT	VVVS	LVVHHLKLIY	ANMEGDALHS	LRVNLQDPNN	VLQSWDPTLV	VLQSWDPTLV	
<i>Solanum tuberosum</i>	-MVKVMEKDA	VVVS	LVVHHLKLIY	ANMEGDALHS	LRVNLQDPNN	VLQSWDPTLV	VLQSWDPTLV	
<i>Citrus sinensis</i>	-----MKT	KV	WALCLIL-VV	-----HSS	WLAS	ANMEGDALHS	LRVNLQDPNN	VLQSWDPTLV
<i>Carica papaya</i>	-----MEARV		GAFSLAL-L	FLHPLWLG	ANMEGDALHS	LRVNLQDPNN	VLQSWDPTLV	

	-----	LRR1	-----	LRR2	-----	
<i>Coffea canephora</i>	NPCTWFHVTC	NNDNSVIRVD	LGNAALSGQL	VPQLGLLKNI	QYLELYSNNI	SGPIPSDLGN
<i>Solanum peruvianum</i>	NPCTWFHVTC	NNDNSVIRVD	LGNAALSGLL	VPQLGLLKNI	QYLELYSNNI	SGVIPSDLGN
<i>Solanum lycopersicum</i>	NPCTWFHVTC	NNDNSVIRVD	LGNAALSGLL	VPQLGLLKNI	QYLELYSNNI	SGLIPSDLGN
<i>Solanum tuberosum</i>	NPCTWFHVTC	NNDNSVIRVD	LGNAALSGLL	VPQLGLLKNI	QYLELYSNNI	SGLIPSDLGN
<i>Citrus sinensis</i>	NPCTWFHVTC	NNDNSVIRVD	LGNAALSGQL	VSQGLGLLKNI	QYLELYSNNI	TGPIPSDLGN
<i>Carica papaya</i>	NPCTWFHVTC	NNDNSVIRVD	LGNAALSGQL	VPQLGLLKNI	QYLELYSNNI	SGPIPSDLGN

	-----	LRR3	-----	LRR4	-----	
<i>Coffea canephora</i>	LTNLVSLDLY	LNSFNGPIPD	TLGKLSKLR	LRLNNSLIG	PIPLSLTNIS	SLQVLDLSNN
<i>Solanum peruvianum</i>	LTNLVSLDLY	LNNFVGPIPD	SLGKLSKLR	LRLNNSLIG	NI PMSLTNIS	SLQVLDLSNN
<i>Solanum lycopersicum</i>	LTNLVSLDLY	LNNFVGPIPD	SLGKLSKLR	LRLNNSLIG	NI PMSLTNIS	SLQVLDLSNN
<i>Solanum tuberosum</i>	LTNLVSLDLY	LNNFVGPIPD	SLGKLSKLR	LRLNNSLIG	NI PMSLTNIS	SLQVLDLSNN
<i>Citrus sinensis</i>	LTSLVSLDLY	LNSFTGPIPD	TLGKLSKLR	LRLNNSLIG	PI PMSLTNIS	SLQVLDLSNN
<i>Carica papaya</i>	LTSLVSLDLY	LNSFSGPIPD	SLGKLSKLR	LRLNNSLIG	PI PMSLTNIS	SLQVLDLSNN

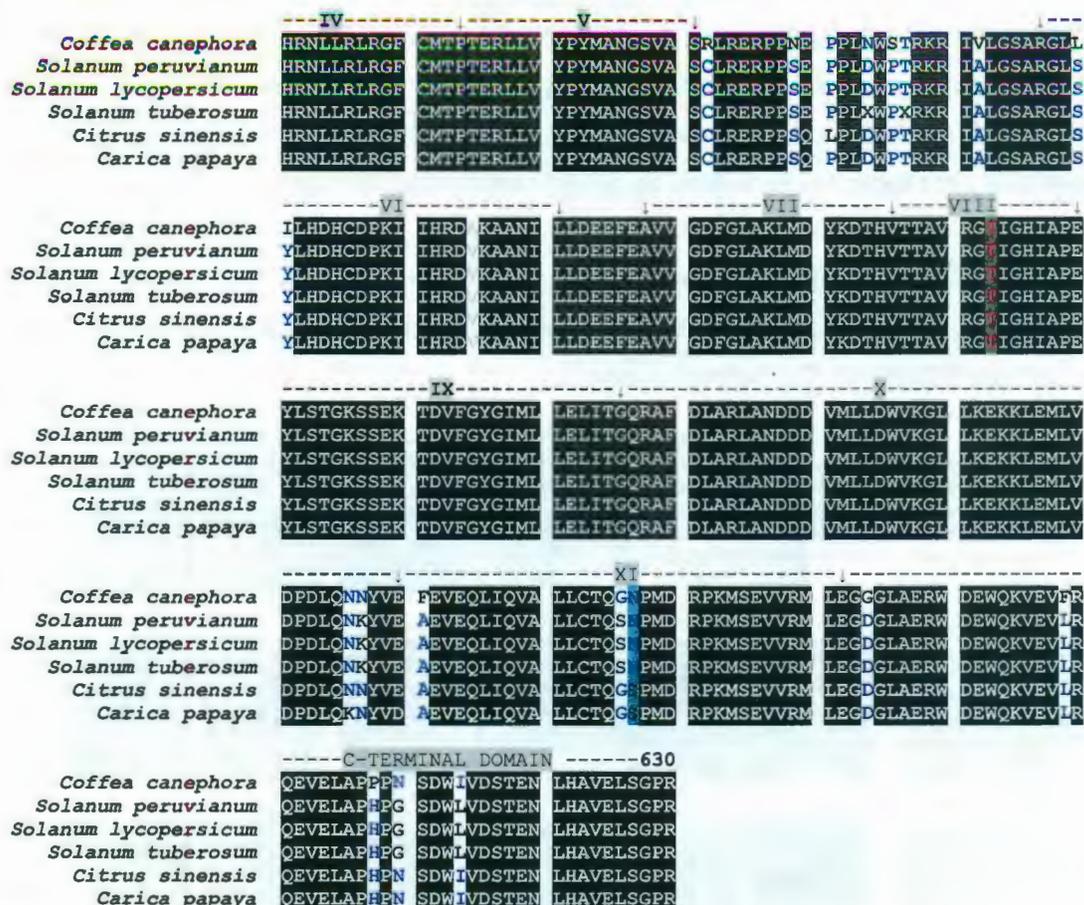
	-----	LRR5	-----	SSP	-----	
<i>Coffea canephora</i>	RLSGAVPDNG	SFSLFTPISE	ANNLDLCPV	TGRPCPGSP	FSPPPPFVPP	PPISAPGGNS
<i>Solanum peruvianum</i>	RLSGAVPDNG	SFSLFTPISE	ANNLDLCPV	TGRPCPGSP	FSPPPPFVPP	PPISAPGGNS
<i>Solanum lycopersicum</i>	RLSGAVPDNG	SFSLFTPISE	ANNLDLCPV	TGRPCPGSP	FSPPPPFVPP	PPISAPGGNS
<i>Solanum tuberosum</i>	RLSGAVPDNG	SFSLFTPISE	ANNLDLCPV	TGRPCPGSP	FSPPPPFVPP	PPISAPGGNS
<i>Citrus sinensis</i>	RLSGAVPDNG	SFSLFTPISE	ANNLDLCPV	TGRPCPGSP	FSPPPPFVPP	PPISAPGGNS
<i>Carica papaya</i>	RLSGAVPDNG	SFSLFTPISE	ANNLDLCPV	TGRPCPGSP	FSPPPPFVPP	PPISAPGGNS

	-----	TRANSMEMBRANE DOMAIN	-----			
<i>Coffea canephora</i>	ATGAIAGGVA	AGAALLFAAP	AIAFAWRRR	KPQEFYFDVP	AEDPEVHLG	QLKRFSLREL
<i>Solanum peruvianum</i>	ATGAIAGGVA	AGAALLFAAP	AIAFAWRRR	KPQEFYFDVP	AEDPEVHLG	QLKRFSLREL
<i>Solanum lycopersicum</i>	ATGAIAGGVA	AGAALLFAAP	AIAFAWRRR	KPQEFYFDVP	AEDPEVHLG	QLKRFSLREL
<i>Solanum tuberosum</i>	ATGAIAGGVA	AGAALLFAAP	AIAFAWRRR	KPQEFYFDVP	AEDPEVHLG	QLKRFSLREL
<i>Citrus sinensis</i>	ATGAIAGGVA	AGAALLFAAP	AIAFAWRRR	KPQEFYFDVP	AEDPEVHLG	QLKRFSLREL
<i>Carica papaya</i>	ATGAIAGGVA	AGAALLFAAP	AIAFAWRRR	KPQEFYFDVP	AEDPEVHLG	QLKRFSLREL

	-----	KINASE I	-----	II	-----	III	-----		
<i>Coffea canephora</i>	QVA	DSFSNK	NILGRGGFGK	VYKGR	LADGS	LVAV	RLKEE	RTPGGELQFQ	TEVEMISMAV
<i>Solanum peruvianum</i>	QVA	DSFSNK	NILGRGGFGK	VYKGR	LADGS	LVAV	RLKEE	RTPGGELQFQ	TEVEMISMAV
<i>Solanum lycopersicum</i>	QVA	DSFSNK	NILGRGGFGK	VYKGR	LADGS	LVAV	RLKEE	RTPGGELQFQ	TEVEMISMAV
<i>Solanum tuberosum</i>	QVA	DSFSNK	NILGRGGFGK	VYKGR	LADGS	LVAV	RLKEE	RTPGGELQFQ	TEVEMISMAV
<i>Citrus sinensis</i>	QVA	DSFSNK	NILGRGGFGK	VYKGR	LADGS	LVAV	RLKEE	RTPGGELQFQ	TEVEMISMAV
<i>Carica papaya</i>	QVA	DSFSNK	NILGRGGFGK	VYKGR	LADGT	LVAV	RLKEE	RTPGGELQFQ	TEVEMISMAV



**Figura 2.11** Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1 con secuencias reportadas. La secuencia deducida de aminoácidos de la clona CcSERK1 fue alineada con cinco secuencias de SERKs de otras plantas con las que tienen mayor nivel de identidad.

