



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio de genes del transporte de auxinas
durante la embriogénesis somática en *Coffea
canephora***

Tesis que presenta

Miguel Ángel Uc Chuc

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología
Molecular)

Mérida, Yucatán, México

Mayo 2014



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 Estudio de genes del transporte de auxinas durante la embriogénesis somática *en Coffea canephora* 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. Víctor Manuel Loyola Vargas, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los 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 de Científica de Yucatán, A.C., y 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.

Firma: _____


Miguel Ángel Uc Chuc

Mérida Yucatán a 01 de Mayo del 2014

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado "Estudio de la función de las auxinas en la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea spp.*" bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y con el apoyo financiero del Conacyt (157014).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología CONACYT (334676) por la beca otorgada durante la realización de la tesis de maestría.

A mí director de tesis, Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, primero por haberme aceptado en su equipo de trabajo y segundo por su apoyo, confianza y sabiduría que me brindo el cual me permitió crecer no solo académicamente, sino también, como persona.

A mí comité tutorial conformados por la Dra. Clelia De la Peña Seaman, Dr. Stefan De Folter y el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por sus consejos durante esta odisea.

A mí comité revisor de tesis, Dra. Clelia De la Peña Seaman, Dra. Nancy Santana Buzzy Dr. Stefan De Folter, Dr. Enrique Sauri Duch y Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

Al Dr. Neftalí Ocho Alejo y a su técnica la MC. Alejandra Aguilar Barragán.

A mis padres, la Sra. Aida María y el Sr. Benjamín, así como también, a mis apreciables y distinguidas hermanas, mil gracias por su apoyo.

A la MC. Alma Laura Rodríguez Piña por su incondicional apoyo pero sobre todo por su valiosa amistad.

A la MC. Rosa María Galáz Avalos por su apoyo y paciencia para conseguir los reactivos.

A mis amigos del laboratorio núm. 24 y compañeros del la Unidad de Bioquímica.

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo a mis padres, Sra. Aida María y Sr. Benjamín.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1 EL CAFETO	3
1.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES).....	4
1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA E INDIRECTA	5
1.4 REGULADORES DEL CRECIMIENTO (RC).....	6
1.5 FACTORES QUE REGULAN LOS NIVELES DE AUXINA	7
1.6 TRANSPORTE POLAR DE AUXINA	10
1.7 PROTEÍNAS DEL TRANSPORTE DE AUXINAS	12
1.8 TRANSPORTE DE AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS.....	12
1.8.1 INHIBIDORES DEL TRANSPORTE DE AUXINA.....	14
1.9 SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS (VIGS).....	15
1.9.1. MECANISMO DEL SILENCIAMIENTO GÉNICO POSTRANSKRIPCIONAL.....	16
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
JUSTIFICACIÓN	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
BIBLIOGRAFÍA	19
CAPÍTULO II	25

MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1 INTRODUCCIÓN.....	25
2.2. MATERIAL VEGETAL	25
2.3 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	25
2.4 EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO	25
2.5 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL	26
2.6 SÍNTESIS DE ADNC	26
2.7 DISEÑO DE LOS CEBADORES PARA LOS GENES DE TRANSPORTE DE AUXINA	26
2.8 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES DEL TRANSPORTE DE AUXINAS.....	27
2.9 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> DH5A CON EL VECTOR VIRAL TRV	27
2.9.1 INOCULACIÓN DEL VECTOR TRV CON LA CONSTRUCCIÓN CAMPDS MEDIANTE INFILTRACIÓN EN EMBRIONES Y PLANTAS DE <i>C. CANEPHORA</i>	28
BIBLIOGRAFÍA	31
CAPÍTULO III	33
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
3.3.1 AMPLIFICACIÓN DE LOS POSIBLES GENES DEL TRANSPORTE DE LAS AUXINAS	33
3.3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA ES EN <i>C. CANEPHORA</i>	33
3.3.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE ALGUNOS POSIBLES ORTÓLOGOS DE LA PDS DE <i>C. CANEPHORA</i>	35
3.3.4 TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE <i>E. COLI</i> DH5A CON EL VECTOR TRV2 VACIO.....	36
3.3.5 INOCULACIÓN DEL VECTOR VIRAL CON LA CONSTRUCCIÓN TRV-CAMPDS MEDIANTE INFILTRACIÓN	38
3.3.6 INOCULACIÓN DEL VECTOR VIRAL CON LA CONSTRUCCIÓN TRV-CAMPDS APLICANDO VACIO.....	40

BIBLIOGRAFÍA	46
CAPÍTULO IV	47
4.1 DISCUSIÓN GENERAL	47
BIBLIOGRAFIA	51
CAPITULO V	53
5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	53
5.1 CONCLUSIONES.....	53
5.2 PERSPECTIVAS.....	54



LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Embriogénesis somática vs embriogénesis cigótica, modificado de Zimmerman	4
Figura 1.2. Estructura de algunas auxinas naturales.....	7
Figura 1.3.	11
Figura 1.4. Flujo de auxinas durante los diferentes estadios de desarrollo embriogénico utilizando como modelo la embriogénesis cigótica en <i>A. thaliana</i>	14
Figura 1.5. Mecanismo general del PTGS. Inicia con la síntesis de ARNs _i a partir del la degradación del ARN _{dc} mediada por la proteína DICER.....	16
Figura 1.6. Se realizó la inducción de la ES y se recolectó cada estadio de desarrollo del embrión somático para hacer la extracción de ARN total y posteriormente la síntesis de ADN _c	18
Cuadro 2.1. Cebadores diseñados para amplificar los transcritos de los genes del transporte de auxina.	27
Figura 3.1. Amplificación de los genes de transporte de auxina en tejido foliar de <i>C. canephora</i>	33
Figura 3.2. ARN total. Masa proembriogénica MP, embriones en estadios globular G, corazón H, torperdo Tor, cotiledonar Cot y cigótico Z.	34
Figura 3.3. Análisis de expresión génica de los posibles transportadores de auxina durante la embriogénesis somática en <i>C. canephora</i>	34
Figura 3.4. Árbol filogenético de algunos posibles ortólogos de la PDS de <i>C. canephora</i>	36
Figura 3.5. Transformación de células de <i>E. coli</i> DH5 α mediante choque térmico con el vector viral TRV2.	37

Figura 3.6. Determinación del vector viral TRV2 mediante PCR en colonia..	37
Figura 3.7. Extracción de ADN plasmídico de células DH5 α transformadas con el vector TRV	38
Figura 3.8. Plantas de café de cuatro meses de edad que contienen de cuatro	39
Figura 3.9. Plantas de <i>C. canephora</i> inoculadas con el vector viral TRV.	39
Figura 3.10. Gel de agarosa al 1% en el que se demuestra que el virus TRV no se encuentra en las plantas analizadas después de 58 días de inoculación.	40
Figura 3.11. Embriones somáticos inoculados por vacío con el vector viral TRV.	41
Figura 3.12. Plantas de <i>C. canephora</i> después de 58 días inoculadas por vacío.	41
Figura 3.13. ADN genómico de las plantas de café inoculada por vacío después de 58 días.	42
Figura 3.14. Plantas de <i>C. annuum</i> infectadas con el vector viral TRV después de 15 días post-inoculación.	43
Figura 3.15. Determinación del virus TRV 15 días pos-inoculación en plantas de <i>C. annuum</i> .	43
Figura 3.16. Silenciamiento génico inducido por virus en plantas de <i>C. annuum</i> .	44
Figura 3.17. Análisis de Determinación del vector viral TRV.	45

Listado de cuadros

Cuadro 2.1. Cebadores diseñados para amplificar los transcritos de los genes del transporte de auxina. 27



ABREVIATURAS

Casete de unión a ATP del grupo de las glucoproteínas	ABCB
Ácido etilendiaminotetraacético	EDTA
Ácido indol-3-acético	AIA
Ácido naftalámico	NPA
Dodecilsulfato sódico	SDS
Embriogénesis somática	ES
Embriogénesis somática indirecta	ESI
Fitoeno desaturasa	PDS
Membrana plasmática	MP
Regulador del crecimiento	RC
Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Silenciamiento génico inducido por virus	VIGS
Silenciamiento génico postranscripcional	PTGS
Virus sonajero del tabaco	TRV

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) es el proceso que da origen a un nuevo individuo, completamente idéntico a la madre, sin la fusión de gametos. En las células vegetales, este proceso se puede llevar a cabo en condiciones *in vitro* mediante la adición exógena de una combinación de reguladores de crecimiento (RC) como las auxinas y citocininas. Sin embargo, los mecanismos que se encuentran involucrados al inicio o durante el crecimiento y desarrollo del embrión somático no se conocen del todo.

La auxina ácido indol-3-acético (AIA) es el RC que está presente prácticamente en todos los tejidos de la planta, y que se encuentra involucrado en diversos procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, como la división celular, dominancia apical, elongación y la diferenciación celular. Para que el AIA ejerza su función biológica es necesaria la formación de un gradiente de concentración de auxina y esto se lleva a cabo mediante un transporte de célula a célula, denominado transporte polar, y es llevado a cabo por proteínas específicas del transporte de auxina como son los PINs y ABCB.

En el presente trabajo se estudiaron los genes del transporte de auxinas *PIN* y *ABCB* durante la ES en *Coffea canephora*. Además se probó el sistema de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) para el estudio específico de los genes del transporte de auxinas utilizando el virus sonajero del tabaco (TRV). En *C. canephora*, se identificaron los transcritos de los genes *PIN1*, *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19* a lo largo de todo el proceso de la ES. Esta es la primera vez que se reporta la presencia de estos genes en esta especie. También se analizó su expresión en tejido foliar y en embrión cigótico. Por otra parte, para tratar de establecer el VIGS en esta especie se analizaron embriones y plantas inoculadas con el TRV.

La información obtenida a partir de los experimentos realizados sugieren que la especie *C. canephora* es resistente al virus sonajero del tabaco. El análisis en hojas nuevas y de plantas inoculadas con éste virus, no se detectó su presencia. Se ha reportado que el TRV infecta a gran variedad de especies vegetales siendo las solanáceas las más susceptibles a la infección de este virus. Los resultados sugieren que la especie *C. canephora* es una planta difícil de infectar con este vector viral y posiblemente su sistema de defensa contra patógenos es diferente de otras plantas de la misma familia o que el virus es incapaz de multiplicarse en dicha planta.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is the process that gives rise to a new individual, identical to the parent without the fusion of gametes. In plant cells, this process can be carried out under *in vitro* conditions by the exogenous addition of a combination of growth regulators, such as auxins and cytokinins. However, the mechanisms involved at the beginning or during the growth and development of the somatic embryo are not fully understood.

The auxin indole-3-acetic acid is a plant growth regulator that is present in almost all plant tissues. It is involved in various processes of plant growth and development, such as cell division, apical dominance, elongation and differentiation. It is necessary to form a gradient concentration of indole-3-acetic acid in order to exert its biological function. This gradient is accomplished by the indole-3-acetic acid transport from cell to cell (polar transport), which is carried out by specific proteins of the auxin transport named PINs and ABCB.

In this thesis, the genes *PIN* and *ABCB* were studied during the somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In addition, the system virus-induced gene silencing with the snuff rattle virus was tested in *C. canephora*. In *C. canephora*, transcripts of the *PIN1*, *PIN7*, *ABCB1* and *ABCB19* genes throughout the entire process of somatic embryogenesis were identified. The expression was also analyzed in leaf tissue and zygotic embryos. This is the first time that the expression of these genes was reported for this species during cell differentiation.

The information obtained from these experiments suggests that *C. canephora* is resistant to the snuff rattle virus. The analysis in young leaves of plants inoculated with the virus showed that the virus is not present in the tissue. It has been reported that the snuff rattle virus infects many plant species, being the most susceptible to infection the Solanaceae family. The results also suggest that *C. canephora* is a difficult plant to become infected with this viral vector and possibly its defense system against pathogens is different from other plants from the same family or that the virus is unable to multiply in the plant.

INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática (ES) consiste en la formación de un embrión a partir de células que no son el producto de la fusión de los gametos, esta formación se da por una serie de procesos, mediante los cuales las células somáticas sufren una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares para dar origen al embrión somático (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

La ES es una poderosa herramienta para el estudio de los procesos celulares, bioquímico y moleculares que se llevan a cabo durante la inducción del embrión somático, que cuando se integra con técnicas de biología celular y molecular provee un instrumento invaluable para el mejoramiento genético de especies vegetales que no se pueden propagar de manera sexual. El estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares permiten identificar los factores involucrados durante el proceso de inducción del embrión y de esta forma entender y comprender los procesos de tal manera que se pueda aplicar para el mejoramiento genético en especies vegetales.

Durante la ES se requiere de reguladores del crecimiento (RC) los cuales deben de ser transportados de manera coordinada, generando un gradiente de concentración. Este transporte es mediado por proteínas específicas del transporte de las auxinas; sin embargo, aun no se sabe cuáles son los transportadores involucrados en dicha movilización durante la inducción de la ES. Por eso, en este trabajo se llevará a cabo el estudio de los genes que codifican para proteínas del transporte de las auxinas en el modelo de ES de *C. canephora*, mediante el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).



CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 El cafeto

La comercialización del café constituye uno de los productos de mayor importancia, no solo en el ámbito nacional, sino también internacional. El cafeto es un cultivo perenne que se cultiva en alrededor de 80 países alrededor del mundo. El café es la segunda mercancía de mayor venta en el mundo. México como productor de café ocupa el quinto lugar en el ámbito mundial, después de Brasil, Colombia, Indonesia y Vietnam. En tanto que es el primer productor mundial de café orgánico (Nolasco, 1985).

El café pertenece a la familia de las *Rubiaceae*, en la cual se han identificado dos géneros: *Coffea* y *Psilanthus*. El género *Coffea* comprende más de 100 especies, siendo las más importantes, en términos comerciales, *Coffea arabica* y *C. canephora*. *C. canephora* ($2n = 22$) variedad Robusta constituye la segunda especie en importancia económica, no sólo por el volumen de producción sino por el área cultivable (Nolasco, 1985). Cabe mencionar que esta variedad posee un alto grado de resistencia al estrés hídrico y a las temperaturas elevadas (Bertrad *et al.*, 2000), así como a las enfermedades; además, tiene un contenido de cafeína elevado. *C. arabica* ($2n = 44$) es menos resistente a las enfermedades, menor contenido de cafeína y es la especie que se usa mayormente como bebida.

Desde hace varios años se ha estado mejorando la cafecultura, mediante aplicaciones biotecnológicas, así como también con el apoyo de herramientas tan valiosas como la biología molecular (Anthony *et al.*, 1997). La tendencia actual es la de tener variedades mejoradas, con interés agronómico, para generar un producto mejorado y con alto valor comercial. Entre los nuevos métodos biotecnológicos que se están utilizando, se encuentra la ES. Esta técnica permite obtener una multiplicación a gran escala de genotipos superiores a bajo costo y en un tiempo relativamente corto.

Actualmente, no se conocen de forma íntegra los mecanismos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo cuando las células somáticas se vuelven competentes para producir embriones somáticos. Este es un gran reto de la biología moderna.

1.2 Embriogénesis somática (ES)

La ES es un proceso biológico mediante el cual se logra la inducción y desarrollo de embriones a partir de células somáticas, pero sin la fusión de los gametos (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Es un proceso mediante el cual se produce una estructura bipolar (embrión) característica de la embriogénesis cigótica, pero a partir de una célula somática.

Los embriones somáticos pasan a través de una serie de etapas o estadios de desarrollo, los cuales se conocen como estadios globular, corazón, torpedo y cotiledonar, similares a los del embrión cigótico (Fig.1.1). En café, se ha llevado a cabo el estudio histológico y morfológico de los diferentes estadios por los cuales se da este proceso embriogénico (Quiroz *et al.*, 2002)

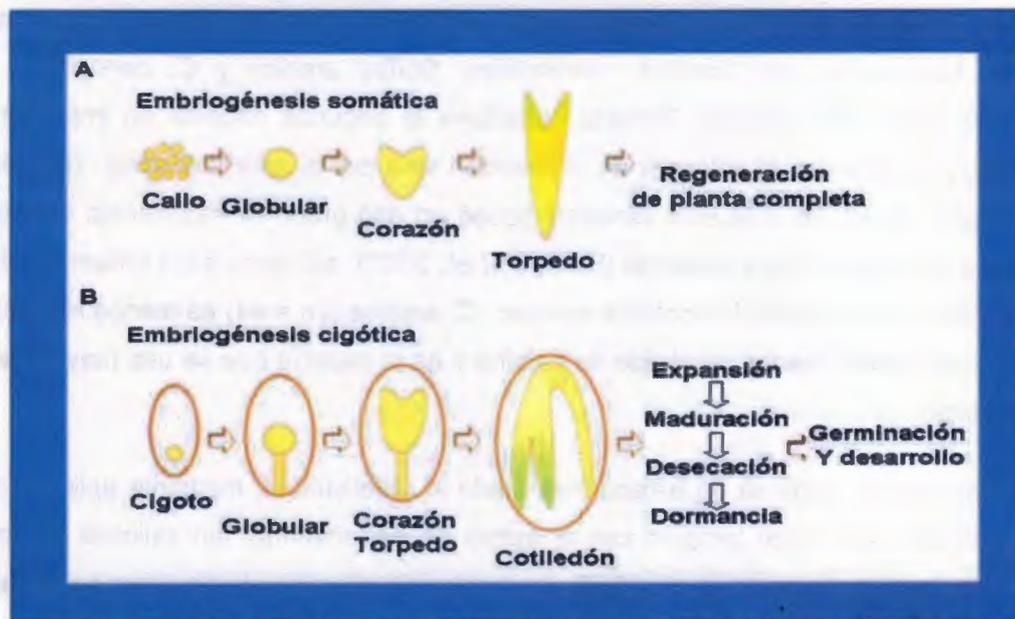


Figura 1.1. Embriogénesis somática vs embriogénesis cigótica, modificado de Zimmerman (Zimmerman, 1993). A) la embriogénesis somática inicia a partir de tejido desdiferenciado llamado callo. B) la embriogénesis cigótica da inicio con la formación de un cigoto producto de la fecundación. En ambos procesos las etapas siguientes de desarrollo son similares.

Las estructuras obtenidas mediante ES son capaces de crecer y formar plantas completas normales. La ES puede partir de sola una célula o un grupo de células somáticas.

La ES presenta ventajas sobre la embriogénesis cigótica como modelo de estudio, ya que en la ES se puede manipular una gama muy diversa de factores, tanto del medio de cultivo, como de las condiciones de incubación en condiciones *in vitro* (Zimmerman, 1993). Esta característica ha convertido a la ES en un modelo para el estudio de eventos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares durante el comienzo y desarrollo de la embriogénesis en plantas superiores (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

Hoy en día, la ES se ha convertido en el método más empleado para el estudio de los diferentes eventos que se llevan a cabo durante el proceso embriogénico, así como para la propagación de genotipos valiosos en las especies *C. arabica* y *C. canephora* (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

1.3 Embriogénesis somática directa e indirecta

La inducción de la ES se realiza generalmente exponiendo los explantes vegetales a la presencia de reguladores del crecimiento (RC) exógenos en un medio de cultivo adecuado. Las células competentes producen una respuesta, ya se directamente (ESD) iniciando la embriogénesis a partir del explante, o indirectamente (ESI) mediante la formación primero de callo embriogénico a partir del cual se formarán los embriones somáticos.

Por medio de la ESD se obtienen embriones directamente a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo (Quiroz *et al.*, 2002).

En la ESD, las células embriogénicas están presentes y lo único que se requiere para la formación de los embriones somáticos es la presencia de una sustancia inductora o la eliminación de una sustancia inhibidora para que estas células reanuden su actividad mitótica y su desarrollo embriogénico (Rojas *et al.*, 2002).

La ESI permite la obtención de embriones a partir de callos, mediante el uso, generalmente de dos medios de cultivo, uno de inducción de callo embriogénico y otro para la regeneración de los embriones somáticos.

La ES se divide en dos fases: inducción y expresión. La fase de inducción es la más importante del proceso. La inducción incluye dos etapas, la primera de ellas, es la desdiferenciación de la célula somática o especializada en una célula no diferenciada. La fase de expresión corresponde a la evolución de las masas proembriogénicas, células embriogénicas o células predeterminadas en embriones somáticos. La fase de inducción requiere de la presencia de reguladores del crecimiento exógenos, especialmente auxinas o combinaciones del tipo auxina-citocinina. La fase de expresión es estimulada por una disminución de la concentración de auxina en el medio de cultivo.

1.4 Reguladores del crecimiento (RC)

Los RC son aquellas sustancias que actúan a bajas concentraciones regulando el crecimiento y desarrollo de la planta (Ludwig, 2011). Son sustancias sintetizadas de manera natural en alguna parte de la planta y que se translocan de un lugar a otro. También pueden ser de origen sintético (Fig. 1.2) (Ludwig, 2011).

Los RC, especialmente las auxinas, son componentes claves durante la morfogénesis en condiciones *in vitro*, su adición exógena activa la división mitótica de las células somáticas (Ludwig, 2011). Diversos factores genéticos influyen el desencadenamiento de la ES en las células vegetales (Rojas *et al.*, 2002). La auxina ácido Indol acético (AIA) es el RC más abundante y se encuentra involucrado en casi todos los procesos de desarrollo y crecimiento de la planta (Petrasek y Friml, 2009).

El proceso de la ES se inicia muy a menudo en un medio de cultivo rico en auxinas, principalmente el ácido diclorofenoxiacético (2, 4-D), el ácido indolacético (AIA) o el ácido naftaleno acético (ANA) (Litz y Jarret, 1991). Ammirato (1974) señaló que las auxinas son los RC que generalmente inician el crecimiento de los callos así como la inducción de la ES y, ésta depende en gran medida de la naturaleza del explante utilizado (Ammirato, 1974).

Las citocininas, principalmente la benciladenina (BA), tienen cierta influencia en la ES de *C. arabica* (Dublín, 1981). Las citocininas juegan un papel importante en la regulación y diferenciación de las células vegetales, y se encuentran involucradas en procesos tales como el crecimiento y desarrollo, así como también en el retraso de la senescencia, en la transducción de señales y en el aumento en la productividad de los cultivos vegetales (Ludwig, 2011).

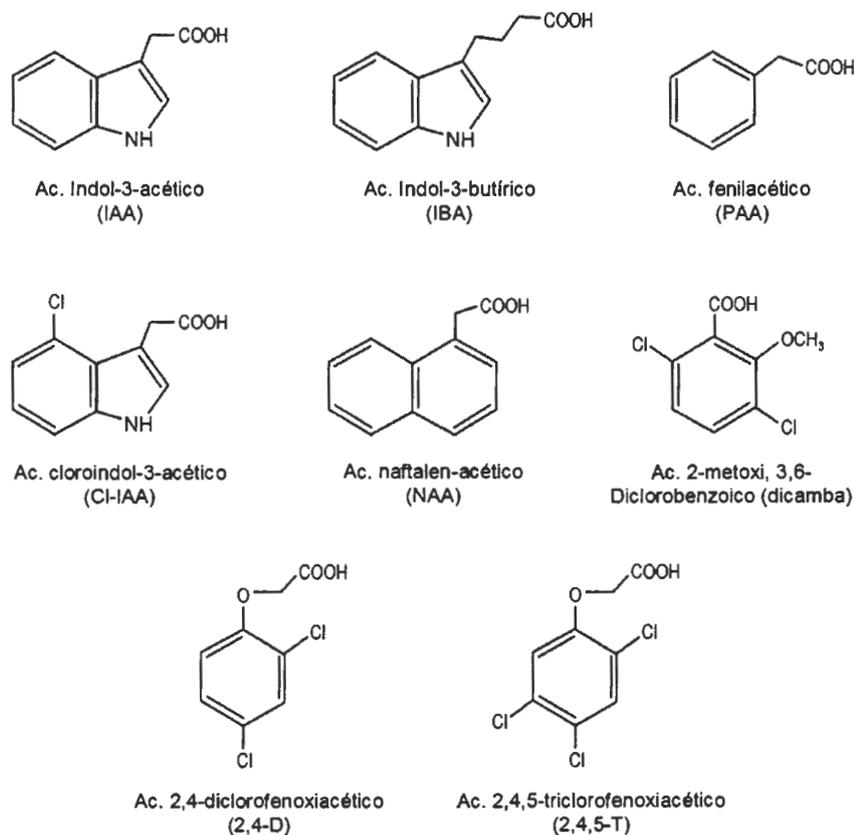


Figura 1.2. Estructura de algunas auxinas naturales (ácido indol-3-acético AIA, ácido indolbutírico AIB, ácido fenilacético APA, ácido cloro indol-3 acético Cl-AIA) y sintéticas (ácido naftalenacético ANA, ácido 2-metil 3,6-diclorobenzoico dicamba, ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2,4-D y ácido 2,4,5-tricloro fenoxiacético 2,4,5-T) (Ludwig, 2011).

1.5 Factores que regulan los niveles de auxina

La homeóstasis del AIA en la célula es mediada por varios factores que afectan el nivel intracelular, entre estos factores está la biosíntesis, degradación, conjugación y transporte polar del AIA (Woodward y Bartel, 2005).

1.5.1 Síntesis y degradación

Aunque las auxinas se encuentran en todos los tejidos de la planta, la concentración mayor ocurre en las regiones que están en activo crecimiento. La síntesis de AIA ocurre principalmente en meristemos apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo (Jordán y Casaretto, 2006). Plántulas de *Arabidopsis* pueden sintetizar AIA en hojas, cotiledones y raíces, siendo las hojas jóvenes las de mayor capacidad sintética (Jordán y Casaretto, 2006). Aunque se sabe que las plantas tienen varias rutas para sintetizar AIA, ninguna de estas rutas ha sido definida al detalle de conocer cada una de las enzimas e intermediarios. Las plantas usan dos rutas biosintéticas para producir AIA, una dependiente del triptófano (Trp) y otra independiente de él, siendo la primera la más importante y de la que se tiene más información. La síntesis de Trp es una de las más complicadas entre todos los aminoácidos, involucrando cinco pasos desde corismato (Woodward y Bartel, 2005).

