

**MAESTRÍA EN CIENCIAS Y
BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS**

**Efecto del homobrasinólido en la expresión del
gen *CDKA* en explantes cultivados *in vitro* de
Cocos nucifera L.**

**Tesis que para obtener el grado de Maestro en Ciencias y
Biotecnología de Plantas**

presenta :

José Francisco Rodríguez Paredes

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2005

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por el apoyo económico otorgado a través del PIFOP y de la beca de manutención (Reg. 173388). Así como por su financiamiento para la realización del presente trabajo a través del proyecto P43834-Z de ciencias básicas "Caracterización de genes involucrados en el ciclo celular y el desarrollo en explantes de cocotero (*Cocos nucifera* L.) cultivados *in vitro*".

Al Dr. Luis Sáenz Carbonell por haber aceptado dirigir este trabajo, así como por su amistad y valiosos consejos.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por darme la oportunidad de superarme.

A Iván Córdova Lara por su asesoría en los ensayos de cuantificación de la expresión temporal. A José Luis Chan por su apoyo en el cultivo *in vitro*. A la Dra. Caroline Burgeff por su asesoría en la hibridación *in situ*. A la M.C. Adriana Quiroz Moreno por su apoyo en histología. A Mary Narváez y Tere Pérez por su entrenamiento en técnicas moleculares.

A los miembros del comité tutorial y revisores de la tesis, Dr Carlos Oropeza Salín, Dra. Caroline Burgeff, Dr. Carlos Fuentes Cerda y Dr Alfonso Azpeitia por sus recomendaciones durante el desarrollo del presente trabajo.

Al grupo de cocotero por su constante apoyo, sugerencias y recomendaciones.

A mis compañeros y amigos de la generación, Mildred, Cecilia, Manuel, Paty, Neyi, Susana, Lupita, Niurka y Yumi por compartir sus conocimientos y su experiencia.

Al Dr. Omar Zapata por la revisión y comentarios al texto, así como el financiamiento parcial para la impresión de la presente tesis.

A todas aquellas personas que con su granito de arena contribuyeron a la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, mis hermanos y mi sobrino.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE CUADROS	iii
LISTA DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vii
INTRODUCCION	1
CAPITULO I. ANTECEDENTES	9
1.1 EL COCOTERO.....	9
1.1.1 Descripción taxonómica.....	9
1.1.2 El cultivo del cocotero.....	11
1.1.3 Utilización del cocotero.....	12
1.1.4 El cultivo del cocotero en México	12
1.1.5 Problemática del cultivo.....	13
1.1.6 Alternativas para la propagación convencional.....	15
1.1.7 Micropropagación	16
1.1.8 Formación de callo embriogénico.....	19
1.1.9 Formación de embriones somáticos.....	19
1.1.10 Formación de plántulas.....	19
1.2 EL CICLO CELULAR.....	21
1.2.1 Regulación del ciclo celular	22
1.2.2 Proteínas reguladoras de la fase G1.....	23
1.2.3 Relación del ciclo celular con la morfogénesis.....	29
1.3 LOS BRASINOESTEROIDES	30
1.3.1 Definición	30
1.3.2 Efectos fisiológicos	32
1.3.3 Percepción de los brasinoesteroides en la célula	33
1.3.4 Efecto de los brasinoesteroides sobre el ciclo celular.....	35
1.3.5 Efecto de los brasinoesteroides en la morfogénesis in vitro	39

1.4	JUSTIFICACION.....	41
1.5	HIPOTESIS	42
1.6	OBJETIVOS	42
1.7	LITERATURA CITADA.....	43
CAPITULO II. ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS IN VITRO		61
2.1	INTRODUCCION.....	61
2.2	MATERIALES Y METODOS.....	62
2.2.1	<i>Diseño de tratamientos y condiciones de cultivo.....</i>	<i>63</i>
2.3	RESULTADOS	64
2.3.1	<i>Experimentos realizados con explantes de plúmula</i>	<i>64</i>
2.3.2	<i>Efecto del HBR en estructuras embriogénicas como explantes</i>	<i>67</i>
2.3.3	<i>Formación de embriones somáticos.....</i>	<i>69</i>
2.4	DISCUSIÓN.....	70
2.5	LITERATURA CITADA	73
CAPITULO III. EFECTO DEL HBR SOBRE LA EXPRESION DEL GEN CDKA		77
3.1	INTRODUCCION.....	77
3.2	MATERIALES Y METODOS.....	80
3.2.1	<i>Colecta de material vegetal</i>	<i>80</i>
3.2.2	<i>Cuantificación relativa de la expresión de CDKA.....</i>	<i>80</i>
3.2.3	<i>Análisis de productos amplificados por PCR.....</i>	<i>81</i>
3.3	RESULTADOS	82
3.3.1	<i>Estandarización de la técnica de PCR cuantitativa</i>	<i>82</i>
3.3.2	<i>Expresión de CDKA en callos originados de plúmula</i>	<i>85</i>
3.3.3	<i>Expresión de CDKA en callos originados de estructuras embriogénicas.....</i>	<i>87</i>
3.4	DISCUSION.....	89
3.5	LITERATURA CITADA	92
CAPITULO IV. DETERMINACION DE LA EXPRESION ESPACIO-TEMPORAL DE CDKA.....		97
4.1	INTRODUCCION.....	97
4.2	MATERIALES Y METODOS.....	98

4.2.1	<i>Preparación de las muestras</i>	98
4.2.2	<i>Síntesis de la sonda marcada con digoxigenina</i>	99
4.2.3	<i>Hibridación in situ</i>	100
4.3	RESULTADOS	101
4.3.1	<i>Síntesis de la sonda</i>	101
4.3.2	<i>Optimización del protocolo de hibridación</i>	102
4.4	DISCUSION.....	109
4.5	LITERATURA CITADA	112
V.	DISCUSION GENERAL	117
VI.	CONCLUSIONES GENERALES	129
VII.	PERSPECTIVAS	130
VIII.	ANEXOS	131
8.1	PROCEDIMIENTOS PARA EL ANALISIS DE LA EXPRESION RELATIVA	131
8.1.1	<i>Extracción de ARN total</i>	131
8.1.2	<i>Tratamiento con Desoxiribonucleasa I</i>	131
8.1.3	<i>Cuantificación espectrofotométrica</i>	132
8.1.4	<i>Obtención de ADNc</i>	132
8.2	PROCEDIMIENTOS PARA EL ANALISIS DE LA EXPRESION ESPACIO TEMPORAL	133
8.2.1	<i>Preparación de las muestras</i>	133
8.2.2	<i>Síntesis de la ribosondas marcadas con digoxigenina</i>	134
8.2.3	<i>Protocolo de hibridación in situ</i>	139
8.2.4	<i>Lavados</i>	140
8.2.5	<i>Detección</i>	140

RESUMEN

La creciente demanda de palmas de cocotero resistentes a enfermedades requiere de la multiplicación masiva de palmas mejoradas o seleccionadas. Esta situación puede ser resuelta con la micropropagación. Se ha reportado un protocolo reproducible de regeneración vía embriogénesis somática a partir de explantes de plúmula, pero su eficiencia es aún baja. El protocolo está basado en el uso de una auxina para inducir la formación de callo embriogénico. Ya que se sabe que los BRs actúan sinérgicamente con las auxinas y podrían estar involucrados en el control de la embriogénesis vegetal, se probó el efecto del HBR en el desarrollo de callo inicial, callo embriogénico y la formación de embriones somáticos en explantes de plúmula con resultados positivos. Sin embargo, poco se sabe acerca del modo de acción de los BRs. El objetivo de este trabajo fue estudiar si el efecto estimulador del HBR sobre la formación de callo embriogénico y de embriones somáticos está asociado con un incremento en la expresión del gen *CDKA*, clave en el control de los eventos del ciclo celular. Se establecieron tres experimentos usando como explantes plúmulas y estructuras embriogénicas globulares. Los explantes fueron expuestos a tres concentraciones de HBR (durante 3 d de pre-cultivo 0.01, 0.1 y 1.0 μM). Los explantes respondieron favorablemente a los BRs incrementando su capacidad de formar callo embriogénico y embriones somáticos. Se determinó la expresión de *CDKA* mediante la técnica de RT-PCR cuantitativo; se utilizaron iniciadores del gen *18S* como normalizador. Los resultados mostraron que el HBR incrementó

hasta ocho veces la expresión del gen *CDKA* respecto al control en callos embriogénicos procedentes de plúmula. Los callos no embriogénicos mostraron una disminución en la expresión de *CDKA* aún en presencia del HBR. Por otra parte, se estableció un protocolo de hibridación *in situ* para la detección de las células que expresan este gen. Muchos resultados indican la presencia de ruido de fondo, otros mostraron un patrón regular de la expresión de *CDKA* aportando evidencias de un proceso morfogénico ordenado.