### 2.3.4 Análisis filogenético

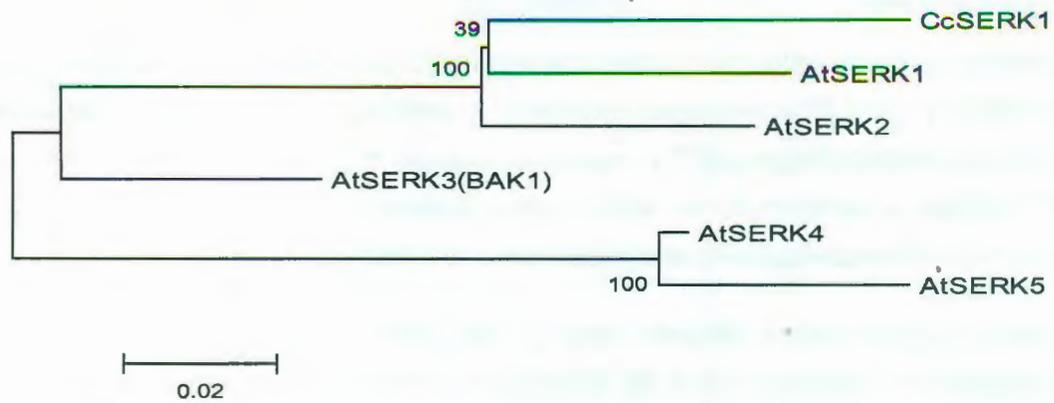
Como una forma de confirmar que el ADNc aislado corresponde efectivamente al ortólogo de *Coffea canephora* del gen SERK1, se utilizó la secuencia deducida de aminoácidos de la proteína putativa de CcSERK1 para analizar su relación filogenética con otras proteínas reportadas en las bases de datos; específicamente, se hizo referencia al trabajo reportado por Yin *et al.*, (2002), quienes hicieron un análisis filogenético de las 222 cinasas tipo receptor con repeticiones ricas en leucinas (LRR-RLKs) codificadas en el genoma de *Arabidopsis thaliana* (Ver Figura 2.12).

Como fundamento para realizar esta comparación se consideró lo siguiente:

Primero, el análisis BLAST en donde se comparó la secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1 con todas las secuencias de plantas reportadas en la literatura, reveló que esta secuencia es similar a la secuencia de proteínas SERK1 de diferentes especies, teniendo como ya se mostró la mayor similitud con proteínas SERK1 de la familia de las solanáceas. Segundo, cuando de los datos del análisis BLAST se especificaron las secuencias de *Arabidopsis thaliana*, el resultado mostró que nuestra secuencia tiene, en orden descendente, mayor similitud con las secuencias de SERK1, SERK2, SERK3, SERK4 y SERK5; es decir, con relación a *Arabidopsis*, nuestra secuencia tiene mayor similitud con todas las proteínas de la familia SERK.

Por otro lado, el análisis filogenético de las LRR-RLK de *Arabidopsis* muestra claramente que las proteínas SERK forman un clado separado claramente de otras RLK cuya función es bien conocida, como BRI1, ERECTA, FLS2, HAESA y CLAVATA1 (Figura 2.12). De esta manera, al realizar el mismo análisis ejecutado por Yin *et al.*, (2002) pero comparando únicamente nuestra secuencia con la secuencia de las cinco proteínas SERK de *Arabidopsis*, el resultado nos muestra que CcSERK1 está más relacionada filogenéticamente con la proteína AtSERK1, y en orden descendente con AtSERK2, AtSERK3, AtSERK4 y AtSERK5, respectivamente (Figura 2.13). Este resultado apoya nuestra propuesta de que la secuencia del ADNc clonado en este trabajo efectivamente corresponde al ortólogo en *Coffea canephora* del gen SERK1 de plantas.





**Figura 2.13** Análisis filogenético de CcSERK1 y SERKs de *Arabidopsis thaliana*. El árbol sin raíz fue construido con el programa MEGA 5, se empleó el método "Neighbour joining" con 1000 réplicas. Se utilizó el dominio de cinasa de CcSERK1 para el análisis. El número de accession de SERKs de *Arabidopsis thaliana*; AtSERK1 (AAK82463), AtSERK2 (AAK68073), AtSERK3 (BAK1, AAK68074), AtSERK4 (NP\_178999.2) and AtSERK5 (NP\_179000).

## 2.4 DISCUSIÓN

Siguiendo los fundamentos de un protocolo tipo RACE para la obtención completa de los extremos 5' y 3' del ARN mensajero de interés, a partir de una secuencia parcial se aisló de manera directa el fragmento 3' y, realizando algunas modificaciones en los ensayos de PCR, también el extremo 5' del ADNc correspondiente al gen *CcSERK1*. Los clones positivos fueron secuenciados y analizados para confirmar su identidad.

El análisis bioinformático demostró que las dos secuencias obtenidas efectivamente correspondían al extremo 3' y 5' del transcrito de interés, conteniendo sus respectivas regiones no traducibles (UTR), el codón de inicio, el marco de lectura completo de 1,890 bases, el codón de terminación, así como la cola de poli-A. La secuencia nucleotídica presenta la localización de los posibles sitios de poliadenilación, lo cual permitiría que el transcrito se poliadenile y se traduzca en las células eucariotas.

Hay que señalar que la secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo presentó algunas cambios puntuales con respecto a la secuencia previamente reportada en nuestro laboratorio (Villanueva-Alonzo, 2006), y de la cual se partió para obtener los extremos 5' y 3' no traducibles. Estos cambios pueden deberse a errores en la secuenciación, a artefactos causados por la Taq polimerasa durante la amplificación por PCR, o a que ambas secuencias efectivamente son diferentes. Lo anterior se justifica por el hecho de que la diferencia en ambas secuencias solo conllevó al cambio de la secuencia nucleotídica pero no del aminoácido codificado, lo cual se pudo corroborar al ser analizados con otras secuencias de *SERK1* reportadas en *NCBI*. El hecho de que los cambios encontrados en las secuencias nucleotídicas correspondan a "mutaciones" silenciosas, no puede descartarse que a pesar de ser estrictamente diferentes, ambas secuencias pudieran ser verdaderas y corresponder a variantes de diferentes ecotipos o a mutaciones generadas por el estrés producido por el cultivo de tejidos *in vitro*.

La longitud completa del ADNc de *CcSERK1* es de 2,548 pb y codifica una proteína de 630 aminoácidos. La estructura predicha consta de todos los dominios característicos de la cinasa tipo receptor de la ES 1, incluyendo un motivo SSP, que es una característica distintiva de las proteínas *SERK*. Se ha sugerido que este motivo actúa como bisagra que proporciona flexibilidad a la parte extracelular del receptor o como una región de

interacción con la pared celular (Schmidt *et al.*, 1997; Hecht *et al.*, 2001).

La presencia del motivo Arg-Asp (RD) en el subdominio VI del sitio catalítico y el motivo conservado DFG en el subdominio VII indica que *CcSERK1* pertenece a la cinasas de la clase RD, similar a otras proteínas SERK (Johnson *et al.*, 1996).

La comparación del dominio de cinasa de *CcSERK1* con el subdominio que se encuentra en *AtSERK1* reveló que el bucle crítico de activación, que comprende un tramo corto de residuos de aminoácidos entre los dominios de cinasa VII y VIII está conservado, en particular la T473 (que en *AtSERK1* es T468). Se ha demostrado que al sustituir esta treonina por una alanina o por ácido glutámico se elimina la capacidad de la proteína *AtSERK1* de ser fosforilada y se inhibe la actividad catalítica de la cinasa, empleando como sustrato a la proteína básica de mielina, por lo que se sugiere que la T468 es esencial para la señalización mediada por *AtSERK1* (Shah *et al.*, 2001b).