Las rutas de síntesis del AIA que se conocen hoy en día se basan en evidencias obtenidas a partir de la identificación de intermediarios, la actividad biológica de éstos y la identificación de enzimas capaces de convertir algún intermediario en IAA o algún precursor de éste (Jordán y Casaretto, 2006).

La síntesis de AIA puede derivar del triptófano por cuatro vías: (1) por descarboxilación para producir triptamina (TAM), (2) por oxigenación para originar indolacetamida (IAM); (3) por transaminación para producir ácido indol-3-pirúvico (IPA) y (4) por oxigenación para producir indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Woodward y Bartel, 2005).

1.5.2. Conjugación de auxina

El nivel endógeno de auxina en la planta puede regularse no sólo por su tasa de síntesis y velocidad de transporte entre órganos, sino también por mecanismos de desactivación. La desactivación de AIA puede ocurrir mediante su conjugación con otras moléculas como azúcares o aminoácidos, o por oxidación. Las formas conjugadas son generalmente inactivas (Staswick *et al*, 2005).

El AIA se ha encontrado conjugado con compuestos de baja y alta masa molecular. Por ejemplo, las auxinas conjugadas con compuestos de baja masa molecular forman ésteres

de AIA con glucosa o con *mio-inositol* y los conjugados con aminas como el AIA-N-aspartato. Y los conjugados de AIA con compuesto de alta masa molecular son AIA-glucano (7-50 unidades de glucosa unidas al AIA y las glucoproteínas encontradas en semillas de cereales (Taiz y Zeiger, 1991). La existencia de formas conjugadas cumple las funciones de almacenamiento, transporte, protección y desintoxicación por exceso de AIA. Así, el nivel intracelular de la auxina activa depende de su síntesis, transporte, degradación y compartimentación. El IAA puede ser inactivado en casi todos los tejidos vegetales y las diferentes especies tienen distintas clases de conjugados de AIA (Jordán y Casaratto, 2006).

En *Arabidopsis*, por ejemplo, estudios mediante lisis alcalina que libera AIA de sus formas conjugadas indican que aproximadamente un 90% del AIA está unido con amidas, un 10% como conjugados tipo éster y sólo un 1% como AIA libre. AIA-Ala, AIA-Asp, AIA-Glu, y el AIA-Leu han sido detectados en semillas y plántulas, así como también AIA-glucosa (Staswick *et al.*, 2005)

Las formas conjugadas del AIA pueden ser de dos tipos: aquellas que servirían como fuente de AIA libre y aquellas susceptibles a hidrólisis, es decir para el catabolismo del AIA (Rampey *et al.*, 2004). Las plantas también pueden obtener AIA a partir de una reacción de β -oxidación de AIB, la segunda auxina más abundante, y se ha sugerido que esta reacción se lleva a cabo en los peroxisomas (Bartel, 1997). Así como el AIA, el AIB también puede ser conjugado a través de uniones amidas o ésteres. Mientras la conjugación es un proceso reversible, la degradación de las auxinas es irreversible.

El análisis en mutantes de *Arabidopsis*, incapaces de hidrolizar formas conjugadas de AIA, han brindado información sobre estos procesos (Bartel, 1995). El catabolismo del AIA puede realizarse mediante dos vías: por oxidación descarboxilativa de la cadena lateral y por oxidación en las posiciones 2 y 3 del anillo indólico, sin descarboxilación (Woodward y Bartel, 2005)

1.5.3 Transporte de auxina.

Las auxinas fueron los primeros reguladores del crecimiento en ser descubiertos (Jordán y Casaretto, 2006). El bioensayo para su detección, también fue el primer ensayo para

detectar un RC en ser desarrollado. La primera evidencia de su existencia se derivó de los experimentos realizados por Darwin y uno de sus hijos quienes analizaron los efectos de una sustancia presente en el ápice de los coleóptilos de avena sobre el crecimiento de plántulas a una señal de luz. Más tarde, se postuló que la presencia de esta sustancia sería transportada de forma polarizada desde el ápice del coleóptilo hacia la base de éste para provocar la repuesta fototrópica de la planta (Thimann, 1963).

Las auxinas son un grupo de RC vegetal natural que regulan diversos aspectos del desarrollo y crecimiento de las plantas incluida la división celular, elongación celular, diferenciación del tejido vascular y dominancia apical. La forma predominante en la planta es el AIA. Para que este RC ejerza su acción fisiológica debe ser transportado para la formación de gradientes locales de concentración. Este gradiente de concentración es creado por el movimiento polar de célula a célula (Benková *et al.*, 2003).

Estudios recientes de genética molecular han permitido empezar a conocer los mecanismos moleculares sobre el transporte polar de las auxinas en *A. thaliana* (Nishimura *et al.*, 2012). Este movimiento polar de auxina de célula a célula es llevado a cabo por transportadores de entrada y de salida; por lo menos hay tres familias de proteínas de transporte de auxina que coordinadamente regulan el flujo de AIA celular.

1.6 Transporte polar de auxina

El transporte de AIA pasa a través de las células en forma polar, activa, unidireccional e implicando consumo energético en forma de ATP. Este transporte ocurre en forma basipetal en tallos y en raíces, aunque en estas últimas puede ocurrir en ambos sentidos, en forma acropetal en el cilindro central y basipetal en la epidermis. (Rashotte *et al.*, 2003).

Después de ser sintetizado, el AIA debe ser transportado polarmente hacia la raíz a través de células parenquimáticas asociadas al tejido vascular, como también a través del xilema y el floema; sin embargo, el flujo de AIA de célula a célula es polar (Rashotte *et al.*, 2003). El transporte polar de auxinas es complejo y está regulado por la acción de proteínas tales como AUX1, PIN y ABCB.

Siendo las auxinas ácidos débiles que se encuentran generalmente protonadas en el pH relativamente bajo del apoplasto, de acuerdo al modelo quimiosmótico, un gradiente de pH entre la pared celular (pH 5) y el citoplasma (pH 7) facilitarían la entrada de la forma reducida de AIA a través de la membrana citoplasmática. Una vez al interior de la célula, el alto pH del citoplasma resulta en la ionización del IAA, impidiendo su salida. La internación del AIA se puede incrementar en algunos tejidos con la ayuda de transportadores tales como los AUX1, los cuales son transportadores específicos de auxina (Swarup *et al.*, 2005).

Si bien la naturaleza hidrofóbica del grupo indol del AIA permite la asociación con la membrana plasmática, la carga negativa del grupo carboxilo disociado con la molécula evita que atraviese la membrana plasmática. Por lo que el AIA ya no puede moverse de manera pasiva y por lo tanto requiere de proteínas de transporte de salida como los transportadores PIN y ABCB (Fig. 1.3), por lo tanto la salida de auxina de la célula es definitivamente un proceso activo dependiente de energía (Kleine *et al.*, 2009).

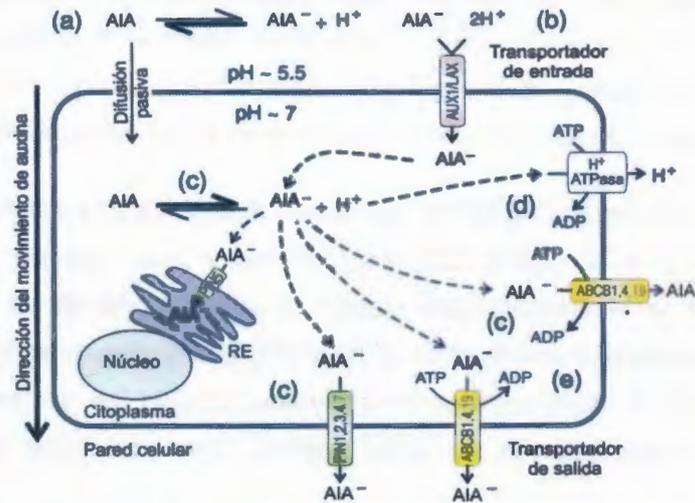


Figura 1.3. Representación esquemática del transporte de AIA a través de la membrana plasmática. Difusión pasiva y flujo específico de AIA por transportadores de salida (PIN, ABCB). El AIA puede entrar de forma pasiva a la célula en su forma protonada o de manera específica mediante el transportador AUX1/LAX. En el interior de la célula el AIA adquiere carga y debe ser transportado por las proteínas PIN y ABCB ubicadas a través de la membrana plasmática (Petrasek y Friml, 2009).

1.7 Proteínas del transporte de auxinas

En la planta, el AIA actúa como una molécula de señalización que juega un papel central durante el desarrollo vegetal. Muchas de las funciones biológicas del AIA son controladas por un sistema de transporte específico. Existen por lo menos tres familias de transportadores de auxina, mencionadas anteriormente. AUX1 una proteína de transporte de entrada de auxina, en tanto que PIN y ABCB lo son de salida (Petrasek y Friml, 2009).

Los PIN, son proteínas integrales de membrana. En *A. thaliana*, la familia de los PIN, está compuesta por ocho miembros y se dividen en dos sub clases, según la longitud del dominio hidrofóbico en la cadena polipeptídica (Zazimalová *et al.*, 2007).

La localización polar de los PINs es importante para el desarrollo del embrión, la organogénesis, el tropismo, entre otros procesos de desarrollo (Zazimalová *et al.*, 2010).

Con respecto a la longitud de secuencia, se ha reportado que los dominios de PIN 5 y PIN 8 son más pequeños que los demás (PIN 1, 2, 3, 4, 6, 7) y no se encuentran en la membrana plasmática (MP), sino en compartimientos endomembranales por ejemplo en el lumen del retículo endoplásmico (RE) (referencias). Además, se sabe que PIN 5 juega un papel en la distribución y en la regulación intracelular de auxina, controlando así la disponibilidad tanto subcelular como celular de la auxina activa (Zazimalová *et al.*, 2010).

En contraste, la súper familia ABCB es una de las más grandes y las más conocidas y estudiadas (Tusnady *et al.*, 2006). Diversos estudios indican que los transportadores *ABCB1* y *ABCB19* se encuentran involucrados en el transporte de las auxinas en las plantas y juegan un papel crucial durante el desarrollo y crecimiento vegetal. En levadura, se ha visto que *ABCB4* tiene actividad de importador cuando los niveles de auxina son bajos y cuando las concentración son altas funciona como exportador (Yang y Murphy, 2009).

1.8 Transporte de auxina durante la embriogénesis

Las auxinas regulan muchos aspectos importantes del desarrollo al inicio de la embriogénesis cigótica. En las plantas, las auxinas son transportadas a largas distancias usando el transporte simplasto del floema (Rashotte *et al.*, 2003). Pero también, el transporte de célula a célula puede llevarse a cabo mediante difusión o la utilización de

varios transportadores de auxina localizados en la MP. La función de los transportadores de auxina en la MP es realizar un transporte rápido con una dirección específica para el establecimiento de una gradiente de concentración de auxina para el desarrollo de la planta (Nishimura *et al.*, 2012). En sí, el sistema de regulación del transporte de auxina es muy complejo.

Durante la embriogénesis cigótica todas las estructuras y tejidos deben de formarse. Estudios con mutantes en *A. thaliana*, han mostrado que el proceso de desarrollo es mediado por la acción de los transportadores de auxina PIN1, PIN4, PIN7, para mantener los niveles de auxinas necesarios para el establecimiento de la base apical-basal (Petrásek *et al.*, 2011). Por ejemplo, PIN1 es responsable de la distribución de la auxina durante la formación del proembrion. Recientemente se ha demostrado que tanto ABCB1 como ABCB19 contribuyen al flujo de salida de auxina durante el estadio de desarrollo de proembrion. Al mismo tiempo que ABCB1 se encuentra en todas las células del suspensor y en las células del proembrion, mientras que ABCB19 se encuentra restringido a células formadoras del proembrion (Petrásek *et al.*, 2011).

Durante el estadio globular, PIN1 se encuentra localizado en la parte apical junto con la actividad de PIN4. Durante este estadio se invierte el flujo de auxina, que hasta ese momento había sido acropetal, y ahora pasa a basipetal, de la parte apical hacia la hipófisis. Para que este flujo se complete, la posición de PIN7 cambia de la parte superior de las células a la parte inferior. De esta forma se establece el flujo polar de la auxina desde la parte apical a la parte basal. Durante el desarrollo del estadio corazón, se produce una concentración máxima de auxina en las células que serán los futuros cotiledones así como también en la hipófisis. El transporte de auxina hacia la hipófisis, así como también hacia la formación de los cotiledones es llevado a cabo por PIN1 (Fig. 1.4) (Michniewicz *et al.*, 2007).

El cambio de dirección del flujo de auxina durante el desarrollo embriogénico es mediado por la actividad de una fosfatasa PPA2. Esta fosfatasa, junto con una proteína cinasa PID, regulan la orientación del transporte polar de las auxinas (Michniewicz *et al.*, 2007).