ABSTRACT

The increasing demand for coconut palms resistant to diseases requires massive multiplication of improved or selected palms. This could be achieved through micropropagation. A reproducible regeneration protocol via somatic embryogenesis from plumule explants has been reported already, but its efficiency is still low. The protocol is based on the use of an auxin to induce embryogenic callus. Since brassinosteroids are known to act synergistically with auxins and might be involved in the control of plant embryogenesis, the effect of the brassinosteroid 22(S), 23(S)-homobrassinolide (HBR) on initial callus, embryogenic callus and somatic embryo formation in coconut plumule explants was tested with positive results. However little is known about how the BRs are acting. The aim of this work was to study if the stimulatory effect of HBR on embryogenic calli and somatic embryo formation was associated with an increase in the *CDKA* expression, key on control of cell-cycle events. Three experiments using plumules and embryogenic structures from embryogenic calli were established. The explants were exposed to different concentrations (0.01, 0.1, and 1 μ M) of the HBR (during a 3 d pre-culture). The plumule explants responded favorably to the HBR increasing their capacity to form embryogenic calli and somatic embryos with embryogenic structures, respectively. The expression of *CDKA* was determined by quantitative RT-PCR using primers of the ribosomal subunit 18S as normalizer. The results shown clearly that the HBR induced as high as eight times expression of the *CDKA* gene over control, in embryogenic calli derived from coconut in

vitro tissue culture. Non-embryogenic calli showed a decrement on the *CDKA* expression even with HBR. On the other hand an *in situ* hybridization protocol was established in order to detect the type of cells that were expressing this gene. Some results had background signal, but others could be analyzed, showing a regular pattern of *CDKA* into calli tissues.

INTRODUCCION

El cocotero ocupa un lugar importante en la economía mundial como cultivo de subsistencia en las zonas tropicales y subtropicales. La copra es el principal producto del cocotero y junto con la semilla de la palma aceitera (*Elaeis guineensis*) son las únicas fuentes de ácidos grasos de cadena corta (de 8 a 14 átomos de carbono; Berger y Ong, 1985). El aceite extraído contiene alrededor de 48% de ácido láurico el cual es utilizado en la fabricación de jabones, por la industria de los cosméticos y en confitería. Por otra parte este cultivo presenta una problemática muy particular en cada país que lo produce. Así se tiene por ejemplo que en México, en la década pasada las poblaciones de cocotero sufrieron una enfermedad denominada AL que las afectó gravemente en las costas de la Península de Yucatán, y que continúa su avance hacia los estados de Tabasco y Veracruz. La dispersión del AL en México ha devastado las áreas productoras del Golfo de México, transformando los paisajes drásticamente, debido a la alta susceptibilidad de los materiales plantados. Por otro lado, en el Pacífico las poblaciones son muy antiguas y necesitan ser renovadas, por lo que se ha venido generando en ambas zonas una enorme demanda potencial de palmas para los próximos años. A pesar del desarrollo de nuevas prácticas agronómicas, los rendimientos generalmente están por debajo de su potencial y por otra parte, tampoco se tienen materiales mejorados más allá de los híbridos resistentes o tolerantes al AL.

En los últimos años estos aspectos han recibido una considerable atención, sin embargo, actualmente el enfoque se está dirigiendo hacia técnicas biotecnológicas de mejoramiento recién desarrolladas que puedan beneficiar la industria del cocotero. Las técnicas tradicionales de mejoramiento genético usadas en el cocotero han producido material mejorado, pero su propagación por semilla resulta insuficiente para las necesidades actuales. Por esta razón se han venido estudiando otras formas de propagación basadas en el cultivo *in vitro*. Dentro de los diferentes enfoques que se han desarrollado en la micropropagación en diversas especies, la embriogénesis somática se perfila como una solución a mediano plazo en el caso particular de cocotero. Durante las investigaciones realizadas con esta especie se han probado distintas fuentes de explantes. Entre ellos se han utilizado hojas jóvenes, embriones cigóticos maduros e inmaduros, sin embargo, los resultados más exitosos y reproducibles han sido con inflorescencias y plúmulas. En el caso particular de plúmula, es posible obtener embriones somáticos y regenerar plantas en forma reproducible (Chan *et al.*, 1998), con una eficiencia mayor a la alcanzada con otros tipos de explantes. Adicionalmente se ha desarrollado un protocolo de embriogénesis somática secundaria y multiplicación de callo. Estos protocolos permitirían una multiplicación masiva de embriones que resultaría en una aplicación práctica a mediano y largo plazo (Pérez-Núñez, *et al.*, sometido).

La aplicación de reguladores del crecimiento vegetal ha demostrado ser crucial para el desarrollo del proceso embriogénico en cocotero. Los

experimentos han mostrado que la adición del 2,4-D, induce la formación de callo embriogénico. Las citocininas son importantes para el desarrollo del embrión somático, ya que se ha encontrado una relación inversa entre su concentración y la formación de los embriones somáticos. A pesar de los avances obtenidos en la utilización de estos reguladores, su aplicación para el mejoramiento del protocolo ha sido empírica. Recientemente se comprobó que la utilización de un tipo de BRs, el HBR, incrementó la formación de callo y callo embriogénico en explantes de plúmula de cocotero cultivados *in vitro* (Azpeitia *et al.*, 2003). El mecanismo por medio del cual el HBR estimula el proceso embriogénico en cocotero aún es desconocido.

Una hipótesis propuesta del efecto de los BRs en la estimulación del proceso morfogénico es que podrían estar induciendo el ciclo celular, sin embargo, a pesar de que el efecto de los BRs sobre elongación celular está plenamente comprobado, existen dudas sobre el efecto que tienen en la estimulación del ciclo celular ya que se han reportado resultados contradictorios. Por ejemplo se han encontrado que los BRs estimulan la división celular en células parenquimatosas de frijol soya (Clouse y Zurek, 1991), así como también en protoplastos de col china (Nakajima *et al.*, 1996), protoplastos de petunia (Oh y Clause, 1998) y más claramente en la línea BY-2 de células en suspensión de tabaco (Miyazawa *et al.*, 2003). Sin embargo, en estudios con cultivos celulares de zanahoria o con callos de tabaco transformados vía *Agrobacterium*, los resultados reportados mostraron que los BRs no tuvieron un efecto en estimular la división celular (Roth *et al.*, 1989; Sala y Sala, 1985).

Además los estudios histológicos de mutantes deficientes en la síntesis de BRs y mutantes insensibles a ellos, indicaron que el fenotipo enano es debido a una disminución del volúmen celular más que a una disminución en el número de células, sin embargo, esto es contradictorio a lo determinado por Nakaya *et al.*, (2002) que encontraron un incremento en la división celular.

Actualmente se sabe que el paso por las diferentes fases del ciclo celular está regulado por varias familias de CDKs, cuyas actividades están determinadas por la unión coordinada con diferentes tipos de ciclinas en cada fase del ciclo celular. Asimismo, existen otros componentes como la familia de factores de transcripción E2F, que cuando se liberan de la acción represiva de la pRb por acción de los complejos CDK/CYCD, inician la transcripción de diversos genes involucrados en la progresión del ciclo celular.

En trabajos previos realizados por investigadores del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) y del Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Forestales y Pecuarias, se lograron aislar algunos genes de cocotero implicados en el ciclo celular, entre ellos *CYCD3*, *E2F*, *Rb*, *CDKA* (Sandoval, 2003). Los primeros estudios de estos genes han concluido que la CDK tipo A no es sólo un factor crítico para la división celular, sino que también, lo es para el establecimiento de la competencia de la célula a dividirse (Hemerly *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1992). Por lo tanto, debido a que la formación de estos callos está acoplada a un proceso primario de activación de la división

celular, sería importante determinar si la promoción de la embriogénesis somática en estos explantes por el HBR está asociada a la estimulación de algunos genes reguladores del ciclo celular, como la *CDKA*.

LITERATURA CITADA

Azpeitia A; Chan JL; Sáenz L; Oropeza C. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 78:591-596.

Berger KG, Ong SH. 1985. The industrial uses of palm and coconut oils. Oléagineux 40:613-624.

Chan JL, Sáenz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. Plant Cell Reports. 17:515-521.

Clouse SD, Zurek DM. 1991. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. En: Brassinosteroids chemistry, bioactivity, & applications. Editado por: Cutler HG, Yokota T, y Adam G. American Chemical Society, Washington D.C. pp 122–140

- Hemerly AS, Ferreira P, Engler JA, Montagu MV, Engler M, Inze D. 1993. *Cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *The Plant Cell*. 5:1711-1723.
- Martínez MC, Jorgensen J-E, Lawton MA, Lamb CJ, Doerner PW. 1992. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 89:7360-7364.
- Miyazawa Y, Nakajima N, Abe T, Sakai A, Fujioka S, Kawano S, Kuroiwa T, Yoshida S. 2003. Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents. *Journal of Experimental Botany*. 54:2669-2678.
- Nakajima N, Shida A, Toyama S. 1996. Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Japanese Journal of Crop Science*. 65:114-118.
- Nakaya M, Tukaya H, Murakami N, Kato M. 2002. Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 43:239-244.

Oh MH, Clouse SD. 1998. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. Plant Cell Reports. 17:921-924.

Pérez-Núñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil J-L, Oropeza C. Improved somatic embryogenesis from coconut (*Cocos nucifera* L.) plumule explants cultured *in vitro*. In Vitro Cellular Development Biology of Plant. Sometido.

Roth PS, Bach TJ, Thompson MJ. 1989. Brassinosteroids: potent inhibitors of growth of transformed tobacco callus cultures. Plant Science. 59:63-70.

Sala C, Sala F. 1985. Effect of brassinosteroid on cell division and enlargement in cultured carrot (*Daucus carota* L.) cells. Plant Cell Reports. 4:144-147.