El residuo de lisina 335 (K335, que en *AtSERK1* es K330) que es indispensable para la actividad de cinasa (Shah *et al.*, 2001b), también se conserva en *CcSERK1*. La treonina 304 en la región yuxtamembranal se conserva, este residuo es indispensable para desplegar la actividad de autofosforilación (Shah *et al.*, 2001b). Estos datos sugieren que el ADNc de *CcSERK1* codifica una cinasa potencialmente activable, lo cual deberá comprobarse en el laboratorio.

El alineamiento de las secuencias de nucleótidos y deducida de aminoácidos mostró un alto nivel de similitud e identidad con ortólogos de SERK1 reportados en la literatura, en especial con los de la familia de las solanáceas; esto es congruente con el análisis realizado por Lin *et al.*, (2005), quienes compararon la base de datos de EST de café con secuencias de solanáceas (tomate, papa, pimiento, berenjena y petunia (<http://www.sgn.cornell.edu/>)), encontrando que el jitomate tiene una estrecha similitud de secuencias, gen por gen, con café. Por tanto, no es sorprendente que la secuencia de SERK1 de *coffea canephora* tenga una alta identidad con SERKs pertenecientes a las solanáceas.

El hecho de que se ha reportado que genes como *SpSERK* (ABR18800.1), *CitSERK1-like* (ACP20180.1), *VvSERK1* (XP003556185.1) y *GmSERK1* (XP002270847.1) presenten un patrón de expresión durante la ES, así como el hecho de que *CcSERK1* se clonó a partir de explantes foliares inducidos a la embriogénesis somática, sugieren que *CcSERK1* podría tener una función en el desarrollo embrionario.

La relación filogenética de la proteína putativa de *CcSERK1* muestra que se agrupa con *SERK1* de *Arabidopsis thaliana*, lo que corrobora que la secuencia aislada en este trabajo puede tratarse del ortólogo de café de la una cinasa tipo receptor de la embriogénesis somática, que ha sido descrita en otras especies.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Beck M., and S. Robatzek (2012). Receptor Trafficking in Plants. In: Tax F., and Kemmerling B. (eds.), *Receptor-like Kinases in Plants, Signaling and Communication in Plants* 13. pp 253-274.
- Chomczynski, P., & N. Sacchi (1990). Single-step RNA isolation from cultured cells or tissues. In: *Current protocols in molecular biology*. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith & K. Struhl (eds.) New York: Greene and Wiley-Interscience, pp. 4.2.4-4.2.8.
- Chase, M. W., D. E. Soltis *et al.*, (1993). Phylogenetics of seed plants an analysis of nucleotide-sequences from the plastid gene *rbcl*. *Ann Mo Bot Gard* 80:528–580.
- Crepet, W. L., K.C. Nixon, M. A. Gandolfo (2004). Fossil evidence and phylogeny: the age of major angiosperm clades based on mesofossil and macrofossil evidence from cretaceous deposits. *Am J Bot* 91:1666-1682
- Doughty, J., S. Dixon, S. J. Hiscock, A. C. Willis, I. A. P. Parkin, H. G. Dickinson (1998). PCP-A1, a defensin-like *Brassica* pollen coat protein that binds the S locus glycoprotein, is the product of gametophytic gene expression. *Plant Cell*, 10:1333-1347
- Hink, M. A., K. Shah, E. Russinova, S. C. de Vries, A. J. W. G. Visser (2008). Fluorescence Fluctuation Analysis of *Arabidopsis thaliana* Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase and Brassinosteroid Insensitive 1 Receptor Oligomerization. *Biophysical Journal*, 94:1052-1062
- Gandolfo, M. A., K. C. Nixon, W. L. Crepet (1998). A new fossil flower from the Turonian of New Jersey: *Dressiantha bicarpellata* gen. et sp. nov. (Capparales). *Am J Bot* 85:964-974
- Jeong, S., A. E. Trotochaud, S. E. Clark (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encodes a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *Plant Cell*, 11:1925-1934

- 
- Johnson, L. N., M. E. M. Noble, and D. J. Owen (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85, 149-158.
- Karlova, R., S. Boeren, E. Russinova, J. Aker, J. Vervoort, and S. C. de Vries (2006). The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *Plant Cell*, 18:626-638.
- Karlova, R., S. Boeren, W. van Dongen, M. A. C. J. Kwaaitaal, J. Aker, J. Vervoort, and S. C. de Vries (2009) Identification of in vitro phosphorylation sites in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinases. *Proteomics*, 9:368-379.
- Kwaaitaal, M. A. C. J., S. C. de Vries, E. Russinova (2005). *Arabidopsis thaliana* Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. *Protoplasma*, 226:55-65.
- Lin, C., L. A. Mueller, Mc. J. Carthy, D. Cruzillat, V. Pétiard, S. D. Tanksley (2005). Coffee and tomato share common gene repertoires as revealed by deep sequencing of seed and cherry transcripts. *Theor Appl Genet.* 112(1):114-30.
- Nei, M. & S. Kumar. 2000. Molecular evolution and phylogenetics. Oxford, Oxford, Inglaterra.
- Mondego, J. M., R.O. Vidal, M. F. Carazzolle, E.K. Tokuda, L. P. Parizzi, G.G. Costa, L. F. Pereira, A.C. Andrade, C. A Colombo, L. G.Vieira, G. A Pereira (2011). An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biology*;11:30
- Quiroz-Figueroa, F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera and V. M. Loyola-Vargas (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.*, 20:1141-1149.
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2006). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant tissue culture protocols 2nd edition*, vol. 318, V. M. Loyola Vargas y F. Vázquez-Flota (Eds.), Humana Press, Totowa, NJ, EEUU, pp. 111- 117.

- 
- Russinova, E., J.W. Borst, M. Kwaaitaal, A. Caño-Delgado, Y. Yin, J. Chory, S. C. de Vries (2004). Heterodimerization and endocytosis of *Arabidopsis* brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell*, 16:3216-3229
- Salaj J., I. R. von Recklinghausen, V. Hecht , S. C. de Vries, J. H. Schel, A. A. van Lammeren (2008). AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol · Biochem.*, 46(7):709-14.
- Shah, H., T. W. J. Gadella, H. van Erp, V. Hecht, S. C. de Vries (2001a). Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. *Journal of Molecular Biology*, 309: 641-655
- Shah, K., J. Vervoort, and S. C. de Vries (2001b) Role of threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 276:41263-41269.
- Schaller, G. E., A. N. Ladd, M. B. Lanahan, J. M. Spanbauer, A.B Bleecker (1995). The Ethylene Response Mediator Etr1 from *Arabidopsis* Forms a Disulfide-Linked Dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 270: 12526-12530
- Schmidt, E. D., F. Guzzo, M. A. Toonen, S. C. de Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development.*, 124: 2049-2062.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei & S. Kumar (2011). MEGA 5. Molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2 731-2 739.
- Torii, K. U. (2004). Leucine-rich repeat receptor kinases in plants: structure, function, and signal transduction pathways. *International Review of Cytology*;234:1-46
- Yin, Y., D. Wu and J. Chory (2002). Plant receptor kinases: Systemin receptor identified. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 9090–9092.



---

## CAPÍTULO III

### AISLAMIENTO DEL ADNc COMPLETO DE SERK1 DE *Coffea canephora* L.

#### 3.1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años, genes ortólogos a DcSERK1 (Smith *et al.*, 1997) han sido aislados y caracterizados molecularmente en diferentes especies, con la finalidad de brindar información valiosa sobre la relación que existe entre su expresión génica y la competencia embriogénica. De los cinco miembros que se han identificado *Arabidopsis* (AtSERKs 1-5) (Shah *et al.*, 2001)), solo AtSERK1 (locus At1g71830) tiene función en la ES (Hecht *et al.*, 2001) y AtSERK5 no es funcional (He *et al.*, 2007).

En estudios realizados con AtSERK1 se sabe que varios asociados corriente abajo interactúan con el dominio de cinasa de SERK1. La cinasa asociada a proteína fosfatasa (KAPP), la AAA-ATPasa del ciclo de división celular (CDC) 48 y la proteína 14-3-3 GF14λ (Shah *et al.*, 2002; Rienties *et al.*, 2005). SERK1 y KAPP se unen de una manera dependiente de la fosforilación y KAAP desfosforila a SERK1 y posiblemente regula negativamente la señalización SERK1 (Shah *et al.*, 2002). La Co-expresión KAPP y SERK1 con etiquetas fluorescentes en protoplastos dieron lugar a la internalización de las dos proteínas, esto sugirió que la función KAPP está vinculada a la inactivación del receptor SERK1 por la desfosforilación y la internalización y la posible degradación en la vacuola (Shah *et al.*, 2002).

Un hallazgo muy interesante fue el encontrar que AtSERK1 forma complejo con dos factores de transcripción, *AGAMOUS-Like 15 (AGL15)* y una proteína dedo de Zing perteneciente a la familia *CONSTANS (CO)*, sugiriendo en general una cascada de traducción de señales enlazada a receptor de membrana a factores de transcripción como *AGL15* (Karlova *et al.*, 2008). Sin embargo surge la pregunta ¿AtSERK1 y *AGL15* pueden estar involucrado en la misma vía de señalización?. Aunque *Arabidopsis* ha servido como modelo para aclarar partes de vía de señalización de SERK1, todavía es de gran relevancia que el posible ligando y los sustratos citosólicos de la proteína tipo cinasa SERK1, deben ser aclarados con el fin de definir su papel exacto en la embriogénesis (Feher *et al.*, 2003).