En general, estos sistemas de transporte de auxina (*PIN*, *ABCB*) de manera coordinada contribuyen al desarrollo normal del embrión, así como también al crecimiento y desarrollo

de los diferentes órganos, es decir, el transporte de auxina es crucial durante todo el ciclo de vida de la planta; sin embargo, aunque se ha logrado grandes avances en cada uno de estos tres sistemas aún quedan muchas preguntas por resolver.

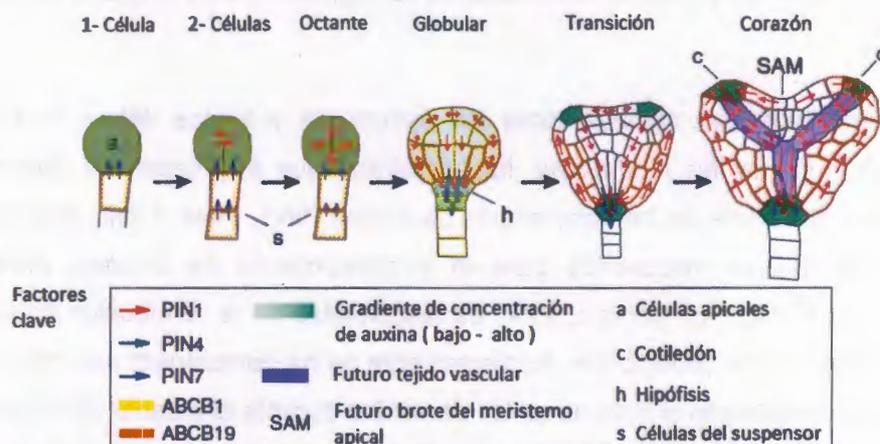


Figura 1.4. Flujo de auxinas durante los diferentes estadios de desarrollo embrionógico utilizando como modelo la embriogénesis cigótica en *A. thaliana* mediado por transportadores tipo PIN y ABCB (Petrasek y Friml, 2009)

1.8.1 Inhibidores del transporte de auxina

Entre los compuestos conocidos como inhibidores del transporte polar de auxina se incluyen al ácido naftalámico (NPA), al ácido 2, 3, 5 tri-idobenzoico (TIBA), y al 2 cloro-9 hidroxifluoreno-9-carboxilo (HFCA), entre otros, los cuales tienen diferentes estructuras y diferentes sitios de unión a los transportadores de auxina (Laskowski *et al.*, 2008). Diversos estudios farmacológicos, usando inhibidores del transporte de auxina, han dado información sobre el mecanismo del transporte de este RC. Se ha reportado que el uso de brefeldina (BFA), un inhibidor del transporte vesicular, inhibe el transporte del AIA en plantas. El BFA afecta el tráfico subcelular y celular de las proteínas PIN (Laskowski *et al.*, 2008).

A. thaliana ha sido el modelo por excelencia en el cual se ha estudiado el sistema de transporte polar de auxina utilizando diferentes inhibidores del transporte y es el único modelo que se tiene información más detallada sobre la función de las proteínas de transporte polar de auxina (PIN1, PIN4, PIN7, ABCB1 y ABCB19). Por ejemplo, el tratamiento con NPA provoca un desarrollo anormal en flores de *A. thaliana*, lo que sugiere que el transporte polar de auxina es necesario para que se lleve a cabo el

desarrollo floral normal. En el mismo modelo, pero con mutantes *pin1* las cuales carecen de la proteína de transporte de salida (PIN1), se da un desarrollo anormal similar a las plantas tratadas con NPA (Reinhardt *et al.*, 2000).

Experimentos realizados durante el desarrollo de la ES en *Picea abies*, utilizando NPA como inhibidor del transporte de auxina, muestran la formación de embriones somáticos anormales en los diferentes estadios de desarrollo, es decir, cambios en las estructuras de los embriones somáticos. Estos datos sugieren que se requiere de un sistema de transporte para las auxinas, con el cual se forma un gradiente de concentración que es indispensable para el desarrollo normal del embrión somático (Hakman *et al.*, 2009).

En conclusión, se han realizado diferentes estudios utilizando diversos inhibidores del transporte de auxina en diferentes concentraciones. El empleo de los diferentes inhibidores afecta a una gran variedad de proteínas del transporte, tanto a los transportadores *PIN* como a los transportadores *ABCB*, y por lo tanto, aún no se puede determinar de manera específica la función de cada transportador durante el proceso de desarrollo vegetal.

En nuestro laboratorio se han realizado experimentos (datos no publicados) utilizando diferentes concentraciones de NPA (0.54 μM , 1.08 μM , 5 μM y 20 μM) durante la ES en *C. canephora* y los resultados obtenidos muestran que a concentraciones de 20 μM de NPA la ES se inhibe totalmente. Sin embargo, no se puede saber qué transportador fue bloqueado durante el tratamiento con este inhibidor durante la inducción de la ES en *C. canephora*.

1.9 Silenciamiento génico inducido por virus (VIGS)

Para obtener un mejor conocimiento de los mecanismos de la ES, es necesario una combinación de las metodologías más avanzadas que existen hoy en día, como el silenciamiento génico inducido por virus (VIGS). Técnicas como ésta se han empleado para abordar la complejidad en la expresión de los diferentes genes expresado durante algún proceso de desarrollo.

El VIGS es una alternativa para poder investigar las funciones de los genes sin la transformación de la planta.

La infección de la planta con ARN viral genera pequeños ARNs de interferencia. Los virus recombinantes pueden construirse llevando un inserto de la secuencia del gen candidato. El virus recombinante pueden moverse sistémicamente en la planta produciendo ARNi que pueden mediar la regulación de la expresión de los transcritos génicos endógenos, lo que resulta en el silenciamiento de la expresión del gen candidato inoculado en la planta (Brigneti *et al.*, 2004). A este mecanismo se le denomina silenciamiento génico post-traduccional (PTGS, por sus siglas en inglés).

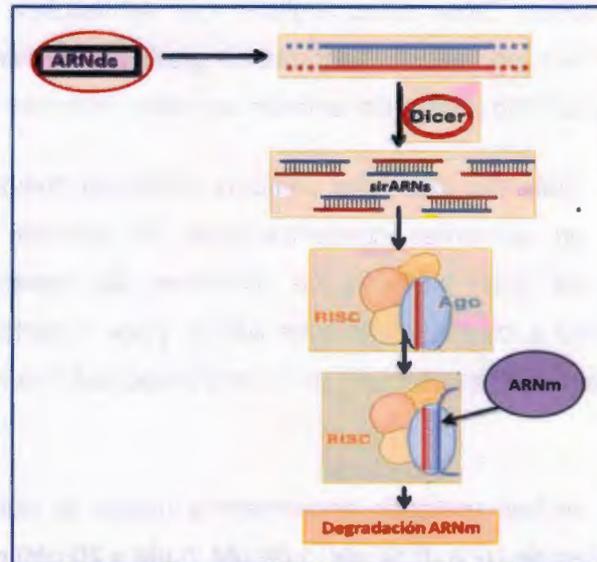


Figura 1.5. Mecanismo general del PTGS. Inicia con la síntesis de ARNsi a partir de la degradación del ARNdc mediada por la proteína DICER. El complejo RICS argonauta guía a los ARNi de cadena sencilla a que se unan por complementariedad de bases al ARNm para su degradación, impidiendo de esta manera la traducción del ARNm.

1.9.1. Mecanismo del Silenciamiento Génico Postranscripcional.

El PTGS es un mecanismo de defensa natural de las plantas mediado por pequeñas moléculas de ARN que participan en una interacción específica de secuencias para inhibir la expresión génica por medio del silenciamiento del ARNm. El PTGS es básicamente un fenómeno epigenético que da como resultado la degradación de secuencias específicas de ARNs mensajeros endógenos, y puede ser inducida por virus, transgenes o genes endógenos (Brigneti *et al.*, 2004). De manera general, el mecanismo de silenciamiento se lleva a cabo por el procesamiento de ARNs de doble cadena (ARNdc) en pequeños ARNsi mediados por la enzima DICER y la degradación del ARNm (Fig. 1.5) a través del ARNsi en el citoplasma.

De estos ARNsi generados por la enzima DICER, se incorpora una de las cadenas a la proteína argonauta, la cual forma parte del complejo de silenciamiento génico inducido por ARN (RISC). Los ARNsi de simple cadena, incorporados a RISC, localizan por complementariedad de bases a los ARNm y el silenciamiento es el resultado de la degradación nucleotídica del ARNm blanco por la ARNasa argonauta (Aravin y Tuschl, 2005).

HIPÓTESIS

Si durante el desarrollo del embrión cigótico el transporte polar de auxina es importante, entonces es posible que lo sea también durante el desarrollo del embrión somático.

OBJETIVO GENERAL

Estudio de algunos de los genes del transporte de auxinas durante la ES en *C. canephora*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión de los genes del transporte de auxinas *PIN1*, *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19* durante la ES
2. Establecer del protocolo de silenciamiento génico inducido por virus en *C. canephora*

JUSTIFICACIÓN

La ES es un proceso biológico en el cual se dan una serie de eventos morfológicos, bioquímicos y moleculares que llevan a la formación del embrión somático; sin embargo, los mecanismos que se encuentran involucrados durante el inicio del proceso no se conocen del todo o se sabe muy poco. El estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares durante la inducción de la ES nos permitirá identificar algunos de los factores involucrados en el proceso, y de esta forma contribuir al entendimiento y comprensión de los procesos que llevan a la formación de un embrión somático de tal manera que se puede aplicar para el mejoramiento genético en especies vegetales.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En este apartado se muestra la estrategia experimental que se diseñó para cumplir con los objetivos planteados en este trabajo.

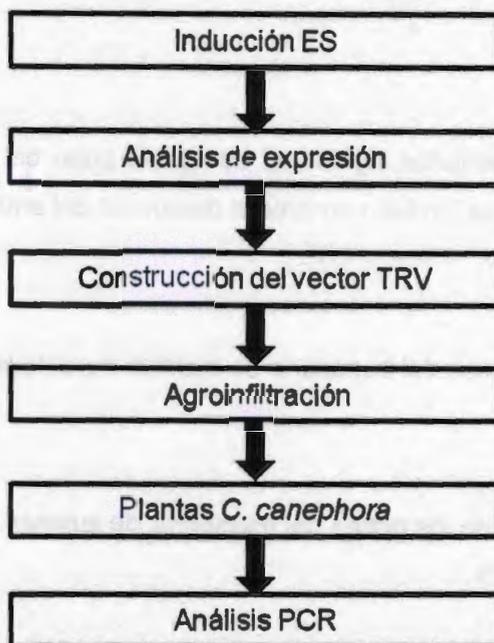


Figura 1.6. Se realizó la inducción de la ES y se recolectó cada estadio de desarrollo del embrión somático para hacer la extracción de ARN total y posteriormente la síntesis de ADNc. Una vez obtenidas las muestras se realizó el análisis de expresión genética de los genes *PIN1*, *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19* durante todo el proceso embriogénico. Después, la construcción del vector de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) para inocular las plantas y embriones de *C. canephora*, para finalizar la determinación del vector viral TRV mediante un análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

BIBLIOGRAFÍA

- Ammirato, P.V. (1974). The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway (*Carum carvil. L.*). *Botanical Gazette* ,135, 328-337.
- Anthony, F., Bertrand B., P. Lashermes y A. Charrier (1997). La biologie moléculaire en appui a l'amélioration génétique du caféier arabica. *Plantations, Recherche, Développement*, 6: 369-377
- Aravin, A. y T. Tuschl (2005). Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing. *FEBS Letters*, 579, 5830-5840.
- Bartel, B. (1997). Auxin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48: 51-66.
- Bartel, B. y G.R.Fink (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, 268, 1745-1748.
- Benková, E., M. Michniewicz, M.Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens y J. Friml (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591-602.
- Bertrand, B., C. Nuñez y J.L. Sarah (2000). Disease complex in coffee involving *Meloidogyne arabicida* and *Fusarium oxysporum*. *Plant Pathol* 49: 383-388.
- Bertrand, B., M.X Peña-Durán, F Anzueto, C. Cilas, H. Etienne, F. Anthony y A.B. Eskes (2000). Genetic study of *Coffea canephora* coffee tree resistance to *Meloidogyne incognita* nematodes in Guatemala and *Meloidogyne sp.* nematodes in El Salvador for selection of rootstock varieties in Central America. *Euphytica*, 113: 79-86.