Sandoval A. 2003. Contribution a l'étude du cycle cellulaire au sein de tissus de cocotier (*Cocos nucifera* L.) cultivés *in vitro* et recherche de marqueurs moléculaires de l'activité méristématique. These de Docteur. Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Montpellier.

CAPITULO I

ANTECEDENTES

1.1 EL COCOTERO

El cocotero, también llamado árbol de la vida, es una especie que puede ser encontrada a lo largo de la costa de casi todos los países ubicados entre los trópicos de Cáncer y Capricornio (Ohler, 1999). Su amplia distribución ha sido favorecida por su utilidad, así como por su adaptabilidad a diferentes condiciones ecológicas y a la habilidad de la nuez para flotar en el mar y germinar sobre la playa una vez depositada en el suelo.

1.1.1 Descripción taxonómica

El cocotero (*Cocos nucifera* L.) es un género monotípico (Uhl y Dransfield, 1987) de la familia Arecaceae, de las más importantes económicamente junto con las gramíneas, entre las familias de las monocotiledóneas (FAOSTAT, 2002). Su ubicación taxonómica se describe en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1. Ubicación taxonómica del cocotero.

Orden	<i>Principes</i>
Familia	<i>Areceaceae</i>
Sub-familia	<i>Arecoideae</i>
Tribu	<i>Cocoeae</i>
Subtribu	<i>Butiinae</i>
Género	<i>Cocos</i>
Especie	<i>C. nucifera</i>

Fuente : Uhl y Dransfield, 1987.

En función de su altura, el cocotero se clasifica en altos y enanos. Los primeros crecen de 30 a 40 m y los segundos de 10-20 m. También son diferentes en su tipo de polinización; es alógama para los altos, lo cual produce elevada heterocigocidad y autógena para los enanos, por lo que presentan un alto índice de homocigosis (Popenoe, 1979). En términos botánicos no es un árbol, ya que no tiene corteza, ni ramificaciones y tampoco *cambium* que genere crecimiento secundario. Es una monocotiledónea perenne leñosa; su tronco es un tallo único. Su número cromosómico es $2n=32$. La fertilidad del polen es muy elevada en las variedades altas o en las híbridas, comparada con la fertilidad de las variedades enanas o semialtas. Se ha reportado heterosis en casi todas las cruces de prueba realizadas entre plantas altas y enanas (Ohler, 1999).

1.1.2 El cultivo del cocotero

Esta especie se encuentra distribuida en las regiones cálidas, aunque se considera que el sudeste asiático es el centro de origen y domesticación de la especie (Harries, 1990) por encontrarse en esta zona la mayor diversidad intraespecífica, mayor número de enfermedades e insectos parásitos; por otra parte, es esta zona donde se encuentra la mayor riqueza cultural en torno a su cultivo y utilización (Purseglove, 1968; Thampan, 1982). En nuestro país fue introducido a las costas del Golfo de México en la época colonial durante los siglos XVI-XVIII provenientes de Cabo Verde en Africa Occidental y en las costas del Pacífico Mexicano de Panamá, Islas Salomón y Filipinas (Zizumbo, 1996).

El cocotero se cultiva en áreas costeras comprendidas entre los 20° de latitud al Norte y Sur del Ecuador; la altitud más favorable para su cultivo es de 0 a 100 m sobre el nivel del mar, siendo tolerante a los suelos salinos. Requiere climas con atmósferas húmedas (de 80 a 90% de humedad relativa), temperaturas moderadas (27°C a 37°C) y una precipitación media anual de 1 300 a 2 500 mm, bien distribuida durante todo el año. El cocotero puede crecer en una gran variedad de suelos, siempre que estén aireados y drenados; tolera las variaciones en el pH de 5.0 a 8.0. Por lo general requiere de un complemento de fosfatos, nitratos y potasio (Ohler, 1999; Dalhgren *et al.*, 1985).

1.1.3 Utilización del cocotero

La copra es el principal producto del cocotero que, junto con la semilla de la palma aceitera (*Elaeis guineensis*), provee a la industria de ácidos grasos de cadena corta (de 8 a 14 átomos de carbono) (Berger y Ong, 1985). El aceite extraído contiene alrededor de 48% de ácido laúrico, el cual es utilizado en la fabricación de jabones y por la industria de los cosméticos, así como, en la obtención de combustibles a partir de los ésteres de metilo, como resultado de la transformación por alcoholisis (Graille *et al.*, 1985). Los catalizadores para este proceso pueden ser las mismas cenizas del endospermo de la semilla. La industria alimenticia utiliza el aceite de coco para la producción de margarinas, cremas sintéticas y confitería.

Además del consumo humano o animal de los productos o subproductos del fruto de cocotero, existen muchos usos para las diferentes estructuras de la planta, utilizándose para la construcción de muebles rústicos, viviendas, artesanías. La savia producida es utilizada para obtener azúcar, almíbar y vinagre (Reyes-Jael, 1985). Por otra parte, esta planta es por excelencia un elemento del paisaje en zonas turísticas o naturales como playas y selvas (Ohler, 1999).

1.1.4 El cultivo del cocotero en México

En México se cultivan 163 822 ha en los estados de Guerrero (75 000 ha), Colima (24 500 ha), Tabasco (25 000 ha), Oaxaca (11 701 ha), Michoacán (8 000 ha), Sinaloa (7 000 ha), Jalisco (5 000 ha), Veracruz

(3 000 ha), Chiapas (2 000 ha), y Quintana Roo (1 000 ha). Este cultivo representa la principal fuente de ingresos para más de setenta mil familias que intervienen en la cosecha, procesado, industrialización, y comercialización de fruta fresca así como en la fabricación de artesanías. A pesar de que es uno de los cultivos tropicales de mayor importancia en México, la superficie de este cultivo ha disminuido alrededor de 41 000 ha en los últimos 10 años (Figura 1.1) (Ramírez y Piña, 1998).

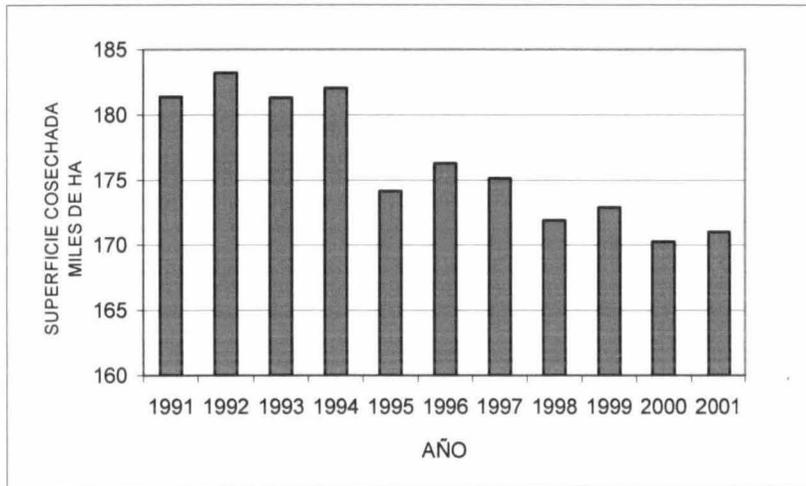


Figura 1.1. Evolución de la superficie cosechada de cocotero en México en los últimos diez años. Fuente: FAOSTAT Database, 2002.

1.1.5 Problemática del cultivo

La situación actual del cultivo del cocotero se ha discutido en diferentes reuniones, en los que se ha resumido el consenso en los siguientes puntos.

Cuadro 1.2. Problemática del cocotero en América Latina y el Caribe.

Problemas	Causas	Efectos
a) Baja productividad	<ul style="list-style-type: none"> • Prácticas agronómicas insuficientes • Utilización de material no mejorado • Edad de las plantaciones • Plagas y enfermedades 	<ul style="list-style-type: none"> • Creciente disminución de los ingresos de los productores • Producción decreciente de nueces • Abandono de las plantaciones • Daño a la industria del cocotero
b) Disminución de la superficie cultivada	<ul style="list-style-type: none"> • Abandono de las plantaciones. • Muerte de las plantas • Plagas y enfermedades (AL) 	
c) Mercado	<ul style="list-style-type: none"> • Falta de un plan de desarrollo nacional para esta industria 	
d) Organización		
e) Bajo aprovechamiento de subproductos y diversificación		

Fuentes: Seminario Sobre la Problemática del AL en México. Mérida Yucatán, 1989; Seminario Internacional Sobre Investigación y Desarrollo del Cultivo de Cocotero, Kingston, Jamaica, 1992. Simposio Internacional sobre AL. Mérida, Yucatán, 1993.

Para hacer del cultivo de cocotero una actividad rentable, es necesaria la introducción de materiales mejorados con características deseables. Algunas de estas cualidades deseadas son la producción de nuez grande, mayor contenido de copra y de agua (característica del Alto), así como precocidad, resistencia al AL y mayor cantidad de nueces (característica del Amarillo). Ejemplo de estos materiales son los híbridos Maypan, resultado de la cruce de Enano Malayo Amarillo con Alto de Panamá. Desafortunadamente la producción de plantas con estas características es muy limitada con métodos tradicionales, por lo

que la demanda de estos materiales es por mucho, superior a lo que se obtiene actualmente (Ramírez y Piña, 1998).