En este estudio utilizando el modelo de ES de *Coffea canephora* se obtuvo la secuencia de nucleótidos de los extremos 3' y 5' del ADNc del transcrito de CcSERK1, sin embargo para estudios de funcionalidad de la proteína u otros tipos de análisis posteriores en este modelo se requiere tener la secuencia completa del ADNc del transcrito.

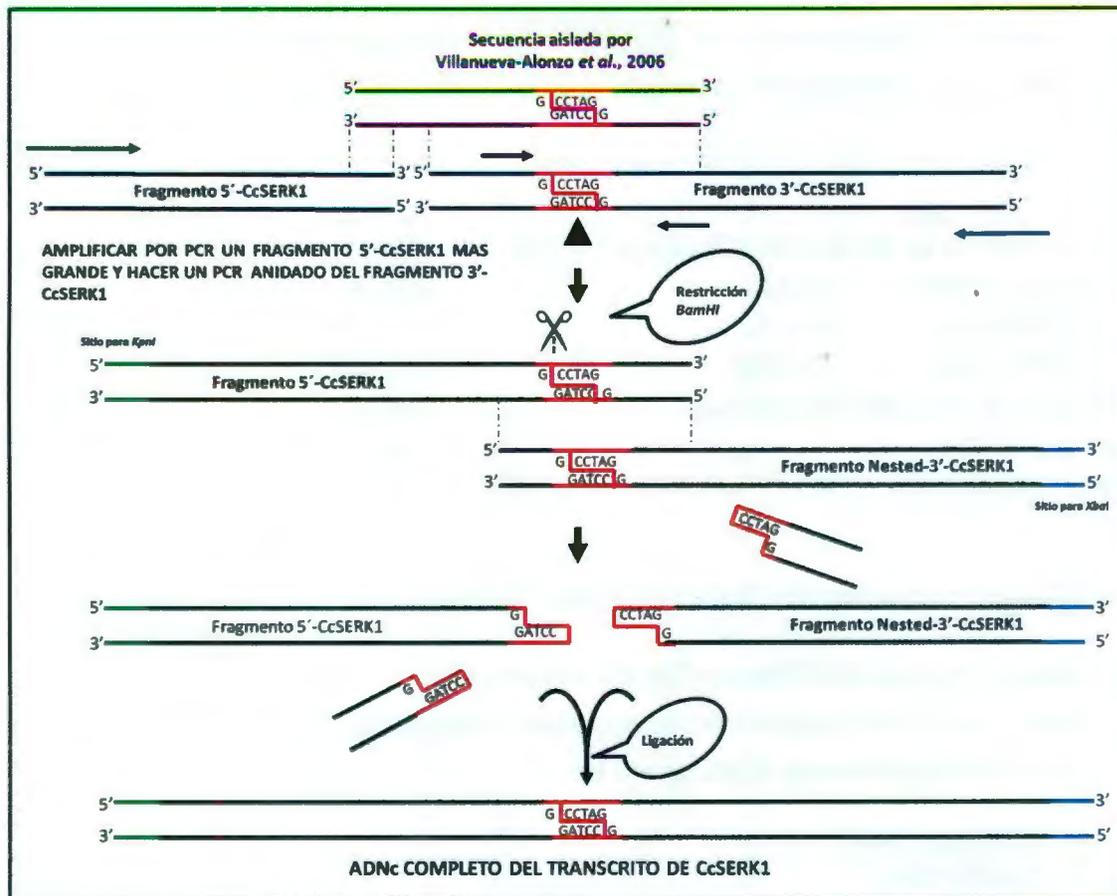
## **3.2 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.2.1 Material biológico**

Se utilizó el ARN total aislado en la sección 2.3.1.2.1

### **3.2.2 Metodología**

La estrategia para generar por RT-PCR y PCR la secuencia completa del ADNc de CcSERK1 utilizando cebadores específicos diseñados de extremo a extremo de la secuencia de nucleótidos, no fue exitosa. Por ello, se utilizó otra estrategia, la cual consistió en analizar la secuencia de nucleótidos para buscar un sitio de restricción que se encontrara en ambas secuencias 3' y 5'. De esta manera, mediante una digestión de ambos extremos con la enzima de restricción seleccionada, se ligarían los extremos cohesivos, generando la secuencia completa del ADNc (Ver esquema de la Figura 3.1).



**Figura 3.1** Representación esquemática de la estrategia utilizada para obtener la secuencia completa del ADNc de CcSERK1. Flechas negras: indica los cebadores específicos; cabeza de flecha: indica el sitio de corte de la enzima BamHI; Línea verde: indica sitio de corte para la enzima KpnI; Línea azul: indica sitio de corte para la enzima XbaI. En el texto se explica el procedimiento.

### 3.2.2.1 Amplificación por PCR con cebadores específicos del fragmento 5'-CcSERK1

Se utilizó la síntesis de primera cadena de ADNc de SERK1, la cual fue sintetizada utilizando las mismas condiciones empleadas en la sección 2.3.1.2.1.

Para realizar la amplificación por PCR con cebadores específicos del fragmento 5'-CcSERK1, se utilizó el siguiente protocolo:

1. Mezclar en un tubo para PCR, lo siguiente:

Amortiguador 10X*	1.0 $\mu$ L
Primera cadena de ADNc 5'-RACE (dilución 1/75)	0.3 $\mu$ L
CebKpnI CcSERK1-For (5 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
qCcSERK1-Rev (5 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ L
50X dNTP's mix (10 mM)	0.2 $\mu$ L
50X Titanium Taq DNA Polimerasa**	0.2 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O grado PCR	X $\mu$ L
Volumen final	10 $\mu$ L

\*Se utilizó el amortiguador de 10X Advantage 2 PCR buffer

\*\*Se utilizó el sistema 50X Titanium Taq RT Enzyme Mix

2. Programar el termociclador con las siguientes condiciones:

Par amplificar fragmentos de ADNc de < 5 kb.

- 95°C por 1 min
- 25-35 ciclos
- 95 °C por 30 seg
- 68 °C por 1-3 min
- 68 °C por 3 min

### 3.2.2.2 Reacción de digestión mediante enzimas de restricción

Las condiciones de la cada reacción restricción se realizaron de acuerdo a las especificaciones de cada compañía. ApaI y BamHI (Invitrogen), KpnI (FastDigest: Thermo Scientific), XbaI (New England).

### 3.2.2.3 Purificación por cromatografía de exclusión molecular (con columnas Quantum prep PCR Kleen Spin)

La purificación de las reacciones generadas a partir de las restricciones se realizó siguiendo el protocolo descrito a continuación:

1. Resuspender la resina de la columna dando vórtex aproximadamente 5 seg.
2. Retirar la tapa de la punta y coleccionar en un tubo de 2.0 ml estéril.
3. Pre-girar la columna durante un minuto a 753 x g.
4. Colocar la columna en un tubo limpio de 1.5 ml
5. Adicionar la muestra (25-100  $\mu$ L) al centro de la parte superior de la columna (no perturbar la resina).
6. Dar spin a la columna a 753 x g por 2 min y retirar la columna.
7. Utilizar la muestra coleccionada en el fondo del tubo.

#### 3.2.2.4 Ligación de los fragmento 3' y 5'-CcSERK1 con ADN ligasa

Los fragmentos 3' y 5'-CcSERK1 previamente digerido se ligaron utilizando una relación molar 1:1 de los fragmentos de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Mezclar en un tubo nuevo los siguientes componentes:

Fragmento de ADN 3'-CcSERK1 (100 ng)	x $\mu$ L
Fragmento de ADN 5'-CcSERK1 (100 ng)	x $\mu$ L
Amortiguador de ligasa (Promega)	5 $\mu$ L
T4 ADN Ligasa (1 U) (Promega)	1 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	x $\mu$ L
Volumen final	10 $\mu$ L

Mezclar e incubar la reacción de ligación a: temperatura ambiente por 3 h, o a 4 °C toda la noche, o a 15 °C por 4-18 h.

---

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Obtención del ADN completo correspondiente al gen CcSERK1

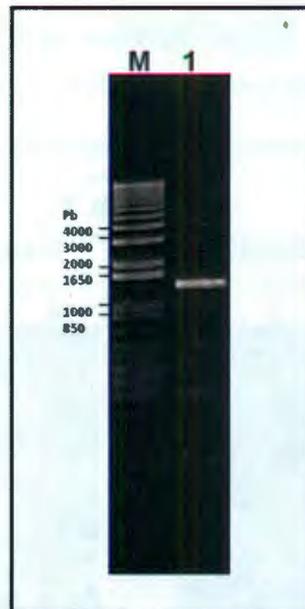
Mediante un análisis *in silico* se encontró un sitio de restricción único para la enzima BamHI en la región correspondiente a la secuencia 3'-CcSERK; sin embargo, esta región no traslapaba con la secuencia 5'-CcSERK, ya que ésta solo traslapa con la secuencia aislada por Villanueva-Alonzo, 2006 (Figura 3.1, materiales y métodos).