-
- Brigneti, G., A.M. Martín-Hernández, H. Jin, J. Chen, D.C. Baulcombe, B. Baker y J.D.G. Jones (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *Plant Journal*, 39, 264-272.
- Dublin, P. (1981). Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25, 237-242.
- Hakman, I., H. Hallberg y J. Palovaara (2009). The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development. *Tree Physiology*, 29, 483-496.
- Jordán, M. y J. Casaretto (2006). Hormonas y reguladores de crecimiento: auxinas, giberelinas y citocininas. *Fisiología vegetal*, 15, 3-9.
- Kleine-Vehn, J., F. Huang, S. Naramoto, J. Zhang, M. Michniewicz, R. Offringa y J. Friml (2009). PIN auxin efflux carrier polarity is regulated by PINOID kinase-mediated recruitment into GNOM-independent trafficking in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21, 3839-3849.
- Laskowski, M., JM. Grienenberger, H. Hofhuis, C.A. Ten Hove, P. Hogeweg, A.F.M. Marée y B. Scheres (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *Plos Biology*, 6, e307.
- Litz, R.E. y R.L. Jarret (1991). Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. In WM Roca, LA Mroginski, eds, *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*, Ed 1. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Colombia, 143-172 p.
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1757-1773.

-
- Michniewicz, M., M.K. Zago, L. Abas, D. Weijers, A. Schweighofer, I. Meskiene, M.G. Heisler, C. Ohno, J. Zhang, F. Huang, R. Schwab, D. Weigel, E.M. Meyerowitz, C. Luschnig, R. Offringa y J. Friml (2007). Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, 130, 1044-1056.
- Nishimura, T., N. Matano, T. Morishima, C. Kakimuna, K. Hayashi, T. Komano, M. Kubo, M. Hasabe, H. Kasahara, Y. Kamiya y T. Koshiba (2012). Identification of IAA transport inhibitors including compound affecting cellular PIN trafficking by two chemical screening approaches using maize coleoptile systems. *Plant Cell Physiology*, 53, 1671-1682.
- Nolasco, M. (1985). *Café y sociedad en México*. Centro de Ecodesarrollo, México, pp 1-454.
- Petrásek, J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675-2688.
- Petrásek, J., K. Malínská y E. Zazimalová (2011). Auxin transporters controlling plant development. *Transporters and Pumps in Plant Signaling*. In M Geisler, K Venema, eds, *Transporters and pumps in plant signaling*. Springer, Berlin Heidelberg, 255-290.
- Quiroz-Figueroa, F.R., C.F.J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V.M. Loyola-Vargas (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20, 1141-1149
- Quiroz-Figueroa, F.R., M. Méndez-Zeel, F. Sánchez-Teyer, R. Rojas-Herrera y V.M. Loyola-Vargas (2002). Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. *Journal of Plant Physiology*, 159, 1267-1270.

-
- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos y V.M. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Rampey, RA., S. LeClere, M. Kowalczyk, K. Ljung, G. Sandberg y B. Bartel (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant Physiology*, 135, 978-988.
- Rashotte, A.M., J. Poupart, C.S. Waddell y G.K. Muday (2003). Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133, 761-772.
- Reinhardt, D., T. Mandel y C. Kuhlemeier (2000). Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, 12, 507-518.
- Rojas-Herrera, R., F.R. Quiroz-Figueroa, M. Monforte-González, F. Sánchez-Teyer y V.M. Loyola-Vargas (2002). Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L., revealed by RT-PCR differential display. *Molecular Biotechnology*, 21, 43-50.
- Staswick, P.E., B. Serban, M. Rowe, I. Tiryaki, M.T. Maldonado, M.C. Maldonado y W. Suza (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*, 17, 616-627.
- Swarup, R., E.M. Kramer, P. Perry, K. Knox, H.M.O. Leyser, J. Haseloff, G.T.S. Beemster, R. Bhalerao y M.J. Bennett (2005). Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nature Cell Biology*, 7, 1057-1065.
- Taiz, L. y E. Zeiger (1991). The Benjamin/Cummings Publishing, California. *Plant Physiology*, 1-559.

-
- Thimann, K.V. (1963). Plant growth substances; past, present and future. *Annual Review Plant Physiology*, 14, 1-19.
- Tusnady, G.E., B. Sarkadi, I. Simon y A. Varadi (2006). Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Letters*, 580, 1017-1022.
- Woodward, A.W. y B. Bartel (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95, 707-735.
- Yang, H. y A.S. Murphy (2009). Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Journal*, 59, 179-19.
- Zazimalová, E., A.S. Murphy, H. Yang, K. Hoyerová y P. Hosek (2010). Auxin transporters: why so many?. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*.
- Zimmerman, J.L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5, 1411-1423.



CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Introducción

La primera tarea desarrollada fue la de generar suficiente material vegetal para llevar a cabo todos los experimentos que se desarrollaron en este trabajo de investigación. Después se diseñaron los cebadores correspondientes para cada uno de los genes en estudio (*PIN1*, *PIN4*, *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19*). A continuación estos genes se amplificaron, se clonaron y se secuenciaron. Puesto que la metodología VIGS no está establecida para café, un objetivo central de este proyecto de investigación fue su establecimiento.

2.2. Material vegetal

2.3 Inducción de la embriogénesis somática

Para la inducción de la ES se partió de plantas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*, como se describió en la sección anterior. Se seleccionó un lote de plantas y se colocaron en medio semisólido de Murashige Skoog (MS) suplementadas con 0.54 μM de ácido naftalén acético (ANA) y 2.32 μM de kinetina (Kin), durante catorce días en condiciones de fotoperiodo (16h luz/8h oscuridad) a una temperatura de 25 ± 2 °C. A continuación, de abajo hacia arriba se tomaron las hojas dos y tres de las plantas de café y se cortaron en círculos de aproximadamente 0.25 cm diámetro los cuales se transfirieron a medio líquido de Yasuda complementado con 5 μM de benciladenina (BA) y se incubaron en la oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 °C y en agitación (100 rpm) por 56 días (Quiroz *et al.*, 2006).

2.4 Extracción del ADN genómico

El ADN genómico se extrajo de 100 mg de tejido foliar. Para ello se agregaron 50 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) al tejido y se maceró con nitrógeno líquido. Posteriormente, se adicionó un ml de amortiguador de extracción (200 mM Tris-HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS, a pH 7.5), y enseguida se agregaron 2 μl de β -mercaptoetanol. Se

incubó la mezcla por 10 minutos a 65 °C. Se adicionaron 2 µl de ARNasa (2 U/ µl) y la muestra se mantuvo en hielo durante 10 minutos. Después, la muestra se centrifugó por 15 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. A continuación, al sobrenadante se le adicionó, en una relación 1:1, cloroformo y se centrifugó de nuevo por 3 minutos a 13,000 rpm y se recuperó el sobrenadante. En seguida se agregó, en una relación 1:1, 10% de acetato de sodio (3 M, pH 5.2) y etanol absoluto en una relación 1:2 y se incubó la muestra a -20 °C por una hora. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm y la pastilla se lavó dos veces con etanol al 70%. La pastilla se dejó secar y se resuspendió en 30 µl de agua destilada. Para observar la integridad del ADN se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1% teñido con gel red.

2.5 Extracción del ARN total

Para la extracción del ARN total se usaron 100 mg de tejido fresco (hoja o embriones somáticos) utilizando el reactivo TRI (Sigma 93298). Se siguió el protocolo recomendado por el proveedor. La integridad del ARN se colaboró mediante una corrida electroforética en agarosa al 1% utilizando gel red como reactivo de tinción.

2.6 Síntesis de ADNc

Se utilizaron 5 µg de ARN total para realizar la síntesis de la primera cadena de ADNc utilizando el kit Súper Script II Reverse Transcriptase de Invitrogen y se siguió el protocolo recomendado por el proveedor.

2.7 Diseño de los cebadores para los genes de transporte de auxina

El diseño de los cebadores para analizar la expresión de los genes *PIN* en *C. canephora* (Cuadro 2.1) se realizó a partir de la consulta de las bases de datos: Genbank, Sol Genomics, y Tair (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, <http://solgenomics.net/>, <http://www.arabidopsis.org/>). Para el diseño de los cebadores se buscaron las secuencias consenso y se utilizó el programa primer 3plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi/>) para su diseño.

Cuadro 2.1. Cebadores diseñados para amplificar los transcritos de los genes del transporte de auxina.

Gen	Secuencia	Tm °C	Tamaño
PIN1	Sentido: 5'CCACGTGTTCCGGTGGTCCCG 3' Anti-sentido: 5'TTGCCATTGGCCTTCGCGGT3'	70	634 pb
PIN7	Sentido: 5'TGGGAATTCTGACACTGGGAGGCTG3' · Anti-sentido: 5'AAAGAGGGCCCCACAGGGCT3'	66	603 pb
ABCB1	Sentido: 5'GTGCGTGCAAGAAGCCCTGGA3' Anti-sentido: 5'TGGCTCAAGTTCCTCTGCACGTC3'	66	251 pb
ABCB19	Sentido: 5'GGCCTTGGTTGGGCAGAGTGG3' Anti-sentido: 5'AGCCACCAGTGCCCTCGATGT3'	66	420 pb

2.8 Amplificación de los genes del transporte de auxinas

La reacción en cadena de la polimerasa PCR, con cada uno de los cebadores correspondientes para cada gen estudiado, *PIN1*, *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19*, se utilizó ADN genómico. Las condiciones para *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19* fueron 95 °C 5 min (primer ciclo), 94 °C 45 s, 66 °C 40 s, 72 °C 1 min (35 ciclos) y para finalizar una extensión de 72 °C 10 min. Para amplificar *PIN1* la temperatura de alineamiento fue de 70 °C 40 s, las demás etapas fueron las mismas que se usaron en los otros genes.

2.9 Transformación de células de *E. coli* DH5α con el vector viral TRV

Descongelar las células *E. coli* DH5 competentes en hielo. Después añadir 5 µl de vector viral TRV e incubar en hielo durante 30 min. Someter las células a un choque térmico 1 min a 42°C, posteriormente incubar en hielo por 10 min. Añadir 500 µl de medio de cultivo líquido LB sin antibiótico e incubar 1 hora a 37 °C en agitación (200 rpm).

En cajas petri previamente ya hechas con medio de cultivo sólido LB suplementado con el antibiótico kanamicina a una concentración de 50 µg mL⁻¹ se le agrega 20 µl de las células *E. coli* y se incuba a 37°C toda la noche.

Para confirmar que las células *E. coli* DH5α están transformadas se realizó un análisis de PCR de colonia el cual consiste en seleccionar aquellas colonias que crecieron en las cajas petri y en un tubo para PCR que contiene la mezcla de reacción (agua bidestilada, dNTPs 10 mM, amortiguador para PCR 10x, MgCl₂ 50 mM, cebadores para amplificar el TRV, Tap polimerasa) se introducen las colonias seleccionadas.

Para amplificar el virus TRV se utilizaron los cebadores sentido 5'TTACTCAAGGAAGCACGATGAGC3' y reverso 5'GAACCGTAGTTTAATGTCTTCGGG3'.

Las condiciones para amplificar el TRV son: 95 °C 5 min (primer ciclo), 94 °C 45 s, 66 °C 40 s, 72 °C 1 min (28 ciclos) y para finalizar una extensión de 72 °C 10 min.

Sin embargo, esta prueba podría dar falsos positivos. Entonces se realizó un miniprep que consiste en la extracción del ADN plasmídico de aquellas colonias de *E. coli* seleccionadas. Se siguió el procedimiento recomendado por el proveedor del kit purelink™ quick plasmid miniprekit-Invitrogen. Y se realizó una PCR utilizando como muestra el ADN plasmídico. Las condiciones son las mismas que las anteriores.

2.9.1 Inoculación del vector TRV con la construcción *canPDS* mediante infiltración en embriones y plantas de *C. canephora*.

Para realizar la prueba VIGS, se utilizó al virus sonajero del tabaco (TRV), un vector viral modificado que lleva un fragmento del gen de la enzima fitoeno desaturasa de *Capsicum annuum canPDS* (Brigneti *et al.*, 2004); la PDS es una enzima involucrada en la ruta de biosíntesis de carotenoides como es la clorofila. Esta construcción TRV-*CanPDS* fue introducido en la cepa de *Agrobacterium* GV2260 (donados por el Dr. Ochoa Alejo del CINVESTAV Irapuato, Gto). Las cepas de *Agrobacterium* fueron cultivadas en medio líquido YEB suplementado con la mezcla de antibióticos, 50 µg mL⁻¹ kanamicina, 100 µg mL⁻¹ ampicilina, 100 µg mL⁻¹ rifampicina, a 28 °C durante 48 horas y resuspendidas en medio de infiltración (10 mM MgCl₂, 10 mM MES, 150 mM de acetosiringona) a una densidad óptica (D.O.) final de 0.8. Cada cepa de *Agrobacterium* contiene las construcciones TRV1 y TRV2 por separado. Para realizar la infiltración en hojas de *C. annuum*, se mezclaron 500 µL de cada una de las cepas que contienen a las construcciones TRV1 y TRV2. A continuación con una jeringa para insulina (sin la aguja) se agroinfiltraron los cotiledones de las plantas seleccionadas. Después de incubar por 16 días las plantas inoculadas se analizó su fenotipo y se tomaron muestras de tejido, tanto de las hojas de las plantas inoculadas, como de las hojas nuevas y fueron analizadas por PCR para determinar la presencia del vector viral TRV.