1.1.6 Alternativas para la propagación convencional

La producción de híbridos implica enormes esfuerzos, gran cantidad de recursos y de tiempo. En una estimación realizada por Azpeitia (2003), se considera que la producción potencial de nueces híbridas en 220 ha de huerta madre junto con la producción de 106 ha ya establecidas (de las cuales únicamente 32 producen híbridos) se necesitarían 23 años para cubrir 200 mil ha que demandan ser plantadas. Desde 1998 el requerimiento de nueces híbridas es de cerca de 50 millones de nueces, pero solamente se producen alrededor de 283 mil nueces anualmente lo que cubre solo necesidades para establecer 1 600 ha por año (Ramírez y Piña, 1998).

La micropropagación o propagación *in vitro* es un método alternativo para la multiplicación masiva de especies vegetales (Villalobos y Thorpe, 1991). Se realiza por medio del cultivo de células, tejidos u órganos de una planta madre en un medio nutritivo artificial bajo condiciones estériles (Pierik, 1987; George, 1993). La micropropagación presenta ventajas respecto a los sistemas tradicionales de propagación, destacando: a) el rápido incremento del número de plantas de un genotipo de interés en menor superficie, b) la reducción del tiempo de multiplicación y c) el mayor control de sanidad del material que se propaga, lo que facilita el intercambio seguro de material *in vitro* de un

lugar a otro con menores restricciones fitosanitarias (Murashige y Skoog, 1974; Villalobos y Thorpe, 1991). La micropropagación de materiales élite de cocotero representa una alternativa para aumentar la productividad, la resistencia a enfermedades (tales como el AL) y la precocidad. La sustitución de las plantaciones antiguas con estos nuevos materiales permitiría resolver el problema de senectud y la introducción de las características arriba mencionadas. Además se podrían reforestar zonas devastadas por el AL, así como anticipar la siembra en zonas libres de esta enfermedad (Azpeitia, 2003).

1.1.7 Micropropagación

El cocotero es propagado generalmente de forma sexual por semilla. Las semillas tardan en germinar entre 1 y 2.5 meses dependiendo del genotipo (Domínguez *et al.*, 1999). La propagación asexual de cocotero se inició con los trabajos exitosos reportados por Eeuwens (1976, 1978) y Eeuwens y Blake (1977), quienes identificaron los requerimientos minerales, orgánicos y de reguladores del crecimiento para la producción de callo a partir de explantes de tallos, hojas e inflorescencias de cocotero maduro, donde a esta nueva formulación mineral se le denominó Y3. Varios grupos de científicos en diferentes países han trabajado desde los años 70 con el objetivo de realizar la clonación de cocotero *in vitro*, evaluando diferentes tipos de explante como hojas inmaduras, raíces, embriones e inflorescencias inmaduras, con diferentes grados de éxito (Verdeil y Buffard-Morel, 1995). En todos

los casos se ha visto que la vía más común para la regeneración de las plántulas es a través del proceso de embriogénesis somática.

A partir de explantes de plúmula (Hornung, 1995; Oropeza y Chan, 1995) se ha logrado obtener un protocolo para la obtención reproducible de callos, CE, ES y eventualmente la regeneración de plantas, algunas de las cuales se han establecido exitosamente en campo (Chan *et al.*, 1998).

El proceso de embriogénesis somática utilizando plúmulas como explantes se describe gráficamente en el cuadro 1.3

Los resultados muestran claramente que el protocolo a partir de plúmula, presenta mejor respuesta en comparación al de inflorescencia. Sin embargo, los resultados de micropropagación a partir de explantes de plúmula no son suficientes para tener una aplicación práctica, por lo que el protocolo inicial ha sufrido cambios como la introducción de pasos de multiplicación, tal es el caso del proceso de embriogénesis secundaria y actualmente la multiplicación de callo embriogénico (Pérez-Núñez *et al.*, sometido).

Cuadro 1.3. Protocolos desarrollados en la actualidad para la propagación *in vitro* de cocotero (*Cocos nucifera* L.)

Etapa	Protocolo			
	Inflorescencia ¹		Plúmula ²	
	Explantos con respuesta (%) ³	Duración de la fase (meses)	Explantos con respuesta (%) ³	Duración de la fase (meses)
Inducción de callo embriogénico	15-40	4-8	90	1-2
Callo embriogénico	9.2	2-6	57	3
Embriones	6.4	4-6	22	3-6
Plántulas	0.25	10-12	22	6
Duración total del proceso	-	26	-	15

¹ De acuerdo a Hocher *et al.*, 1998; ² Chan *et al.*, 1998; ³% a partir del 100 % inicial.

Por otro lado, la utilización de reguladores del crecimiento vegetal no convencionales como los BRs, han tenido éxito para incrementar la formación de embriones somáticos (Azpeitia, 2003); esto ha permitido mejorar la eficiencia del protocolo, el cual podrá tener una aplicación práctica a mediano plazo.

No obstante, la micropropagación del cocotero presenta aún problemas tales como: una baja capacidad de conversión de embriones somáticos a plántulas bien desarrolladas (Oropeza *et al.*, en prensa).

1.1.8 Formación de callo embriogénico

La formación de callo embriogénico en el caso de plúmula generalmente ocurre después de tres meses y hasta seis en muchos casos con explantes de inflorescencia. El medio de cultivo utilizado generalmente se basa en el reportado por Eeuwens (1976), el cual contiene 2,4-D. La concentración de este compuesto debe ser adaptada en función del tipo de carbón activado utilizado, ya que este causa la adsorción de esta fitohormona (Sáenz, 1999). En el caso de secciones de embrión cigótico se adiciona BAP al medio de cultivo a concentraciones de 5 μ M (Samosir *et al.*, 1999).

1.1.9 Formación de embriones somáticos

La formación de embriones a partir del callo embriogénico se logra cuando se reduce la concentración de auxina en el medio de cultivo en los protocolos para inflorescencias y plúmula (Branton y Blake, 1986; Verdeil *et al.*, 1992; Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998). La inclusión de citocininas favorece un desarrollo adecuado de los embriones y su germinación ocurre en ausencia de auxina (Branton y Blake, 1986; Verdeil *et al.*, 1992; Verdeil *et al.*, 1994; Hornung, 1995; Oropeza y Chan, 1995; Chan *et al.*, 1998).

1.1.10 Formación de plántulas

La germinación de varios embriones en un mismo callo da lugar a cúmulos de brotes, los cuales deben ser separados mecánicamente

para poder ser cultivados posteriormente en forma individual. La adición de agentes que promueven la formación de raíces (auxinas) no es necesaria en el caso de plúmula (Chan *et al.*, 1998) aunque ha sido reportada en cultivos de inflorescencia (Verdeil y Buffard-Morel, 1995) y de embriones cigóticos inmaduros (Fernando y Gamage, 2001).

La baja eficiencia de los protocolos de micropropagación para esta especie ha sido atribuida parcialmente a procesos del desarrollo asociados en la adquisición de la competencia embriogénica. Uno de los procesos relacionados con tal competencia embriogénica, está relacionada con la regulación de la división celular. Se llegó a esta conclusión debido a que en un estudio anterior, Francis y Sorrell (1991) mediante análisis de citometría de flujo encontraron que menos del 1 % de las células se encontraban en mitosis y que el 99% restante se encontraban bloqueadas en la transición de las fases de G0-G1. Esto condujo a la hipótesis de que la activación del ciclo celular podría tener efectos positivos en el desarrollo de los procesos morfogénicos que favorecerían la regeneración. Por otra parte, se ha descrito que únicamente las zonas translucidas de los callos, que consisten de células en división activa, son áreas donde posteriormente se encuentran células con características embriogénicas (Pérez-Núñez, 2005 y Verdeil, 2001). Estos análisis sugieren la interconexión entre el ciclo celular y la diferenciación hacia embriogénesis somática, a través de otros genes con funciones específicas de diferenciación (Neumann, 2000).

Dado el panorama en el que se desarrolla este trabajo de tesis, a continuación se abordan tópicos relacionados con el ciclo celular. Posteriormente se presenta una revisión sobre evidencias de que los BRs favorecen la diferenciación y el ciclo celular, para poner en contexto la discusión del capítulo de morfogénesis relacionado con la expresión del gen *CDKA*.

1.2 EL CICLO CELULAR

La división celular es el principal determinante de la actividad meristemática que junto con la elongación celular rige la tasa de crecimiento a través de la regulación de las fases que componen al ciclo celular (Cockcroft *et al.*, 2000). El ciclo celular es descrito normalmente en términos de cuatro fases distintivas: interfase post-mitótica (G1), fase de síntesis de ADN (S), interfase postsintética (G2) y mitosis (fase M) (Doerner, 2000). Otras extensiones son la citocinesis y la existencia de una fase no cíclica (G0). Cada fase tiene un punto de transición para pasar a la siguiente, de tal forma, que el ciclo celular se compara con una pista que contiene diferentes puntos de control que determinan la continuidad de una fase a otra. Los puntos de control determinan, por ejemplo, si la célula se encuentra en condiciones para que los cromosomas sean duplicados durante la fase S o para que las cromátidas estén listas para repartirse durante la fase M (Francis y Sorrell, 2001).