Para conseguir el traslape de las secuencias 3' y 5', se amplificó un fragmento 5'-CcSERK1 más grande, empleando cebadores específicos que alinean con el extremo 5' con una región corriente abajo del sitio de restricción para la enzima BamHI (la combinación de cebadores (CebKpnI-CcSERK1-For y qSERK1-Rev), así como una ADN polimerasa de alta fidelidad (Titanium taq DNA polimerasa, Clontech).

En la Figura 3.2 se muestra el fragmento amplificado por PCR, el cual presenta el tamaño esperado de 1,401 pb. Este fragmento, que además contiene una secuencia para la enzima KpnI en su extremo 3', se clonó en un vector para productos de PCR (pGEM-T Easy, Promega).

El sitio de restricción para la enzima BamHI en el fragmento 3'-CcSERK1 (de 1,633 pb) se localiza en el sitio 1,253, por lo que la digestión enzimática libera el fragmento de interés y un fragmento no deseado de 380 pb. Debido a que no hemos podido ligar fragmentos aislados de geles de agarosa, decidimos aislarlos por cromatografía de exclusión molecular, empleando columnas comerciales para purificación de productos de PCR (Quantum prep PCR Kleen Spin Columns, BIORAD), que pueden eliminar fragmentos de ADN de hasta 200 pb. El fragmento no deseado tiene más de 200 pb, por lo que la alternativa fue generar un producto de PCR de menor tamaño, empleando cebadores anidados y como molde el fragmento de 1,633 pb.

En estas condiciones, el producto del PCR anidado es de 1,480 pb, que al ser digerido con la enzima BamHI libera un pequeño fragmento de 227 pb, que se encuentra en el rango de la capacidad de la columna.



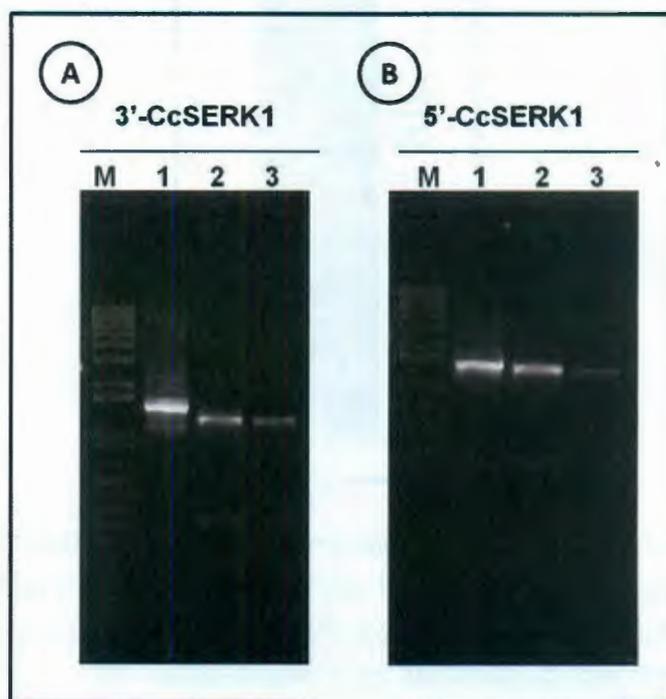
**Figura 3.2** Amplificación por PCR de un fragmento más grande de 5'-CcSERK. Una alícuota de la reacción de PCR fue fraccionada en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. Carril 1: Amplificación por PCR con cebadores específicos de un fragmento más grande (1, 401 pb) de 5'-CcSERK1; M: Escalera de ADN de 1 Kb.

En el caso del extremo 5', la digestión con BamHI libera, además del fragmento de interés, un fragmento no deseado de 100 pb, el cual puede eliminarse con las columnas para purificación de productos de PCR arriba mencionadas.

Para el proceso de producción del ADNc completo de CcSERK1, se digirieron los extremos 3' y 5' con BamHI y los productos se pasaron por las columnas de exclusión molecular. En la Figura 3.3 A y B se observa los productos de digestión de cada extremo y la purificación de los mismos por las columnas.

Como puede observarse, la digestión de de ambos extremos libera fragmentos de ~200 y 100 pb, respectivamente (Carriles 2A y 2B), mismos que fueron eliminados (carril 3B) o disminuidos sustancialmente (carril 3A) después del fraccionamiento cromatográfico.

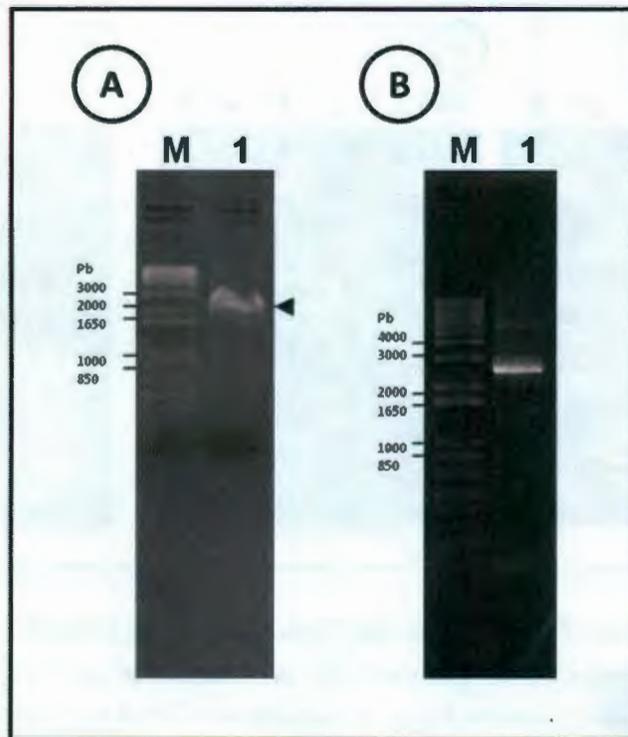
Los eluatos del fraccionamiento fueron utilizados para ligar los extremos 3' y 5' que contenía un extremo cohesivo para la enzima BamHI.



**Figura 3.3** Digestión de los productos de PCR 3' y 5'-CcSERK1 con la enzima BamHI. Una alícuota de cada reacción fue fraccionada en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio A: Carril 1: Producto del PCR anidado 3'-CcSERK1 de 1,480 pb; Carril 2: Productos de la digestión del producto del PCR anidado 3'-CcSERK1 con BamHI; Carril 3: Producto después de la purificación por columnas. B: Carril 1: Producto del PCR 5'-CcSERK1 de 1,401 pb; Carril 2: Productos de la digestión del fragmento 5'-CcSERK1 con BamHI; Carril 3: Producto después de la purificación por columnas. M: Escalera de ADN de 1 Kb.

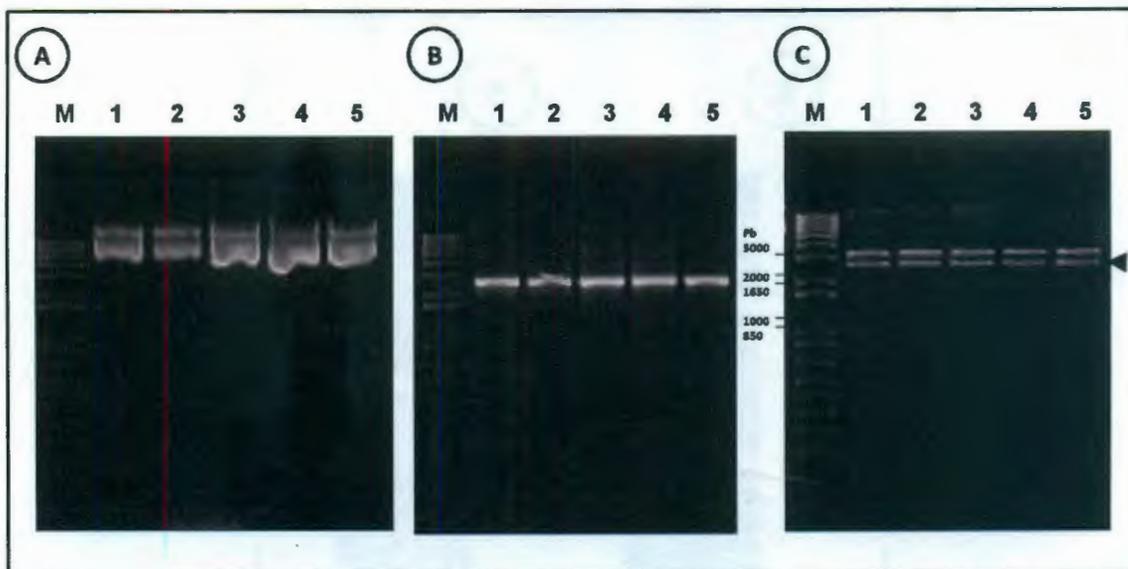
Analizando las cantidades relativas de cada eluato, se usó una relación 1:1 de cada eluato para realizar una ligación directa usando la ADN Ligasa T4. En la Figura 3.4, carril 1A, se muestran los productos después de la ligación, mediante su fraccionamiento electroforético. En el gel se puede observar un solo producto de la ligación, que migra entre los marcadores de 2,000 y 3,000 pb, lo cual coincide con el tamaño esperado de 2,548 pb.