Para desarrollar la técnica VIGS en *C. canephora* se utilizaron embriones somáticos y plántulas de *C. canephora* de dos, cuatro, seis y ocho hojas verdaderas, cultivadas en condiciones de fotoperiodo (16/8 h luz-oscuridad) a 25 °C. Las plantas se trasplantaron en tierra por quince días en luz continua a una temperatura de 25 ± 2 °C y los embriones en medio MS semisólido sin RC y se incubaron en un cuarto con fotoperiodo (16/8 h luz-oscuridad) y a una temperatura de 25 ± 2° C. El resto de la técnica fue el mismo que el empleado para las plantas de *C. annum*, excepto que en este caso se infiltraron los cuatro pares de hojas de la planta estudiada.



BIBLIOGRAFÍA

- Brigneti, G., AM. Martín-Hernández, H. Jin, J. Chen, D.C. Baulcombe, B. Baker, J.D.G. Jones (2004). Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. *The Plant Journal*, 39, 264-272.
- Quiroz-Figueroa, F.R., M. Monforte-González, R.M. Galaz-Avalos, V.M. Loyola-Vargas (2006). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In VM Loyola-Vargas, FA Vázquez-Flota, eds, *Plant cell culture protocols*, Ed 2nd. Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117.



CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1 Amplificación de los posibles genes del transporte de las auxinas

Antes de llevar a cabo el análisis de expresión de los genes que codifican para los transportadores de auxinas en estudio se establecieron las condiciones para amplificar los cebadores correspondientes a cada gen. Para ello se utilizó ADN genómico de tejido foliar de *C. canephora*. Los resultados muestran que estos genes si están presentes en *C. canephora*; sin embargo, los tamaños obtenidos son mayores a lo esperado debido a que se utilizó ADN genómico y por lo tanto están presentes los intrones (Fig. 3. 1).



Figura 3.1. Amplificación de los genes de transporte de auxina en tejido foliar de *C. canephora*. **PIN1** mayor que 1,000 pb, **PIN7** 700 pb, **ABCB1** 250 pb, **ABCB19** 600 pb, testigo 18s ADN 300 pb. **MM** marcador de masa molecular.

3.3.2 Análisis de la expresión génica durante la ES en *C. canephora*

Dado que los *PIN* y *ABCB* son dos grandes familias de genes que codifican a las proteínas del transporte de auxinas es fundamental determinar su nivel de transcripción en diferentes tejidos y estadios de desarrollo en la planta. Por ello, determinamos el nivel de transcripción en hojas de plantas en condiciones de propagación *in vitro* (sin RC), masa proembriónica (día 28 de inducción), embriones en estadio globular, corazón, torpedo y cotiledonar. En primer lugar se determinó la calidad del ARN extraído (Fig. 3.2) y después se realizó la síntesis de ADNc.

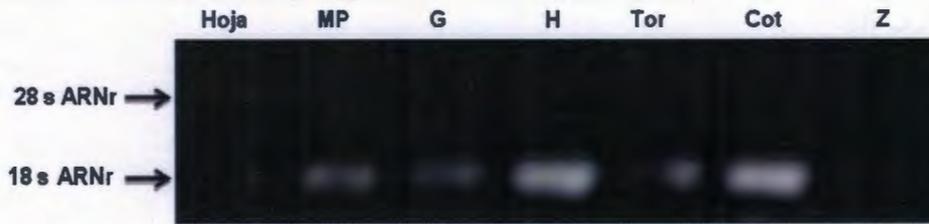


Figura 3.2. ARN total. Masa proembriogénica MP, embriones en estadios globular G, corazón H, torpedero Tor, cotiledonar Cot y cigótico Z. Las flechas indican la posición de los ARN ribosomales 28s y 18s, respectivamente.

Los resultados del análisis de la expresión génica de estos genes sugieren que al inicio de la inducción, así como también, durante el desarrollo embrionario existe una constante actividad transcripcional de los genes *PIN1*, *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19* (Fig. 3.3); estos transcritos están presentes durante todo el proceso de la embriogénesis somática en *C. canephora*. A diferencia de otros genes que están estrictamente regulados, es decir, genes que se activan al inicio pero que se reprimen durante el desarrollo o bien genes que solamente presentan actividad en algún momento específico durante el ciclo de vida de la planta.



Figura 3.3. Análisis de expresión génica de los posibles transportadores de auxina durante la embriogénesis somática en *C. canephora*. Para el estudio se utilizó ADNc. La flecha azul señala un tamaño de 600 pb aprox. mayor al esperado de 420 pb. MP masa proembriogénica, G globular, H corazón, Tor torpedero, Cot cotiledonar, Z cigótico y 18s ADN ribosomal como testigo.

Los transcritos de *PIN1* son más abundantes en la hoja, la masa proembriónica, los estadios de corazón y torpedo, en tanto que la transcripción del gen *ABCB1* fue más abundante en los estadios de corazón y torpedo (Fig. 3.3).

La expresión de estos cuatro genes también se detectó en el embrión cigótico; *PIN1* y *ABCB1* se expresan de manera más abundante que *PIN17* y *ABCB19*, los cuales apenas son visibles en los genes (Fig. 3.3).

La presencia de estos transcritos en el explante y durante todo el proceso de inducción de la ES, así como en los diferentes estadios de desarrollo embrionario, sugiere que hay un activo transporte de auxinas que es indispensable para el desarrollo del proceso embriónico. En consecuencia, la formación de un gradiente de concentración de auxina es una señal crucial durante la inducción y desarrollo del embrión.

Interesantemente, el transcrito que corresponde al transportador *ABCB19* (Fig. 3. 3, flecha azul) es de un tamaño aproximado de 600 pares de bases, cuando en realidad debería ser de un tamaño de 420 pb, esto, posiblemente por un procesamiento alternativo, pues se sabe que al inicio de la embriogénesis es una actividad genética esencial para el correcto desarrollo del embrión.

Estudios realizados con mutantes *ABCB1* en *Arabidopsis* no produce diferencia morfológica significativa. Sin embargo, mutantes en *ABCB19* muestra defectos muy graves como la fusión de órganos, crecimiento anormal de la planta y mediante estudios genéticos se sabe que *ABCB19* participa en la separación de órganos a través de la regulación de otros genes como *CUC* probablemente a través de la disminución de la auxina (Zhao *et al.*, 2013).

3.3.3 Análisis filogenético de algunos posibles ortólogos de la PDS de *C. canephora*

Como se mencionó con anterioridad, la construcción con el vector viral fue donada por el Dr. Neftalí Ocho Alejo del CINVESTAV, Irapuato, Gto, dicha construcción contiene la PDS de *Capsicum annuum* por lo que fue necesario hacer una búsqueda con diferentes especies y comparar las PDS de cada una para ver el nivel de homología con la PDS de *C. canephora*.

El estudio bioinformático arrojó que la PDS de *C. annuum* tienen un 90% de similitud con la PDS de *C. canephora* (Fig. 3.4) por lo que este resultado sugiere que la PDS de *C. canephora* pudiera ser silenciada utilizando la construcción de *C. annuum*. Cabe mencionar que también se analizó a nivel nucleótido y los resultados fueron los mismos que en aminoácidos (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que la PDS de *C. annuum* podría ser un ortólogo de la PDS de *C. canephora*.

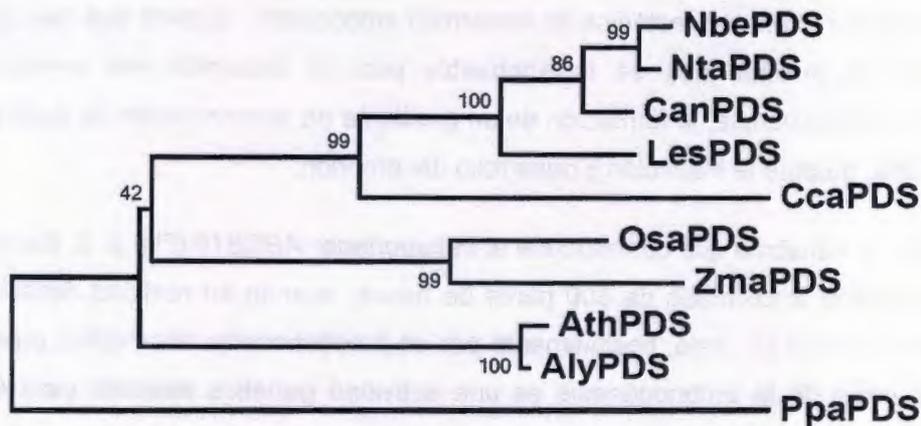


Figura 3.4. Árbol filogenético de algunos posibles ortólogos de la PDS de *C. canephora* *Cca*, *Nicotiana bentamiana* *Nbe*, *Nicotiana tabaco* *Nta*, *Capsicum annuum* *Can*, *Lycopersicum esculentum* *Les*, *Oryza sativa* *Osa*, *Zea maíz* *Zma*, *Arabidopsis thaliana* *Ath*. El análisis se realizó comparando la secuencia entre aminoácidos.

3.3.4 Transformación de células de *E. coli* DH5 α con el vector TRV2 vacío

La cepa de bacteria que se utiliza para realizar el silenciamiento VIGS es *E. coli* DH10B. Como en el laboratorio sólo contamos con la cepa DH5 α se realizó una transformación con esta cepa.

Se realizaron múltiples intentos para transformar la cepa DH5 α . Los intentos incluyeron el uso de electroporación, y choque térmico, sin embargo, se pudo transformar la cepa de bacteria DH5 α . Entre las variables que se estudiaron están el tiempo de la incubación en hielo y la temperatura durante el choque térmico. Una posible explicación es que el vector TRV es muy grande (10,000 pb) y le sea difícil atravesar los poros de la célula.

Tomando en consideración el tamaño, y la reducida cantidad del vector se optó por aumentar la cantidad del TRV2 cinco veces. Se usó choque térmico y no se modificó ninguna otra variable. Con estas condiciones se obtuvo una transformación exitosa y con una gran cantidad de colonias transformadas (Fig. 3.5). Es claro que la cantidad del vector influye consideradamente en la transformación.



Figura 3.5. Transformación de células de *E. coli* DH5α mediante choque térmico con el vector viral TRV2.

Para confirmar que las cepas DH5α estaban realmente transformadas con el vector viral TRV2, se realizó un análisis mediante la técnica de PCR en colonia. Los resultados muestran que las células si estaban transformadas, y en consecuencia contienen al vector TR2 (Fig. 3.6). Es importante mencionar que este experimento se realizó con el vector vacío y por lo tanto no lleva ningún inserto de algún gen en particular.



Figura 3.6. Determinación del vector viral TRV2 mediante PCR en colonia. El recuadro amarillo muestra la banca de amplificación del virus. **MM** marcados molecular de 100 pb, + testigo. Cada número indica una colonia analizada.

Una segunda confirmación de la transformación provino de la realización de un miniprep. En la figura 3.7 se muestra que el ADN plasmídico de la bacteria transformada DH5 α contiene el vector TRV (Fig. 3.7b).



Figura 3.7. Extracción de ADN plasmídico de células DH5 α transformadas con el vector TRV. **a)** ADN plasmídico de las cepas DH5 α transformadas mediante choque térmico con el TRV2 vacío (testigo). **b)** Determinación del virus TRV utilizando ADN plasmídico extraído de las células DH5 α transformadas.

3.3.5 Inoculación del vector viral con la construcción TRV-*CanPDS* mediante infiltración

Utilicé un vector viral basado en el virus del cascabel de tabaco TRV para el silenciamiento génico inducido por virus. Evalué la capacidad de infección del virus en plantas de *C. canephora* y si infecta, si es local o sistémica, así como también determiné si el TRV podría inducir el silenciamiento en las plantas de *C. canephora* suprimiendo la actividad PDS endógena.

Se utilizó una mezcla de cepas de *Agrobacterium* GV2260 que contienen por separado los componentes TRV1 y TRV2. El TRV2 contiene la PDS de *C. annuum*. Las hojas de *C. canephora* se infiltraron con la ayuda de una jeringa para insulina de un ml. Las plantas inoculadas, de aproximadamente cuatro meses de edad, tenían de cuatro a ocho hojas (Fig. 3.8). Como testigo se utilizaron plantas no inoculadas.

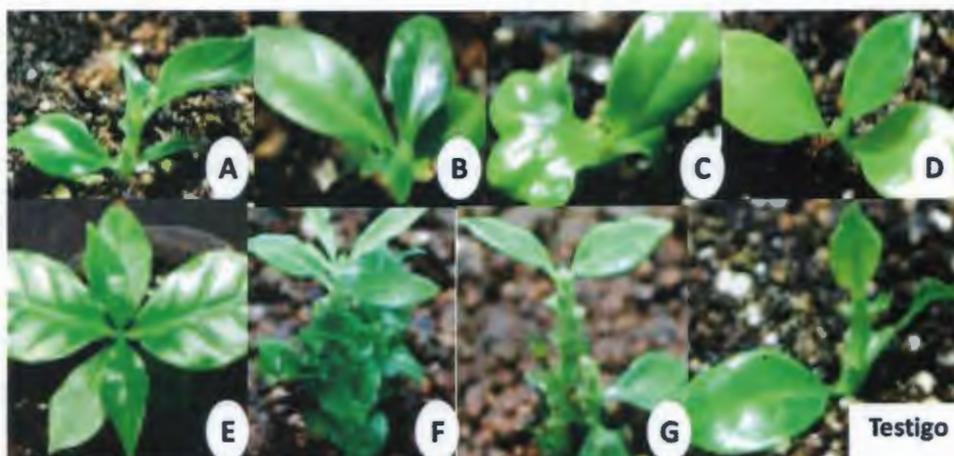


Figura 3.8. Plantas de café de cuatro meses de edad que contienen de cuatro (A, B, C, D) a ocho hojas (E, F, G,).