1.2.1 Regulación del ciclo celular

Las células se dividen al duplicar sus cromosomas y segregar una copia de cada cromosoma duplicado, así como proveer de los organelos esenciales, a cada una de las células hijas. La regulación de la división celular es crítica para el desarrollo normal de los organismos multicelulares (Doerner, 2000). A finales de la década de los 80's, quedó claro que los procesos moleculares que regulan la replicación del ADN y la división celular son semejantes en todas las células eucarióticas. Desde entonces, muchas técnicas genéticas, bioquímicas y de ADN recombinante han sido empleadas en el estudio de diversos aspectos del ciclo celular (Mironov *et al.*, 1999; Chua, 1999). Estos estudios han revelado que la división celular es controlada por la sincronización de dos eventos críticos en el ciclo celular: la iniciación de la síntesis nuclear de ADN y la iniciación de la mitosis (Stals e Inzé, 2001).

Durante la fase G1, la célula monitorea el medio que lo rodea y su propio tamaño, hasta que en un momento determinado da el paso decisivo que la lleva a la replicación del ADN y la continuación del ciclo celular. La fase G2 es una fase de seguridad donde se verifica que la célula haya replicado completamente el ADN antes que continúe hacia la mitosis. Al final de las fases G1 y G2 existen los llamados puntos de restricción, estos puntos se definen como sitios de regulación de la fase que está por concluir (fase A) requerida para que ocurran los eventos que identifican la siguiente fase (B); esto es, que para que ocurra el

paso B es necesario que previamente se haya completado el paso A (Hartwell y Weinert, 1989).

Los encargados de generar las señales para que ocurra un cambio de fase son un pequeño número de complejos de proteínas cinasas. Por la importancia de su función constituyen los controles maestros de estos eventos. Estos complejos regulan las actividades de múltiples proteínas involucradas en estos procesos al fosforilarlas en sitios regulatorios específicos, activando unos e inhibiendo otros para coordinar sus actividades. Estas proteínas cinasas son proteínas heterodiméricas. Las subunidades regulatorias son llamadas ciclinas porque su presencia está asociada con el ciclo celular. Las subunidades catalíticas son llamadas CDKs porque no tienen actividad a menos que estén asociadas con una ciclina, que son las subunidades regulatorias (Shaul *et al.*, 1996; Doerner, 2000; Stals e Inzé, 2001; Francis y Sorrell, 2001).

1.2.2 Proteínas reguladoras de la fase G1

Cinasas dependientes de ciclinas. La división en las células eucariotas está controlada por una acción ordenada de CDKs. Estas son cinasas de serina-treonina, las cuales son activadas por reguladores conocidos como ciclinas, que aparecen periódicamente durante el ciclo celular y determinan la actividad y la especificidad del complejo enzimático para cada sustrato (Roudier *et al.*, 2000). La primera CDK (antes CDC) descrita fue identificada en *Schizosaccharomyces pombe* y denominada

cdc2. El producto de este gen es una proteína de 34 kDa también conocida como p34^{cdc2} (Hindley y Phear, 1984).

Las plantas presentan una cantidad de genes con secuencias relacionadas con las CDKs y las evidencias sugieren que están involucradas en la regulación de diferentes fases del ciclo celular (Bursens *et al.*, 1998). En plantas se han descrito hasta cinco clases de genes de CDKs (Magyar *et al.*, 1997) y cinco clases de ciclinas mitóticas (Renaudin *et al.*, 1996), indicando el alto potencial de regulación del ciclo celular en estos organismos.

En *A. thaliana* se han descrito cuatro tipos de CDKs (Cuadro1.4) (Segers *et al.*, 1997). La *CDKAA1* está clasificada como la única CDK tipo A, la cual es la mejor caracterizada en plantas. La *CDKAA1* contiene el motivo conservado PSTAIRE, motivo de unión a ciclinas y es hasta ahora el único gen que codifica para una proteína en *Arabidopsis* que pudo complementar funcionalmente al mutante CDC2 de levaduras, el cual es sensible a temperatura. Las otras clases de CDKs contienen diversos motivos PYSTVRE; PSALRE y PLSTIRE (Cuadro 1.4) (Joubés *et al.*, 2000).

Cuadro 1.4. Clasificación de las CDKs en plantas

Clase de CDK	Motivo de interacción con ciclinas	Función
CDKA	PSTAIRE	Constitutivo de ciclo celular
CDKB	PPTALRE o PPTTLRE	Transición G2/M
CDKC	PITAIRE	Poco caracterizado
CDKD y E	NO PSTAIRE	Poco caracterizado

De acuerdo a Mironov *et al.*, 1999.

Los primeros estudios sobre estos genes han concluido que la *CDKA1* (antes *cdc2aAt*) no sólo es un factor crítico para la división celular, sino también lo es para el establecimiento de la competencia de la célula a dividirse (Hemerly *et al.*, 1993; Martínez *et al.*, 1992). Tal competencia se define como un estado fisiológico en el que la célula tiene la madurez necesaria para dar origen a una célula hija. La CDKA activa, además de estar implicada en la vía del retinoblastoma, fosforila a otras proteínas esenciales para la continuación del ciclo celular. En la transición G1/S, es posible que el sustrato de la CDKA sea la proteína cuya función es iniciar el reconocimiento del origen del replicón (Dutta y Bell, 1997). Aparentemente, en la transición G2/M la CDKA provoca una serie de eventos: las histonas se fosforilan provocando la condensación de los cromosomas; el núcleo y el nucleolo se desorganizan al fosforilarse ciertas proteínas componentes de la envoltura de estos organelos (Jacqmard *et al.*, 1994).

El análisis de expresión del gen *CDKA* en *Arabidopsis thaliana* ha mostrado que diversas hormonas pueden regular la transcripción de

CDKA, activando diferentes respuestas particulares en diferentes tejidos radicales (Hemerly *et al.*, 1993). La restricción espacial de la división celular en plantas puede ser impuesta a través de la alteración de los niveles de expresión de genes involucrados en la progresión del ciclo celular (Hemerly *et al.*, 1999).

*Ciclina*s. Las ciclina)s son reguladores positivos de proteínas cinasas que regulan eventos claves del ciclo celular, por lo que la actividad de estas últimas depende de su mutua interacción. Se les denominó ciclina)s porque su presencia fluctúa a lo largo del ciclo celular, según lo determine el control transcripcional (Doerner, 2000). Las ciclina)s tienen un tiempo de vida corto y sus niveles disminuyen drásticamente cuando han terminado su función (Hemerly *et al.*, 1999).

Las ciclina)s están clasificadas como tipos A, B, D y E en mamíferos, con base en su secuencia y a la fase en la que actúan. Los transcritos de la ciclina tipo A y B se acumulan periódicamente durante la fase tardía S (hacia la fase G₂), antes de ser destruidas durante la mitosis. Las ciclina)s tipo D interactúan con las CDK mediante un motivo LxCxE situado en el extremo amino terminal de la ciclina (Dowdy *et al.*, 1993). El complejo formado por la ciclina tipo D, o incluso E, con la CDKA, fosforila directamente la pRb en la parte media de la fase G₁, de esta manera las células pasan hacia la fase S (Pines, 1995).

Durante la fase G₁, las ciclina)s son consideradas como sensores de los factores de crecimiento dado que su transcripción es absolutamente

dependiente de la presencia de estos compuestos, más que de la ubicación de la célula en el ciclo celular (Doerner 2000; Meijer y Murray 2000; Murray *et al.*, 2000).

Proteína del retinoblastoma. La pRb es el producto de un gen supresor de tumores descubierto en un tipo de cáncer infantil. La pRb es una proteína nuclear de 105 kDa, que se regula por fosforilación (Lee *et al.*, 1987; Friend *et al.*, 1987) y está relacionada con otras dos proteínas, la p107 y la p130, que son otros reguladores negativos del ciclo celular (Ewen, 1994; Weinberg, 1995). El producto del gen Rb, así como los de p107 y p130, contiene una región tipo “bolsillo” requerida para la unión de otras proteínas celulares, así como para la unión de oncoproteínas codificadas por virus de ADN. Uno de estos motivos contiene el sitio de unión de proteínas que porten el motivo LxCxE, tal como las ciclinas D y proteínas codificadas por algunos geminivirus (Xie *et al.*, 1995).

La pRb regula la transición G1/S en los mamíferos y forma parte de un mecanismo de transducción de señales que conecta el reloj del ciclo celular con la maquinaria transcripcional de la célula (Echevarría *et al.*, 2002). Recientemente se detectó en las plantas y se sugiere que puede tener una participación importante en los procesos de proliferación celular, desarrollo e infección viral (Grafi *et al.*, 1996), por lo que el conocimiento de su función podría ser una valiosa ayuda en la comprensión de estos procesos en las plantas (Echevarría *et al.*, 2002).

Factores de transcripción E2F. E2F es el nombre que se le da a una familia de factores de transcripción que activan una serie de genes que

actúan en la fase S. Esta familia de factores se identificó primero en humanos y otros animales. Entre los genes que son activados por E2F están los involucrados en la ruta de síntesis de ADN tales como la timidina sintasa (Dou y Pardee, 1996), la dihidrofolato reductasa (Slansky *et al.*, 1993; Slansky y Farnham, 1996), la ADN polimerasa α (Pearson *et al.*, 1991), o la ribonucleotido reductasa, (Chaboute *et al.*, 2000). Los mecanismos moleculares de inducción génica mediados por el factor E2F involucran fosforilación e interacciones proteína-proteína. Estas interacciones son altamente reguladas durante el ciclo celular. E2F es activo cuando se encuentra asociado a su proteína compañera DP, aunque este dímero es transcripcionalmente inactivo cuando forma complejos con proteínas de bolsillo, tales como Rb, p107 y p130 (Dyson, 1998). Conforme el ciclo celular progresa, la hiperfosforilación de esas proteínas por los complejos CDK-CYC dispara la transcripción de los genes blanco de E2F (Eckardt, 2002).