Como una manera para corroborar la identidad de este producto, éste fue utilizado como templado para hacer una amplificación por PCR empleando cebadores específicos de los extremos 3' y 5'. Como puede observarse en la Figura 3.4, carril 1B, se logró amplificar un producto mayoritario del tamaño esperado, lo cual confirma que éste producto corresponde al ADNc completo del gen CcSERK1. Es importante mencionar que los cebadores de cada extremo contienen de manera adicional sitios de restricción para las enzimas KpnI (extremo 5') y XbaI (extremo 3').



**Figura 3.4** Ligación de los fragmentos 3' y 5'-CcSERK1 y amplificación por PCR con cebadores específicos a partir de la ligación. Una alícuota de cada reacción fue fraccionada en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. A: Carril 1: Producto de la ligación de los dos fragmentos; B: Carril 1: Producto de la amplificación por PCR con cebadores específicos utilizando como templado un volumen de la ligación. M: Escalera de ADN de 1 Kb.

El producto de PCR observado en el carril 1B de la Figura 3.4 se ligó directamente en el vector pGEM-T Easy y con los productos de la ligación se transformaron bacterias de la cepa DH5 $\alpha$ , obteniéndose múltiples colonias. Estas colonias fueron inspeccionadas a través de la liberación del inserto por digestión enzimática y por amplificación específica por PCR.



**Figura 3.5** Corroboración de la clonación del ADNc completo de CcSERK1. En todos los casos, una alícuota de cada producto fue fraccionada por electroforesis en gel nativo de agarosa al 1% y teñida con  $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de bromuro de etidio. A: Extracción de ADN plasmídico. Los carriles 1 al 5 muestran los productos de mini-preparaciones plasmídicas de cinco colonias diferentes; B: Verificación de identidad por PCR. Productos de PCR empleando cebadores específicos de los extremos 3' y 5' del ADNc completo, empleando como molde los plásmidos mostrados en A; Liberación del inserto mediante enzimas de restricción: se muestra los productos de una doble digestión con KpnI y XbaI, empleando como molde los plásmidos mostrados en A; M: Escalera de ADN de 1 Kb.

El resultado de la amplificación por PCR dio como resultado que solo cinco de ellas fueron positivas, conteniendo el fragmento completo de CcSERK1 de 2,548 pb (Figura 3.5B). La doble digestión con las enzimas KpnI y XbaI, cuyas secuencias fueron adicionadas en cada extremo mediante adaptadores presentes en los cebadores específicos, demostró la generación de dos fragmentos, uno de 3,000 pb, correspondiente al vector, y uno de 2,548 pb, correspondiente al inserto (Figura 3.5C).

El análisis por PCR y digestión enzimática de las clonas positivas indica que el ADN completo correspondiente al gen SERK1 de *Coffea canephora* se encuentra clonado en el vector de clonación pGEM-T Easy entre dos sitios EcoRI, pero contiene un sitio para la enzima KpnI en el extremo 5' y un sitio para la enzima XbaI en el extremo 3', por lo que puede ser subclonado direccionalmente a otros vectores que sean compatibles con estas enzimas.

### 3.4 DISCUSIÓN

La intención original de amplificar el ADNc completo utilizando cebadores específicos diseñados a partir de las secuencias obtenidas, así como un molde de ARN total o ADNc de cadena sencilla, y realizar una serie de amplificaciones, bajo diferentes condiciones dio resultados negativos. Esto pudo deberse al alineamiento de los cebadores, ya que se diseñaron hacia las regiones 3' y 5'-UTRs de la secuencia de nucleótidos, hay que mencionar que las condiciones necesarias para obtener una síntesis completa de ADNc son difíciles de alcanzar, especialmente para los transcritos largos ya que en la mayoría de los ARNs mensajeros la reacción no progresa hasta el extremo 5' del mismo. Por otro lado el diseño de cebadores hacia la región 3'-UTR no es recomendable ya que ésta se encuentra sujeta a mayor variabilidad interespecífica. Sin embargo, para estudios posteriores era necesario clonar completo el ADNc del transcrito de *CcSERK1*, en donde se encuentran regiones regulatorias. Se sabe que las regiones UTRs juegan un papel crucial en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, incluyendo la modulación del transporte del ARNm fuera del núcleo y de la eficacia de la traducción (van der Velden y Thomas, 1999), la localización subcelular (Jansen, 2001) y la estabilidad del mismo (Bashirullah *et al.*, 2001).

La estrategia experimental que consistió en analizar las dos secuencias clonadas y buscar un sitio para una enzima de restricción que estuviera presente en una región de traslape permitió digerir y ligar los dos fragmentos; de esa manera se pudo clonar la secuencia completa del ADNc correspondiente al gen *CcSERK1*.

Debe señalarse que la secuencia clonada cuenta con sitios introducidos para las enzimas de restricción KpnI y XbaI en los extremos 5' y 3', respectivamente, lo cual permitirá su subclonación direccional en vectores de expresión.

---

**BIBLIOGRAFÍA**

- Bashirullah A, R. L. Cooperstock, H. D. Lipshitz (2001). Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98:7025-7028.
- Fehér, A., T. P. Pasternak y D. Dudits (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant cell tissue and organ culture*. 74: 201-228.
- He, K., X. Gou, T. Yuan, H. Lin, T. Asami, S. Yoshida, S. D. Russell, and J. Li (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Curr Biol* 17:1109-1115.
- Jansen R.P. (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2:247-256.
- Karlova, R., S. Boeren, E. Russinova, J. Aker, J. Vervoort, and S. C. de Vries (2006). The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *Plant Cell*, 18: 626-638.
- Rienties, I. M., J. Vink, J. W. Borst, E. Russinova, and S. C. de Vries (2005). The *Arabidopsis* SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14lambda and the PP2C phosphatase KAPP. *Planta* 221: 394-405.
- Shah, K., J. Vervoort, and S. C. de Vries (2001). Role of threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 276: 41263-41269.
- Shah, K., E. Russinova, T. W. Gadella, J. Willemse, and S. C. de Vries (2002). The *Arabidopsis* kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes Dev* 16: 1707-1720.
- Schmidt, E. D., F. Guzzo, M. A. Toonen, S. C. de Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development.*, 124: 2049-2062.

Van der Velden A. W., A. A. Thomas (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int J Biochem Cell Biol*, 31:87-106.

## CAPÍTULO IV

### CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

#### 4.1 CONCLUSIONES

La implementación del protocolo experimental propuesto permitió cumplir el objetivo general y los objetivos específicos, que eran aislar los extremos 3' y 5', así como insertar la secuencia de ADNc completa del gen *CcSERK1* en un vector de clonación.

De esta manera, se obtuvo el marco de lectura completo de *CcSERK1*, a partir de la secuencia parcial aislada por Villanueva-Alonzo, (2006). Las secuencias de nucleótidos y deducida de aminoácidos del ADNc de *CcSERK1* presentan un alto nivel de similitud con las respectivas secuencias de otros ADNc pertenecientes a miembros de la familia de las solanáceas.

Específicamente, la secuencia deducida de aminoácidos presenta todos los dominios que caracterizan a la proteína SERK1 de todas las estudiadas. Esto representa una útil herramienta que puede permitir la realización de estudios relacionados con la actividad catalítica, la función biológica, la ubicación tisular y subcelular de la proteína, entre otras actividades.

Por ejemplo, el ADNc puede expresarse *in vitro* y evaluarse su actividad autocatalítica, que es característica de esta proteína. Además, la proteína producida *in vitro* puede ser utilizada para generar anticuerpos policlonales, mismos que permitirían desarrollar estudios de biología celular.

El ADNc completo puede subclonarse en vectores específicos para fusionarlo con etiquetas de histidina o hemaglutinina, para los cuales existen anticuerpos comerciales disponibles. En adición, puede generarse una proteína de fusión con la proteína verde fluorescente (GFP), para monitorear su localización mediante microscopía de fluorescencia.