Los síntomas inducidos por el virus se observaron después de 16 días post-inoculación (Figura 3.9). Los síntomas típicos de una infección viral no fueron visibles; sin embargo, las plantas que tenían cuatro hojas fueron severamente afectadas y murieron posiblemente a causa de la virulencia de la cepa de *Agrobacterium* (Fig. 3.9 B, C, D). Las plantas que sobrevivieron a la inoculación fueron aquéllas que tenían ocho hojas y que no fueron inoculadas en todas su hojas (Fig. 3.9 E), ya que las plantas que fueron inoculadas completamente murieron (Fig. 3.9 F, G). Es importante destacar que una de las ventajas que tiene este virus es que no siempre presenta sintomatología, y depende de la especie infectada con este vector (Ratcliff, Martin y Baulcombe, 2001).

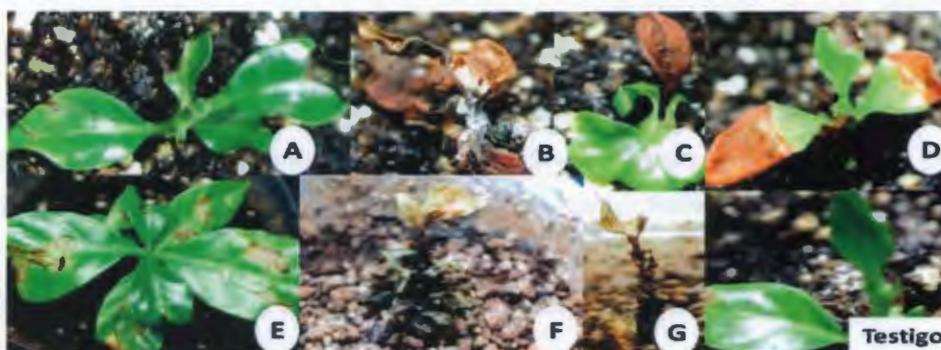


Figura 3.9. Plantas de *C. canephora* inoculadas con el vector viral TRV-*CanPDS* con un tiempo de 16 días pos-inoculación. Plantas necróticas A-D. Planta que sobrevivió a la infección F. Plantas completamente necrosadas G-H.

Después de 58 días de la inoculación, se realizó la extracción de ADN genómico de las hojas nuevas para hacer un análisis mediante PCR y determinar si el virus TRV las había infectado, y también ver si se había replicado y movido a través de la planta; cabe mencionar que esta prueba se realizó solo en las plantas que contaban con ocho hojas ya que fueron las únicas que sobrevivieron a la inoculación.

Los resultados de PCR fueron negativos, es decir, no se encontró el virus en las hojas nuevas (Fig. 3.10). Se sabe que el TRV infecta mejor en plantas jóvenes que tiene entre dos y cuatro hojas, así como también, el efecto del silenciamiento de la PDS endógena.

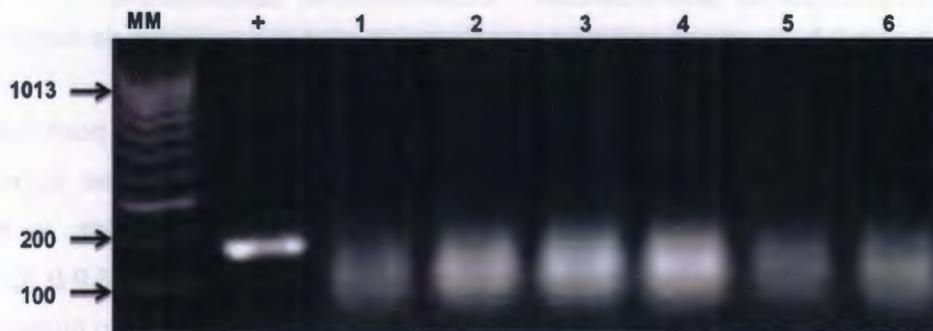


Figura 3.10. Gel de agarosa al 1% en el que se demuestra que el virus TRV no se encuentra en las plantas analizadas después de 58 días de inoculación. MM marcador molecular de 100 pb. + Testigo. Los números indican plantas individuales analizadas.

3.3.6 Inoculación del vector viral con la construcción TRV-*CanPDS* aplicando vacío

Como en el experimento anterior no se tuvo éxito, se recurrió a la estrategia de utilizar una bomba para hacer vacío para la inoculación, y de esta manera evitar el daño mecánico que sufren las plantas de café cuando son inoculadas con la jeringa. Se llevaron a cabo dos experimentos, el primero con embriones somáticos y el segundo con plantas de diferentes edades; esto con la intención de determinar si los embriones somáticos o las plantas pudieran ser infectados con el vector viral TRV mediante vacío.

Después de la inoculación con el TRV los embriones no mostraron síntomas visibles de la infección y 58 días después de la infección, los embriones ya estaban completamente necrosados (Fig. 3.11): Posiblemente la infección fue tan agresiva que los embriones somáticos no resistieron y sufrieron daños en todo el tejido, causándoles la muerte. Esto

sucedió así, probablemente, porque la inoculación fue en todo el embrión y la infección se diseminó por todas las células.

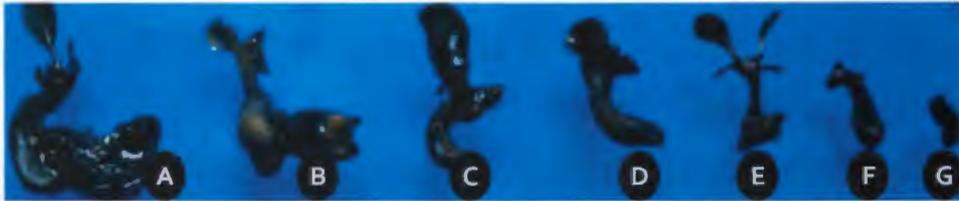


Figura 3.11. Embriones somáticos inoculados por vacío con el vector viral TRV. Todos los embriones inoculados se necrosaron. De la A hasta la G es el tamaño de los embriones y el número de hojas. La A es la más grande y así sucesivamente va disminuyendo hasta la G.

Por otro lado, las plantas inoculadas, de dos hasta ocho hojas, también por vacío, no mostraron los síntomas característicos de la infección viral (Fig. 3.12). Después de 58 días de la inoculación todas las plantas estaban vivas (Fig. 3.12).



Figura 3.12. Plantas de *C. canephora* después de 58 días inoculadas por vacío. Plantas inoculadas tenían ocho, seis, cuatro y dos hojas.

Es decir, mediante la aplicación de vacío se logró evitar el daño mecánico ocasionado por la jeringa en las hojas de las plantas. La edad así como las barreras físicas y químicas de la planta, además de no haber daño mecánico, fueron los factores que posiblemente favorecieron la sobrevivencia a la infección (Ali *et al.*, 2013).

Para confirmar que las plantas de café estaban infectadas con el virus TRV, se realizó la extracción de ADN y posteriormente, mediante una prueba por PCR la determinación de la presencia del virus.

La prueba de PCR confirmó la presencia del vector viral TRV en las plantas de café después de los 58 días de la inoculación (Fig. 3.13). Sin embargo, esto no nos asegura

que el virus se propagó o logró infectar a las plantas de café por este medio, pues recordemos que la inoculación fue por vacío, es decir, las plantas fueron introducidas en medio líquido que contiene la cepa GV2260 de *A. tumefaciens* y ésta a su vez contiene el vector viral TRV. Por lo que nuestros resultados sugieren que posiblemente la detección del virus se debió a que la presencia del vector fue por el líquido que quedó en la superficie de toda la planta de café. Además, cuando se extrajo el ADN, fue de toda la planta y no sólo de las hojas nuevas.

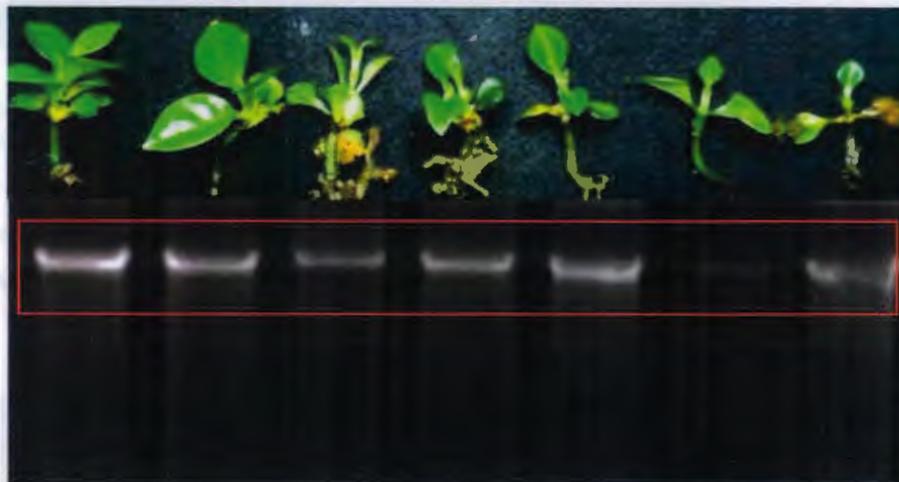


Figura 3.13. ADN genómico de las plantas de café inoculada por vacío después de 58 días. La banda indica la presencia del virus.

Cabe destacar que el VIGS basado en el vector TRV solamente se ha reportado en diferentes especies de Solanáceas y en algunas Phavaceas (Senthil *et al.*, 2007). Por lo que es importante probar que el vector y la técnica en su conjunto funcionan adecuadamente.

Para comprobar que el sistema de silenciamiento génico, basado en el vector viral TRV, funciona se realizó un experimento utilizando como planta hospedera a *C. annuum*. Para ellos se inocularon plantas de *C. annuum* que tenían dos hojas verdaderas. Después de dos semanas de la inoculación, se observaron los síntomas ocasionados por el virus (Fig. 3.14). Todas las plantas estaban infectadas por el virus TRV y en algunos casos los síntomas eran muy severos (Fig. 3.14 C, F, G). El testigo (Fig. 3.14, testigo) fue inoculado con el vector vacío no mostró ningún signo de daño por el manejo mecánico de la planta.

Para confirmar que el virus TRV estaba presente en las plantas de *C. annuum* se analizaron diferentes tejidos de las plantas como las hojas inoculadas, las hojas nuevas y el tallo mediante PCR (Fig. 3.15). Los resultados mostraron que efectivamente el virus TRV infecta a plantas de *C. annuum* pues el virus se pudo detectar en todos los tejidos analizados (Fig. 3.15).

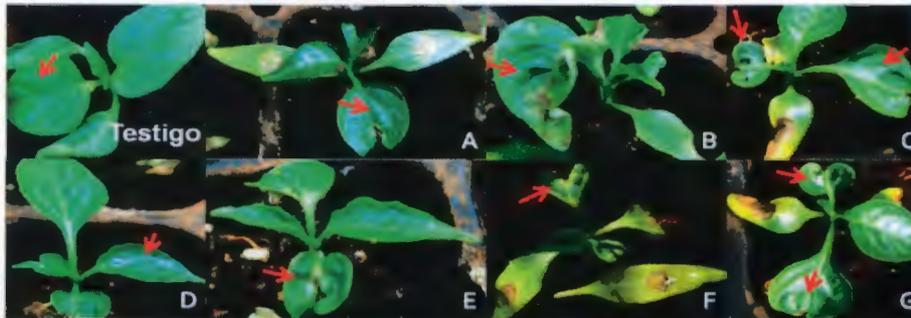


Figura 3.14. Plantas de *C. annuum* infectadas con el vector viral TRV después de 15 días post-inoculación. Las flechas en color rojo muestran la sintomatología ocasionada por el virus. Las letras solo indican la cantidad de plantas inoculadas.

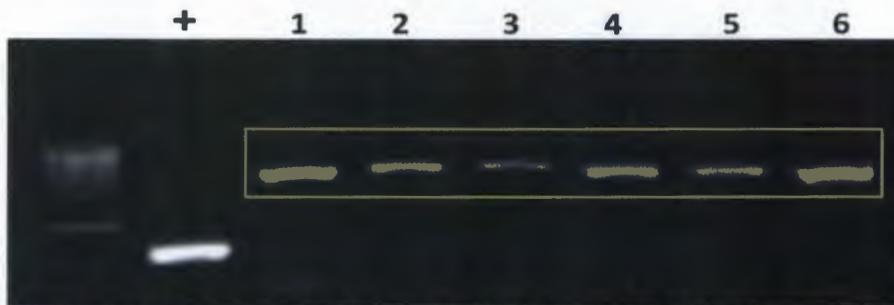


Figura 3.15. Determinación del virus TRV 15 días pos-inoculación en plantas de *C. annuum*. El signo positivo (+) es el virus vacío, es decir, sin el fragmento del gen de la PDS. Los números indican el número de plantas analizadas.