La CDKA es una proteína clave en la vía del retinoblastoma, una vía crítica para que las células pasen de la fase G1 a la fase S. Durante las etapas tempranas de G1, la pRb se encuentra en un estado activo defosforilado y ejerce su efecto inhibitorio en el ciclo celular al unirse e inhibir a la familia de factores de transcripción E2F, requeridos para el comienzo de la fase S. La hiperfosforilación de la pRb por el complejo CDKA-CYCD3 la inactiva, provocando la liberación del factor E2F, lo que promueve la transcripción de genes necesarios para impulsar las células a la fase S (Figura 1.2).

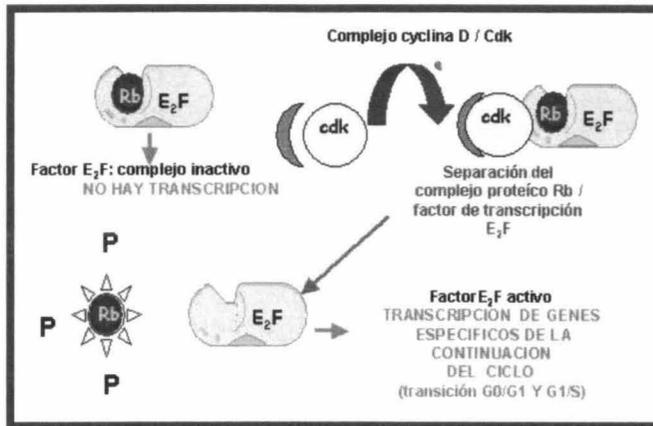


Figura 1.2. La vía de la retinoblastoma.

1.2.3 Relación del ciclo celular con la morfogénesis

La elaboración de la forma de la planta y su función depende de la habilidad de las células vegetales para dividirse y diferenciarse. Las plantas ofrecen una posibilidad única para estudiar la integración de la división celular, el crecimiento y el desarrollo. Dado que las plantas se desarrollan principalmente en una etapa postembriónica, tienen una plasticidad enorme y parecen tolerar más cambios en el número y tamaño de células que otros organismos (Inzé, 2003). Esta plasticidad puede ayudar a elucidar si la división celular es la que determina el crecimiento y desarrollo (teoría celular) o si la división celular únicamente es parte del desarrollo integral de la planta (teoría del organismo). Sin embargo, este tema permanece aún sin resolver. Los datos experimentales apoyan a una u otra teoría. Por ejemplo la sobreexpresión del factor E2F produce más células que provocan la formación de estructuras más grandes (De Veylder *et al.*, 2002). Sin

embargo, el efecto de la sobreexpresión de las proteínas inhibidoras de las CDKs (las KRPs) las cuales reducen el número de células, es compensado por células más grandes (Wang *et al.*, 2000). Otros estudios muestran que la sobreexpresión de ciclinas tipo B y D acelera el ciclo celular y consecuentemente el desarrollo de los órganos (Doerner *et al.*, 1996; Dewitte *et al.*, 2003). Lo que se puede concluir de ésta y de más información es que la división celular está integrada y coordinada al desarrollo en las plantas, y que división celular y la diferenciación son eventos complementarios o afines.

1.3 LOS BRASINOESTEROIDES

Como se dijo anteriormente los brasinoesteroides tienen injerencia en diversos procesos fisiológicos tales como la elongación celular y la respuesta a estrés, entre otros; hay procesos en los que no está plenamente comprobado su acción, como es el caso de los procesos relacionados con la división celular y la embriogénesis somática. En esta sección se abordan trabajos en los que se reportan evidencias a favor y en contra de esta relación.

1.3.1 Definición

El término de BRs fue asignado por Mandava (1988) a los esteroides que promueven el crecimiento de los tejidos vegetales. Los BRs son formados a partir de la condensación de moléculas de isoprenos. Cuentan con cuatro anillos (A, B, C y D) y una cadena lateral (Figura

1.3) tienen 27, 28 y 29 átomos de carbono con diferentes sustituyentes en los anillos A y B y en la cadena lateral. Sin embargo, existen varios esteroides intermediarios en su síntesis, por lo que no había acuerdo de cual era la línea divisoria entre los esteroides y los BRs. Para aclarar esta situación Bishop y Yokota (2001) propusieron definirlos como esteroides que tengan un oxígeno o grupo hidroxilo, en el carbono (C) 3 y otros adicionales en C-2, C-6, C-22 y C-23 de acuerdo al orden numérico de los esteroides. (Figura 1.3).

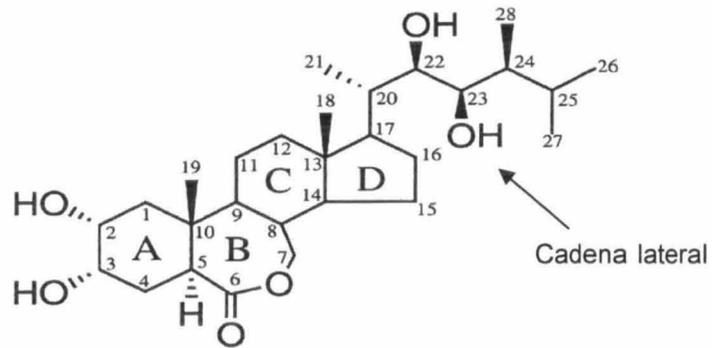


Figura 1.3. Estructura química del BL.

Químicamente se han identificado más de 50 BRs de fuentes vegetales (Bajguz y Tretyn, 2003) de los cuales, el BL es hasta ahora el que produce la mayor actividad biológica entre ellos y que puede sintetizarse directamente del campesterol o a través de la síntesis general de los esteroides. Los esteroides vegetales además de su papel como precursores de los BRs, son componentes integrales de la membranas los cuales sirven para regular su fluidez y permeabilidad (Bishop y Yokota, 2001).

1.3.2 Efectos fisiológicos

La aplicación de los BRs induce un amplio rango de respuestas incluyendo un incremento en la tasa de elongación del tallo, aumento en la expansión de las hojas, crecimiento del tubo polínico, desenrollamiento de las hojas en pastos, reorientación de la microfibrillas de celulosa, así como la adaptación al estrés ya que aumenta la tolerancia al frío en plantas de arroz (Bishop y Yokota, 2001). Además en células de *zinnia* (una planta ornamental) la adición de los BRs induce la formación de tejido conductor (Yamamoto *et al.*, 1997).

La etiolación que presentan las plántulas recién germinadas en la oscuridad, es un ejemplo que muestra como la ausencia de luz afecta la morfología de las plantas (fotomorfogénesis). Estas presentan tallos alargados y la parte final del tallo donde comienzan los cotiledones, se curva en forma de gancho; además contienen precursores no diferenciados de los cloroplastos, por lo que el color de las hojas es amarillo pálido. Sin embargo, cuando estas plántulas se exponen a la luz, la elongación del tallo disminuye dramáticamente, la plántula se endereza y aparecen las primeras hojas verdes (Yoshizumi *et al.*, 1999). Algunos tipos de mutantes con defectos en la síntesis o percepción de BRs muestran una morfología similar a las plántulas que crecen en luz, aún cuando crecen en la oscuridad. Además muestran defectos en su desarrollo cuando son crecidos en presencia de luz: las plantas son enanas, con hojas verde oscuro, con tallos, raíces, pecíolos, hojas y tallos de inflorescencias más cortos que las plantas

normales. Así mismo, la fertilidad masculina se ve reducida (Nemhauser y Chory, 2004). De esta manera se deduce que los BRs están involucrados directa o indirectamente en la fotomorfogénesis.

1.3.3 Percepción de los brasinoesteroides en la célula

Para que un compuesto ejerza un efecto fisiológico es necesario que la célula blanco lo perciba. Esta percepción del compuesto puede ser a través de un receptor localizado en la membrana que rodea a la célula como ocurre con las hormonas en animales (Beato *et al.*, 1995). La identificación del receptor de los BRs surgió del descubrimiento de una planta mutante que no mostraba cambios fisiológicos con la adición de los BRs (Chory *et al.*, 1991). La confirmación de la función del receptor se hizo utilizando un receptor quimérico que incluyó la secuencia que codifica el dominio extracelular del receptor denominado BRI1 fusionada con la secuencia del dominio cinasa del gen *Xa21*; este es un gen de resistencia a enfermedades que produce una respuesta letal en presencia de patógenos. Este receptor quimérico se introdujo a las células de arroz. La aplicación del BL a estas células produjo su muerte. Una respuesta similar a la observada se presenta en las células que expresan el gen *Xa21* cuando son expuestas con el patógeno. Las células que no contenían la proteína no sufrieron alteración alguna (He *et al.*, 2002).