---

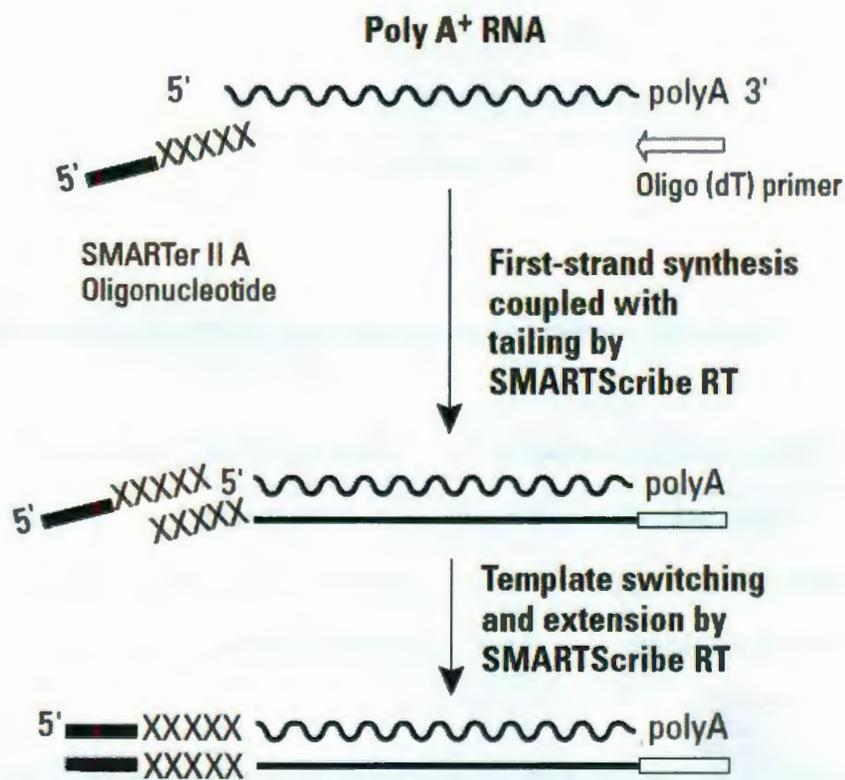
## 4.2 PERSPECTIVAS

Con base en la información generada en el presente trabajo, puede ahora pensarse en la realización de experimentos para contestar las siguientes preguntas:

1. Una vez que hemos clonado el ADNc completo correspondiente al gen *CcSERK1* de *Coffea canephora*, que incluye desde luego el marco de lectura completo, se puede producir la proteína *in vitro* para analizar si la proteína de *CcSERK1* es activa, mediante ensayos de auto y transfosforilación *in vitro*.
2. Expresada en *E. coli*, la proteína puede producirse fusionada a una etiqueta como GST, para su posterior purificación con anticuerpos dirigidos contra la etiqueta.
3. Se puede verificar *in vivo* la localización subcelular de la cinasa receptor SERK1 en células vegetales, mediante la fusión del ADNc con la secuencia de proteínas fluorescentes como GFP, YFP o CFP. Puede también ser expresado en protoplastos y con la ayuda de un microscopio confocal, visualizar la localización de la proteína de fusión.
4. Se puede bloquear la expresión del gen *CcSERK1*. Esto puede hacerse ya sea mediante la tecnología del RNA de interferencia o mediante la transformación con secuencias antisentido. La represión del gen SERK1 podría ayudar a determinar su participación en la regulación de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*.
5. Con el conocimiento de la secuencia nucleotídica del ADNc, se puede aislar el promotor del gen *CcSERK1* y emplearlo para determinar los patrones de expresión en diferentes tejidos y etapas del desarrollo, así como su regulación por factores ambientales, mediante su fusión con genes reporteros (como GUS o GFP). También se puede determinar la expresión de *CcSERK1* durante todos los estadios de la embriogénesis somática o la embriogénesis cigótica de *Coffea canephora*.

**ANEXO I. Protocolos****I.I Síntesis de la primera cadena de ADNc 3' y 5'-RACE**

Para ambos casos se llevó a cabo la generación de la primera cadena de ADNc por transcripción reversa utilizando un cebador modificado para cada caso y la transcriptasa reversa SMARTScribe™. El siguiente esquema describe el protocolo:



**Figura A1.** Esquema de la Síntesis de la primera cadena de ADNc

La síntesis de la primera cadena de ADNc se llevó a cabo de acuerdo con el siguiente protocolo.

1. Preparar la siguiente mezcla de amortiguadores para las síntesis de la primera cadena 5' y 3'-RACE. Para cada reacción de 10  $\mu\text{L}$ , mezclar los siguientes reactivos, centrifugar brevemente y dejar reposar a temperatura ambiente hasta el paso 7:

Componente	Vol ( $\mu\text{L}$ )
5X First-Strand Buffer	2.0
DTT (20 mM)	1.0
dNTP's Mix (10 mM)	1.0
Volumen Total	4.0

2. Combinar los siguientes reactivos en un tubo de microcentrifuga por separado:

Para amplificar el extremo 5'		Para amplificar el extremo 3'	
Componente	Vol ( $\mu\text{L}$ )	Componente	Vol ( $\mu\text{L}$ )
ARN total (0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	2.4	ARN total (0.8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ )	2.4
5'-CDS A Primer	1.0	3'-CDS A Primer	1.0

3. Añadir  $\text{H}_2\text{O}$  estéril a los tubos del paso 2 para un volumen final de 3.75  $\mu\text{L}$  para 5'-RACE y 4.75  $\mu\text{L}$  para 3'-RACE.
4. Mezclar el contenido y centrifugar brevemente.

---

Componente	Vol ( $\mu$ L)
Mezcla de amortiguador del paso 1	4.0
RNase inhibitor (40 U/ $\mu$ l)	0.25
SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (100 U)	1.0
Volumen total	5.25

---

- Añadir a la reacción 5'-RACE, un  $\mu$ L del oligonucleótido SMARTer IIA por reacción.
- Mezclar los reactivos a temperatura ambiente en el siguiente orden:
- Añadir los 5.25  $\mu$ L de la máster mix del paso 7, al ARN desnaturalizado del paso 5 (3'-RACE) y paso 6 (5'-RACE), para un volumen total de 10  $\mu$ L.
- Mezclar bien por agitación y centrifugar los tubos brevemente.
- Incubar los tubos a 42 °C durante 90 minutos en un termociclador.
- Calentar los tubos a 70 °C durante 10 min.
- Diluir el producto de la reacción con Tricina-EDTA.
  - Añadir 20  $\mu$ L si se comenzó con <200 ng de ARN total.
  - Añadir 100  $\mu$ L si se inició con >200 ng de ARN total.
  - Añadir 250  $\mu$ L si comenzó con un ARN poli A<sup>+</sup>.

Las muestras pueden ser almacenadas a -20 °C durante un máximo de tres meses.

## I.II Amplificación rápida de extremos de ADNc 3' y 5'

En este proyecto se empleó el protocolo "SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit", con una estrategia experimental que se muestra en el siguiente esquema.

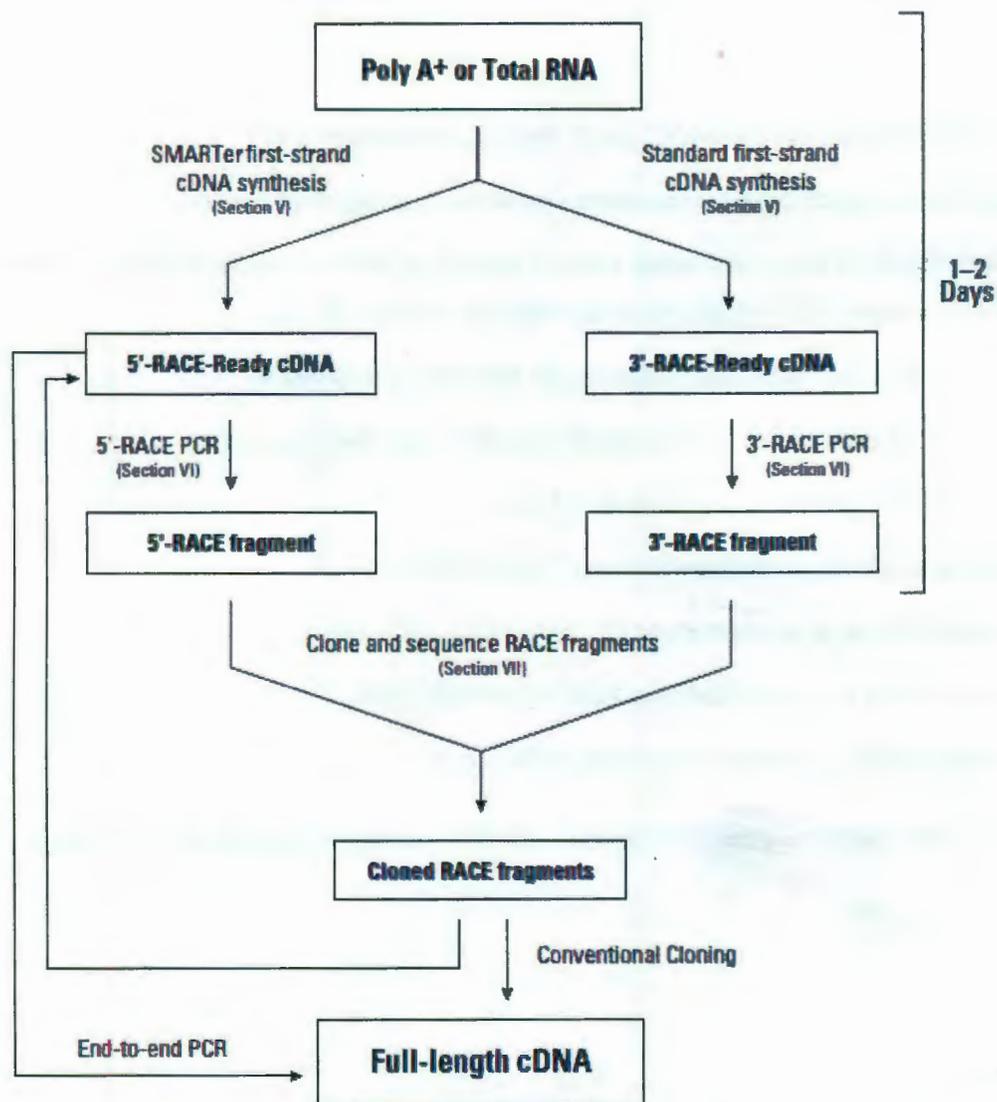


Figura A2. Esquema del sistema SMARTer<sup>TM</sup> RACE cDNA Amplification Kit<sup>®</sup>

El fabricante indica que todas las reacciones RACE PCR han sido optimizadas para su uso con la ADN polimerasa termoestable "Advantage 2 Polymerase Mix". Nosotros pudimos corroborarlo al usar otras polimerasas y obtener resultados únicamente con la polimerasa recomendada.