En trabajos previos, en los cuales se han utilizado como modelo *C. annuum* o *A. thaliana*, (Burch *et al.*, 2004) el silenciamiento del gen PDS endógeno da como resultado un fenotipo de hojas de color blanco por la ausencia de carotenos. Esto sucede porque el fragmento del gen PDS, que está contenido en el vector viral TRV, tiene un alto porcentaje de similitud con el gen endógeno de la planta y produce su silenciamiento

(Senthil *et al.*, 2007). Como puede apreciarse en la figura 3.16 las hojas de la planta muestran claramente que se produce el apagamiento del gen de la PDS.

Otro aspecto importante de los vectores VIGS es que se mueven a través de la planta. Es decir, una vez que se lleva a cabo la infección, el virus se moverá y deberá estar presente en las hojas nuevas, aquellas hojas que no estaban presentes cuando se llevó a cabo la inoculación. En nuestro caso, como se puede apreciar en la figura 3.17 esto es lo que sucede.



Figura 3.16. Silenciamiento génico inducido por virus en plantas de *C. annuum*. Las flechas en color rojo señalan las hojas color amarillo como resultado del silenciamiento del gen PDS endógeno de la planta. De A-C hojas completamente amarillas y B dos hojas en inicio del fenotipo.



Figura 3.17. Análisis de Determinación del vector viral TRV. a) planta de *C. annuum* inoculada con el TRV. Las fechas de color rojo señalan el tipo de tejido que se analizó para determinar la presencia del virus. b) Gel de agarosa con los productos de PCR que confirman la presencia del virus TRV en los tres tejidos analizados hojas nueva, hojas inoculadas y tallo.

Todas las hojas nuevas analizadas, en mayor o menor medida muestran presencia del virus (Fig. 3.17 b). Estos datos muestran claramente que en el sistema de *C. annuum* el sistema VIGS funciona perfectamente.

BIBLIOGRAFÍA

- Ali, M.A., Amjad-Abbas, D.P. Kreil y Holger-Bohlmann (2013). Overexpression of the transcription factor RAP2.6 leads to enhanced callose deposition in syncytia and enhanced resistance against the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *BMC Plant Biology*, 13, 1-17.
- Burch-Smith, T.M., Anderson J.C., Martin G.B. y Nesh-Kumar S.P. (2004). Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. *Plant J*, 39: 734-746.
- Ratcliff, F., A.M. Martin-Hernandez y D.C. Baulcombe (2001). Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. *The Plant Journal*, 25, 237-245.
- Senthil-Kumar, M., R. Hema, A. Anand, L. Kang, M. Udayakumar y K.S. Mysore (2007). A systematic study to determine the extent of gene silencing in *Nicotiana benthamiana* and other solanaceae species when heterologous gene sequences are used for virus-induced gene silencing. *New Phytologist*, 176, 782-791.
- Zhao, H., L. Liu, H. Mo, Y. Cao (2013). The ATP-Binding Cassette Transporter ABCB19 Regulates Postembryonic Organ Separation in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 8.

CAPÍTULO IV

4.1 DISCUSIÓN GENERAL

La ES es un proceso biológico que se puede llevar a cabo en la naturaleza, pero también puede llevarse a cabo en condiciones *in vitro*. En este proceso la célula desarrolla su totipotencialidad y puede producir una planta completa a través de la formación de un embrión. En el café este proceso se puede dar de dos maneras, directa e indirecta (Quiroz *et al.*, 2006). Sin embargo, se requiere de la presencia de RC, principalmente de auxinas como el AIA, el 2,4-D y ANA. Las auxinas son producidas en el meristemo apical y participan en diferentes procesos fisiológicos, para ello requieren de proteínas para su transporte. Su transporte es muy complejo y participan desde la difusión pasiva, hasta proteínas como las de tipo PIN y los transportadores ABC (Petrasek y Friml, 2009).

En *A. thaliana* se ha reportado la existencia de ocho proteínas del transporte de auxinas tipo PIN y su localización en la membrana plasmática es crucial para el correcto desarrollo del embrión cigótico (Zazimalová *et al.*, 2010). Petrasek y Friml (2009) señalan que durante el desarrollo del embrión cigótico en *A. thaliana* participan tres proteínas tipo PIN que median el flujo de auxina, estas proteínas son PIN1, PIN4 y PIN7, y son necesarias para establecer un gradiente de concentración para el establecimiento de la polaridad.

Este mismo grupo demostró que el transportador PIN1 es clave en la distribución de auxina durante la formación del proembrión. Por otro lado, durante el estadio globular PIN7, junto con PIN4, invierten el flujo del transporte de auxina hacia la hipófisis.

En *A. thaliana* específicamente en el estadio de corazón se observa una alta concentración de auxina en dos células del protodermo que darán origen a los futuros cotiledones, esta función es llevada a cabo por PIN1 (Michniewicz, Brewer y Friml, 2007).

Durante la inducción de la ES en *C. canephora* se analizó la expresión de los transportadores *PIN1* y *PIN7* y éstos se encuentran activos durante todo el proceso embriogénico. Bajo las condiciones de estudio no se pudo determinar la presencia de *PIN4*, desde luego, una posibilidad es que los cebadores pudieran haber estado mal diseñados, o el resultado es real, y no se encuentra activo durante el proceso

embriogénico durante la ES de *C. canephora*.

En relación con los transportadores de la familia ABCB se sabe que son proteínas ampliamente distribuidas entre todos los organismos tanto procariontes como eucariontes los cuales se caracterizan por la unión e hidrólisis de ATP (Zazímalová et al., 2010). Otra de sus características es que son proteínas transmembranales que se encuentran altamente conservadas entre diferentes organismos (Tusnady et al., 2006).

Algunas de las proteínas ABC, al igual que los PINs en las plantas, también transportan auxinas. Durante el desarrollo de la embriogénesis cigótica en *A. arabidopsis* tanto ABCB1 como ABCB19 participan en el transporte de las auxinas. ABCB1 se encuentra activo en todas las células del suspensor y del proembrión pero no así ABCB19 que está presente sólo en las células del proembrión (Petrásek, Malínská, y Zazímalová, 2011). En este trabajo se demuestra que tanto ABCB1 como ABCB19 se encuentran activos durante todo el desarrollo del embrión somático.

Por otra parte, en este trabajo se están comparando dos procesos fisiológicos aparentemente similares, la embriogénesis cigótica y la ES, y si bien morfológicamente son procesos similares, desde el punto de vista molecular posiblemente no lo son. Precisamente en esto recae la novedad e importancia de este trabajo. Este es el primer trabajo en el que se estudian estos transportadores durante la inducción de la ES del café. También es el primer trabajo en el que no sólo se estudia el inicio de la ES, sino que abarca todos los estadios de desarrollo del embrión.

También, en este estudio utilizamos el sistema VIGS para tratar de apagar la expresión de los genes en estudio. Este sistema de apagamiento de genes inducido por virus (like virus-induced gene silencing) ayuda en el estudio de genes de función desconocida. Este sistema funciona por medio de un mecanismo de silenciamiento post-transcripcional al degradar de manera secuencia-específica al ARNm blanco. Para que esto suceda, se introduce en el vector VIGS parte de la secuencia del gen en estudio. La infección y la dispersión sistémica de este virus recombinante causan el silenciamiento específico del gen hospedero correspondiente. Este sistema permite el silenciamiento de cualquier gen en menos de tres semanas.

Se han usado diferentes virus para desarrollar los vectores VIGS como el del virus del mosaico del tabaco (TMV), virus X de la papa (PVX), el virus del mosaico dorado del jitomate (TGMV) y el virus del cascabel del tabaco (TRV). Este último parece ser el mejor de los cuatros vectores (Senthil *et al.*, 2007). Sin embargo, como probamos durante esta investigación, este sistema no es efectivo en café.

Pueden existir diferentes razones para que un sistema de esta naturaleza no funcione. En particular, la más importante es la relación hospedero-virus. Nuestros datos sugieren que el TRV no es bien recibido por el cafeto o también es posible que en esta planta el virus sea reconocido inmediatamente por la planta activando su mecanismo de defensa para evitar de esta manera la infección viral (Ali *et al.*, 2013). Por ello, deberán utilizarse otras alternativas para utilizar el sistema VIGS en este modelo.

Como alternativa al sistema VIGS se pueden estudiar estos genes empleando otras técnicas moleculares como el silenciamiento por ARN antisentido puesto que ya se tiene el sistema de transformación del cafeto con *A. tumefaciens* (Canché *et al.*, 2006, Arroyo *et al.*, 2008).

Es claro que algunos de los transportadores PIN y ABCB se expresan durante la inducción de la ES y en los diferentes estadios de desarrollo. Los genes estudiados se expresan desde la masa proembriogénica hasta el estadio de torpedo. PIN7 ya no se expresa en este último estadio. También es importante resaltar que, como podría esperarse, el nivel de su expresión varía a lo largo del desarrollo del embrión somático. Esta es la primera determinación que se realiza de genes que codifican para transportadores de auxinas en el proceso embriogénico en cafeto.



BIBLIOGRAFIA

- Ali, M.A., Amjad-Abbas, D.P. Kreil y Holger-Bohlmann (2013). Overexpression of the transcription factor RAP2.6 leads to enhanced callose deposition in syncytia and enhanced resistance against the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis* roots. *BMC Plant Biology*, 13, 1-17.
- Arroyo-Herrera, A., A. Ku-Gonzalez, R. Canche-Moo, F.R. Quiroz-Figueroa, V.M. Loyola-Vargas, L.C. Rodriguez-Zapata, C. Burgeff-D'Hondt, V.M. Suárez-Solis y E. Castaño (2008). Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 94, 171-180.
- Canché-Moor, R.L.R., A. Kú-González, C. Burgeff, V.M. Loyola-Vargas, L.C. Rodríguez-Zapata y E. Castaño (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 84, 373-377.
- Michniewicz, M., P.B. Brewer y J. Friml (2007). Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book* e0108.
- Petrásek, J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675-2688.
- Petrásek, J., K. Malínská y E. Zazimalová (2011). Auxin transporters controlling plant development. *Transporters and Pumps in Plant Signaling*. In M. Geisler, K. Venema, eds, *Transporters and pumps in plant signaling*. Springer, Berlin Heidelberg, 255-290.
- Quiroz-Figueroa, F.R., M. Monforte-González, R.M. Galaz-Avalos y V.M. Loyola-Vargas (2006). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In V.M. Loyola-Vargas, F.A. Vázquez-Flota, eds, *Plant cell culture protocols*, Ed 2nd. Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117.

Senthil-Kumar, M., R. Hema, A. Anand, L. Kang, M. Udayakumar y K.S. Mysore (2007). A sistematic study to determine the extent of gene silencing in nicotiana benthamiana and other solanaceae species when heterologuos gene sequences are used for vuris-induced gene silencing. *New Phytologits*, 176, 782-791.

Tusnady, G.E., B. Sarkadi, I. Simon. y A. Varadi (2006). Membrane topology of human ABC proteins. *FEBS Lett*, 580: 1017-1022.

Zazímalová, E., A.S. Murphy, H. Yang, K. Hoyerová y P. Hosek (2010). Auxin transporters: why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*,2.

CAPITULO V

5 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES.

1. Durante la ES en *C. canephora* los genes de transporte de auxinas *PIN1*, *PIN7*, *ABCB1* y *ABCB19* se encuentran activos durante todo el proceso de la inducción hasta el estadio cotiledonar, excepto en el caso de *PIN7* que ya no se encuentra en el último estadio.
2. Si bien el análisis filogenético indicó que la PDS de *C. annuum* tiene un 99% de homología con la PDS de *C. canephora*, los resultados con el VIGS en café no fue efectivo.
3. Es posible transformar la cepa *E. coli* DH5 α con el vector viral TRV mediante choque térmico.
4. Los diferentes cambios que se realizaron al método de agroinfiltración no fueron satisfactorios.
5. El vector viral TRV no infecta a *C. canephora*.
6. Es posible que la especie *C. canephora* tenga un mecanismo de defensa eficiente contra el virus TRV impidiendo la infección sistémica.

5.2 PERSPECTIVAS.

Este trabajo de investigación ha sido pionero en el uso de las técnicas VIGS en café y en el estudio de la expresión de los genes que codifican para los diferentes transportadores de auxinas. Por ello se generaron una serie de perspectivas que se enlistan a continuación.

1. Determinar la expresión de los genes descritos anteriormente en este trabajo en los días del 0 hasta el día -14 de la inducción de la ES.
2. Realizar la localización espacio-temporal de estos genes durante ES.
3. Determinar la localización de las proteínas transportadoras de auxinas en los diferentes tipos de células que forman al embrión somático.
4. Proceder a la construcción de diferentes vectores para realizar del silenciamiento génico mediante ARN de anti-sentido.