Por otro lado, para ejercer su función, el receptor debe interactuar con otros componentes proteicos. En condiciones de ausencia o baja

concentración de BL (Figura 1.4 panel a), BIN2 una cinasa del tipo GSK3, fosforila BES1 y BZR1. Esta modificación provoca la desestabilización de BES1 y BZR1 y su degradación por el proteosoma 26S (He *et al.*, 2002; Nemhauser y Chory, 2004). Una vez que el BL es percibido por BRI1 en la superficie celular (Figura 1.4 panel b), BIN2 es inactivado por un mecanismo desconocido, lo que conduce a la acumulación de BES1 y BZR1 en el núcleo e induciendo la expresión de genes incluyendo aquellos involucrados en la modificación de la pared celular y el crecimiento, pero también conduce a la represión de varios genes biosintéticos de BRs. El resultado final es la producción de una respuesta fisiológica específica (Yin *et al.*, 2002) tal como elongación celular, desarrollo reproductivo, diferenciación vascular, polarización de la membrana, regulación de las relaciones fuente/demanda, o la modulación del estrés (Clouse y Sassé, 1998). BAK1, al igual que BRI1 es una cinasa de LRR transmembranal y aunque se ha demostrado que interactúa con BRI1, su función exacta en la respuesta a BRs no ha sido demostrada (Adaptado de Nemhauser y Chory, 2004).

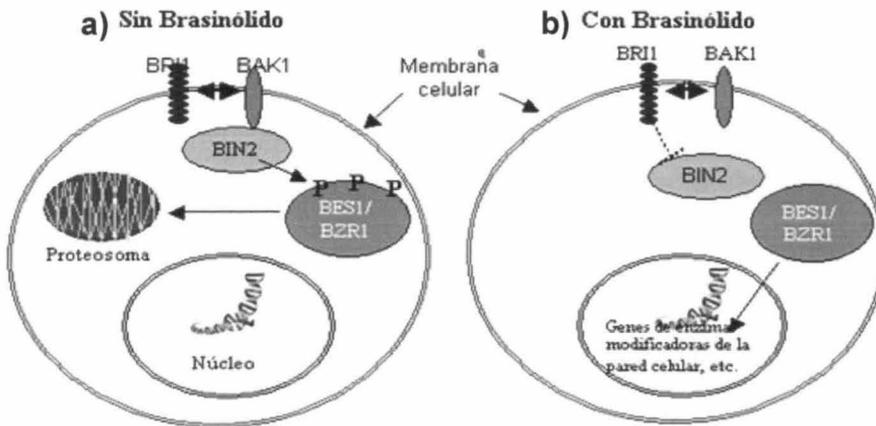


Figura 1.4. Modelo propuesto para la señalización de BRs en plantas.

1.3.4 Efecto de los brasinoesteroides sobre el ciclo celular

Desde que se descubrió su presencia en plantas, diversos autores han reportado efectos de los BRs en el ciclo celular ya sea al favorecerlo o al inhibirlo (Roth *et al.*, 1989; Gaudinova *et al.*, 1995). A continuación se resumen algunos reportes donde se indica que los BRs han favorecido el ciclo celular.

En cultivos celulares de *Helianthus tuberosus* en presencia de auxinas y citocininas, la aplicación de concentraciones nanomolares y micromolares de BRs estimularon la división celular incrementándola 50% (Clouse y Sasse, 1998) respecto a los controles. En protoplastos de col china (*Brassica campestris* var. *Pekinensis*), la aplicación de 24-epibrasinólido conjuntamente con 2,4-D y cinetina, promovió la división celular en forma dependiente de la dosis y potenció el agrupamiento y formación de agregados celulares. Los datos sugieren que la

diferenciación de los protoplastos fue potenciado y que los BRs promovieron o aceleraron la regeneración de la pared celular antes de la división (Clouse y Sasse, 1998). Los BRs también aceleraron la tasa de división celular en protoplastos de *Petunia* en presencia de auxinas y citocininas, pero no hubo respuesta en ausencia de alguno de estos últimos (Oh y Clouse, 1998).

Hu *et al.*, (2000) reportaron que las *CYCD3* son inducidas en respuesta a un tratamiento con epibrasinólido, y que este puede sustituir a las citocininas al promover el crecimiento de callos y cultivos en suspensión de *Arabidopsis thaliana*. También reportan que la inducción de *CYCD3* por BRs es a través de una ruta de señalización aún no identificada.

Por otra parte los mismos autores, al tomar como punto de partida el hecho de que la cicloheximida es un inhibidor de síntesis de proteínas y que la actividad registrada se deba a proteínas presentes, sugieren que la inducción de la *CYCD3* por BRs requiere la síntesis de proteínas *de novo* al no registrarse actividad alguna de las proteínas presentes. Debido en parte, a que los resultados obtenidos con inhibidores de fosforilación o defosforilación, no tienen efecto sobre la inducción con BL se concluyó que *CYCD3* no es un gen de respuesta primaria (Hu *et al.*, 2000); este resultado no concuerda con lo anteriormente reportado por Li y Chorí (1997) ya que la ruta conocida a través del receptor BRI1 involucra defosforilación o fosforilación. Para aclarar este punto, se realizó la inducción con BRs de células en suspensión del mutante *bri1*,

encontrando que aún en condición de inhibición de la fosforilación, se había inducido la transcripción de *CYCD3* (Hu *et al.*, 2000).

Recientemente en células en suspensión de tabaco de la línea BY-2, la adición de BL al medio convencional (que incluía a la auxina 2,4-D) produjo un ligero incremento en los índices mitóticos en forma dependiente de dosis; por el contrario cuando se le añadió al medio en ausencia de la auxina los índices se incrementaron drásticamente, igualmente en función de la dosis utilizada. Por otra parte, en los cultivos tratados con el BL en ausencia de auxinas, las células contenían menos granos de almidón y tamaño menor. Además, las células tenían alterada su morfología (Miyazawa, *et al.*, 2003).

Este mismo autor también encontró un incremento en la expresión de los genes ciclina B (*CYCB*) e Histona H4 (*His4*), marcadores de mitosis y de la fase S, respectivamente, cuando se aplican dosis a partir de 10^{-7} M, alcanzando el mismo nivel de expresión de células en medio convencional con 2,4-D después de dos días de cultivo. La disminución de la dosis de BL por debajo de 10^{-7} M resultó en niveles decrecientes de *CYCB*, mientras que la acumulación de transcritos de *His4* fue casi igual al de las células cultivadas en medio convencional (Miyazawa *et al.*, 2003).

También existen reportes sobre efectos negativos en el crecimiento. Roth *et al.*, (1989) obtuvieron resultados desfavorables en el crecimiento de callos y cultivos en suspensión de tabaco transformados

con genes que sobreproducen citocininas. Al utilizar una línea que no requiere de la adición exógena de reguladores, se les adicionaron dos diferentes BRs (el 2 α , 3 α , 22S, 23S-tetrahydroxy-24S-metil-B-homo-7 oxa-5 α colestano-6-ona BR-1 y el 2 α , 3 α , 22R, 23R-tetrahydroxy-24S-metil-B-homo-7 oxa-5 α colestano-6-ona BR-2) en un rango de 10⁻¹⁰ M hasta 10⁻⁶ M. Los resultados muestran una fuerte inhibición, que es observable en el peso fresco y seco de los tejidos y que es decreciente conforme disminuye la concentración del BR. Este efecto es mayor con el BR-1 que con el BR-2 y solo pudo revertirse transfiriendo los cultivos con las concentraciones menores de los BRs a medio fresco libre de ellos, siendo irreversible el daño en los de mayor concentración. Por otra parte en presencia únicamente de 10⁻⁵ M de AIA hubo una disminución del 50% en el crecimiento respecto al control, sin embargo, en combinación con los BRs ésta disminución no fue tan drástica (15-35% respecto al control). Además cuando se aumentó la concentración de AIA a 10⁻⁴M hubo un efecto positivo del BR-1 a 10⁻⁹ M y 10⁻⁸ M al incrementar en 40% el peso fresco de los callos.

Finalmente los mismos autores, en otro experimento, utilizaron una línea silvestre de tabaco que requiere del suministro exógeno de auxinas y citocininas para su crecimiento natural, y redujeron o eliminaron los niveles de cinetina. La adición de 10⁻¹⁰M de BR produjo una reducción del crecimiento cercano al 50%, concentraciones mayores no tuvieron mayor efecto, sin embargo, se indujo la producción de brotes cuando se disminuyó la cinetina a 0.5 mg l⁻¹ (Roth *et al.*, 1989).

Gaudinova *et al.*, (1995) también obtuvieron resultados negativos con tabaco en cultivos en suspensión y callos, ya que el 24-EpiBR y del THA-BR, tuvieron un efecto demeritorio sobre el crecimiento de los cultivos, mismo que se acrecentó conforme aumentó el contenido de citocininas endógenas. De esta forma se encontró un efecto antagónico de las citocininas a los BRs. Por otra parte, se observó una correlación positiva entre el crecimiento de los tejidos en presencia de THA-BR y el contenido endógeno de AIA; también encontraron una correlación negativa del crecimiento en presencia del AIA respecto a las citocininas endógenas en los cultivos que contenían al 24-EpiBR. Lo anterior confirma que hay una fuerte influencia de los BRs sobre el contenido endógeno de auxinas.

1.3.5 Efecto de los brasinoesteroides en la morfogénesis *in vitro*

Al haberse reportado evidencias de que los BRs podían tener efectos benéficos sobre el cultivo, diversos autores han realizado ensayos con BRs para determinar si tienen algún efecto sobre la morfogénesis *in vitro*. A continuación se presentan algunas evidencias del efecto estimulador de estos reguladores en el proceso morfogénico.