Protocolo:

1. Preparar la siguiente Máster Mix agregando los siguientes reactivos:

PCR-Grade water	34.5 $\mu$ L
10X Advantage 2 PCR buffer	5.0 $\mu$ L
dNTP's Mix	1.0 $\mu$ L
50X Advantage 2 Polymerase Mix	1.0 $\mu$ L
Volumen total	41.5 $\mu$ L

2. Mezclar bien por agitación (sin introducir burbujas), centrifugar brevemente el tubo.
3. Preparar la siguiente reacción de PCR.

Para 5'-RACE		Para 3'-RACE	
5'-RACE-ADNc	2.5 $\mu$ L	3'-RACE-ADNc	2.5 $\mu$ L
UPM	5 $\mu$ L	UPM	5 $\mu$ L
GSP1	1 $\mu$ L	GSP2	1 $\mu$ L
Máster Mix	41.5 $\mu$ L	Máster Mix	41.5 $\mu$ L
Volumen final	50 $\mu$ L	Volumen final	50 $\mu$ L

4. Amplificar el fragmento de interés mediante el programa touchdown PCR, usando una de estas dos estrategias:

Programa 1 (Para GSP con  $T_m > 70\text{ }^\circ\text{C}$ )

94 °C 30 seg 72 °C 3 min*	5 ciclos
94 °C 30 seg 70 °C 30 seg 72 °C 3 min*	5 ciclos
94 °C 30 seg 68 °C 30 seg 72 °C 3 min*	20 ciclos (ARN poli A <sup>+</sup> ) o 25 ciclos (ARN total)

Programa 2 (Para GSP con  $T_m = 60\text{-}70\text{ }^\circ\text{C}$ )

94 °C 30 seg 68 °C 30 seg 72 °C 3 min*	20 ciclos (ARN poli A <sup>+</sup> ) o 25 ciclos (ARN total)
--	--

\* Si se espera un fragmento de más de 3 Kb, añadir un min por cada Kb.

5. Seleccionar el fragmento de interés y caracterizarlo.

### I.III Purificación de ADN desde geles de agarosa

La purificación de las bandas de ADN fraccionados en gel de agarosa se realizó mediante el uso del kit NucleoTrap® Gel Extraction Trial, incluido en el kit de SMARTer™ RACE cDNA Amplification kit (Clontech).

1. Correr las muestras de ADN en geles de agarosa, teñido con bromuro de etidio, en amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato [pH 8], 1 mM EDTA) o un TBE (45 mM Tris-borato [pH 8], 1 mM EDTA).

- 
2. Localizar el o los fragmentos en el transiluminador de luz ultravioleta. Cortar con bisturí el gel con los fragmentos de ADN de interés. Se recomienda cortar cerca del fragmento, para reducir al mínimo los alrededores de agarosa.
  3. Medir el peso de la rebanada de gel y transferirlo a un tubo de microcentrífuga limpio de 1.5 mL. Por cada 100 mg de agarosa, añadir 300  $\mu$ L del amortiguador NT1. Para geles que contienen agarosa >2%, añadir 600  $\mu$ L de NT1 por cada 100 mg de agarosa.
  4. Dar agitar en un vórtex a la suspensión NucleoTrap hasta que los precipitados estén totalmente resuspendidos.

Por cada  $\mu$ g de ADN que se quiera purificar, añadir 4  $\mu$ L de NucleoTrap Suspensión.

5. Incubar la muestra a 50 °C durante 5-15 min. Agitar brevemente cada 2-3 min durante el período de incubación.

Nota: Para fragmentos de ADN de 400 pb y 5 kb, la muestra se incuba a 50 °C durante 6 min. Agitar en un vórtex brevemente cada 2 min.

6. Centrifugar la muestra a 10,000 x g durante 30 seg a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante.
7. Añadir 500  $\mu$ L de tampón de NT2 al pellet. Agitar brevemente.
8. Centrifugar a 10,000 x g durante 30 seg a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante completamente.
9. Añadir 500  $\mu$ L del Buffer NT3 a la muestra. Agitar brevemente.
10. Centrifugar la muestra a 10,000 x g durante 30 seg a temperatura ambiente y eliminar el sobrenadante completamente.
11. Repita los pasos 10-11.
12. Centrifugar la pastilla de nuevo a 10,000 x g durante 30 seg a T. Secar el precipitado por 10-15 min.
13. Añadir 20-50  $\mu$ L de Buffer NE u otro amortiguador de bajo contenido de sal a la pastilla. Resuspender la pastilla por agitación.

Notas: Las tasas de recuperación previstos van desde 60% (elución en 20  $\mu\text{L}$ ) a 80% (elución en 50  $\mu\text{L}$ ).

14. Eluir el ADN incubando la muestra a temperatura ambiente por 10-15 min. Agitar la mezcla de 2-3 veces durante la etapa de incubación.

Notas: Incubar la muestra a 55 °C durante 10 min, si el fragmento de ADN que se eluye es  $\geq 5$  kb.

Centrifugar la muestra a 10,000 x g durante 30 seg a TA. Transferir el sobrenadante, que contiene el fragmento de ADN a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL limpio.

#### I.IV Purificación del ADN plasmídico

1. Centrifugar 3 mL de un cultivo saturado de bacterias por 20s a 10,000 x g y retirar el sobrenadante.
2. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solución de resuspensión (Tris, pH = 8, 50 mM, EDTA 10 mM y RNAsa a 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y resuspender la pastilla.
3. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solución de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%), invertir el tubo suavemente hasta que se aclare la solución.
4. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  de solución de neutralización (amortiguador de acetato 3 M y pH = 5.5). Invertir el tubo varias veces.
5. Centrifugar a 10,000 x g por 5 min, transferir el sobrenadante a un tubo que contenga 200  $\mu\text{L}$  de una solución de sílica y mezclar.
6. Centrifugar a 10,000 x g por 20 s y retirar el sobrenadante.
7. Adicionar 500  $\mu\text{L}$  de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM pH = 7.5, EDTA 2.5 mM, 50 % de etanol), resuspender la pastilla.
8. Centrifugar a 10,000 x g por 15s, retirar el sobrenadante y dejar secar la pastilla por 2 min a 55 °C.
9. Resuspender la pastilla de sílica en 35  $\mu\text{L}$  de agua, e incubar a 55 °C por 2 min.
10. Centrifugar por 30 s a 10,000 x g, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

## ANEXO II. Oligonucleótidos utilizados

<b>Cuadro A1. Cebadores específicos de CcSERK1 y cebadores universales provistos en el kit.</b>			
<b>Nombre del cebador</b>		<b>Secuencia del cebador</b>	<b>Tm (°C)</b>
<b>GSP1</b>	3'Serk-Café Rev	TGCAGCTCTCCACCTGGTGTTCG	71
<b>GSP2</b>	5'Serk-Café For	CAGCTTGACAGGTCCCATCCCATTG	71
<b>UPM</b>	Cebador universal mix	Long: CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTA TC AACGCAGAGT	70
		Short: CTAATACGACTCACTATAGGGC	
<b>NGSP1</b>	NestedSerk-Café Rev	TGGCAGGAGCAGCAAACAGCAGA	71
<b>NGSP2</b>	NestedSerk-Café For	GGCCCTGTTACTGGACGCCCTTG	71
<b>SubNGSP1</b>	5'SERK-REV	TCAGATAGAGATCCAAGCTVACC	55
<b>GSP3</b>	qSERK1-Rev	CAACCCACCTCTACCCAGAA	58
<b>NUP</b>	Cebador anidado universal	AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT	70

<b>Cuadro A2 Cebadores específicos de CcSERK1 con sitio de corte para enzimas de restricción</b>		
<b>Nombre del cebador</b>	<b>Secuencia del cebador</b>	<b>Tm (°C)</b>
CebKpnI CcSERK1-For	GGTACCACATGGGGATTACAGAGGTG	60
CebXbaI CcSERK1-Rev	TCTAGACGCACAAATTGAAATACATTTAC	56