Ponsamuel *et al.*, (1998) desarrollando un protocolo de regeneración de cacahuete (*Arachis hypogea* cv. Ocrum) encontraron que al utilizar explantes de plúmula de semillas maduras, de las yemas latentes se originaron 3 veces más brotes cuando los explantes fueron cultivados sobre medio que contenía 1 μ M de un análogo del BL.

En la planta halófito *Spartina patens* (Aith. Mehl), una monocotiledónea de la familia *Poaceae*, el BL tuvo efecto al incrementar el porcentaje de regeneración de brotes en 425% respecto al control, cuando se utilizó a una concentración de 0.03 mg l^{-1} . Por otra parte una concentración de 0.005 mg l^{-1} , potenció el crecimiento de los brotes regenerados en 395%, respecto al control, a los 40 días de cultivo. En ambos casos las concentraciones de auxinas y citocininas fueron las mismas para cada tratamiento (Zhou *et al.*, 2003).

En el caso de embriogénesis somática, Ponsamuel *et al.*, (1996) demostraron que concentraciones micromolares de un compuesto análogo del BL, estimularon la maduración de embriones de té (*Camelia japonica*) durante el estado de torpedo y hasta la obtención de plántulas.

Recientemente en cocotero, Azpeitia *et al.*, (2003) encontraron un efecto estimulador de los BRs sobre la embriogénesis somática. Ellos establecieron un experimento con explantes de plúmula, en el cual éstas se sometieron a un pretratamiento con HBR en concentraciones de 0.01 y $0.1 \text{ } \mu\text{M}$ durante 3 días en un medio modificado sin carbón activado y una concentración de $1 \text{ } \mu\text{M}$ de 2,4-D. Estas condiciones permitieron obtener un incremento de 100% en la formación de embriones somáticos (10.8 embriones por cada callo embriogénico) con respecto al control sin HBR (6 embriones por callo embriogénico).

1.4 JUSTIFICACION

Las poblaciones de cocotero en el país e incluso en la región del Caribe, se encuentran bajo la amenaza constante de plagas y enfermedades, en particular el AL, y con una carga de edad de las plantaciones. Existe por lo tanto la necesidad de contar con materiales mejorados en características de interés, como mayor rendimiento en la producción de frutos, contenido de agua, copra y resistencia a enfermedades. Una alternativa es la propagación clonal del cocotero. Esta situación implica la obtención de una metodología eficiente de propagación tanto para aplicaciones prácticas, como para su utilización en otras metodologías que requieran la regeneración *in vitro* de la especie, como es la transformación genética. Sin embargo, poco se sabe de los procesos *in vivo* que ocurren en las células. Los reguladores del crecimiento juegan un papel importante en la respuesta morfogénica en cocotero. Al respecto se ha encontrado que los BRs estimulan la formación de callo embriogénico y callo con embriones en explantes de cocotero, sin embargo hasta la fecha se desconoce el mecanismo por el cual estos BRs estimulan la formación de callo y embriones. Para contribuir al entendimiento de como actúan los BRs en explantes de cocotero cultivados *in vitro*, el presente trabajo pretende estudiar la expresión del gen *CDKA* implicado en la regulación del ciclo celular. Para esto se ha planteado la siguiente hipótesis:

1.5 HIPOTESIS

Si la aplicación del HBR en explantes de plúmula favorece la ES, como resultado de la asociación de este proceso al ciclo celular, entonces es probable que se produzca una respuesta diferencial en la expresión del gen de la *CDKA* implicado en la regulación del ciclo celular.

1.6 OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el efecto estimulador de los BRs sobre la ES en explantes procedentes de estructuras embriogénicas y evaluar la relación con la expresión de genes reguladores del ciclo celular.

Objetivos específicos:

1. Estudiar el efecto de tres concentraciones del HBR, en la expresión a los 90 días del gen *CDKA*, mediante la técnica de PCR cuantitativa, durante la etapa I de la embriogénesis somática en *Cocos nucifera* L.
2. Determinar el patrón espacio-temporal del gen *CDKA*, mediante la técnica de hibridación *in situ* durante la etapa I de la embriogénesis somática en *Cocos nucifera* L.

1.7 LITERATURA CITADA

- Azpeitia A. 2003. Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de explantes de plúmula. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 129 pp.
- Azpeitia A; Chan JL; Sáenz L; Oropeza C. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 78:591-596.
- Bajguz A, Tretyn A. 2003. The chemical characteristics and distribution of brassinosteroids in plants. Phytochemistry 62:1027-1046.
- Beato M, Herrlich P, Schutz G. 1995. Steroid hormone receptors-Many actors in search of a plot. Cell. 83:851-857.
- Berger KG, Ong SH. 1985. The industrial uses of palm and coconut oils. Oléagineux. 40:613-624.
- Bishop GJ, Yokota T. 2001. Plant steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. Plant Cell Physiology. 42:114-120

- Branton RL, Blake J. 1986. *In vitro* plantlet development from calloid derived from immature inflorescence of *Cocos nucifera* L. En: Abstract of VI International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Editado por Somers DA, Gengebach BG, Biesboer DO, Hackett WP y Green CE.
- Burssens S, Van Montagu M, Inzé D. 1998. The cell cycle in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36:9-19.
- Chabouté ME, Clément B, Sekine M, Philipps G, Chaubet-Gigot N. 2000. Cell cycle regulation of the tobacco ribonucleotide reductase small subunit gene is mediated by E2F-like elements. *The Plant Cell*. 12:1987–1999.
- Chan JL, Sáenz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 17:515-521.
- Chory J, Nagpal P, Peto CA. 1991. Phenotypic and genetic analysis of *det2* a new mutant that affects light-regulated seedling development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 3:445-459.
- Chua NH. 1999. Trends in plant cell cycle research. *The Plant Cell*. 11:1-4.

Clouse SD, Sasse JM. 1998. Brassinosteroids: essential regulators of plant growth and development. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:427-451.

Clouse SD, Zurek DM. 1991. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. En: *Brassinosteroids chemistry, bioactivity, & applications*. Editado por Cutler HG, Yokota T, Adam G. American Chemical Society, Washington D.C. pp 122-140

Cockcroft CE, Bart GW, Den Boer JM, Healy S, Murray JAH. 2000. Cyclin D control of growth rate in plants. *Nature*. 405:575-579.

Dalhgren TR, Clifford TH, Yeo FP. 1985. The families of the monocotyledons. *Structure, Evolution and Taxonomy*. Springer-Verlag Berlin. pp 467-479.

De Veylder L, Beeckman T, Beemster GT, de Almeida Engler J, Ormenese S. 2002. Control of proliferation, endoreduplication and differentiation by the *Arabidopsis* E2Fa-DPa transcription factor. *EMBO Journal*. 21:1360-68.

Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquard A. 2003. Altered cell cycle distribution, hyperplasia and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-type cyclin CYCD3. *Plant Cell*. 15:79-92

- Doerner P, Jørgensen JE, You R, Steppuhn J, Lamb C. 1996. Control of root growth and development by cyclin expression. *Nature*. 380:520-523
- Doerner P. 2000. Cell cycle and growth regulation. En: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Editado por B. Buchanan, W. Cruissem y R. Jones. American Society of Plant Physiologists. pp 528-565.
- Domínguez EAR, González-Castillo JI, López PR. 1999. El cocotero *Cocos nucifera* L. Manual para la producción en México. INIFAP. CIRGOC. Campo Experimental Huimanguillo. Libro Técnico Núm. 6. Tabasco, México. 132 pp.
- Dou QP, Pardee AB. 1996. Transcriptional activation of thymidine kinase, a marker for cell cycle control. *Progress in Nucleic Acids Research and Molecular Biology*. 53:197-217.
- Dowdy SF, Hinds PW, Louie K, Red SI, Arnold A, Winberg RA. 1993. Physical interaction of the retinoblastoma protein with human D cyclins. *Cell*. 73:499-511.
- Dutta A, Bell SP. 1997. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annual Review of Cellular Development Biology*. 13:293-332.

Dyson N. 1998. The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Development*. 12:2245–2262.

Eckardt N. 2002. Ins and Outs of E2fs. *The Plant Cell*. 14:2977-2980.

Echevarria IM, Loyola VM. Hernández ST. 2002. La proteína del retinoblastoma en las plantas. *Revista de la Sociedad Mexicana de Bioquímica*. 46:17-22.

Eeuwens CJ. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and date palms (*Phoenix dactylifera*) cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 36:23-28.

Eeuwens CJ. 1978. Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera* L.) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 42:173-178.

Eeuwens CJ, Blake J. 1977. Culture of coconuts and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta Horticulturae*. 78:277-288.

Ewen ME. 1994 The cell cycle and the retinoblastoma protein family. *Cancer Metastasis Review*. 13:45-66.

FAOSTAT AGRICULTURE DATA. 2002. <http://apps.fao.org/cgi-bin/nph-db.pl?Subset=agriculture>.

Fernando SC, Gamage CKA. 2000. Abscisic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explant of coconut (*Cocos nucifera* L.) Plant Science. 151:193-198.

Francis D, Sorrell DA. 2001. The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. Plant Growth Regulation. 33:1-12.

Friend SH, Horowitz JM, Gerber MR, Wang XF, Bogenmann E, Li FP, Weinberg RA. 1987. Deletions of a DNA sequence in retinoblastomas and mesenchymal tumors: organization of the sequence in its encoded protein. Proceedings of National Academy of Sciences of USA. 84:9059-9063.

Gaudinová A, Sussenbekova H, Vojtechova M, Kaminek M, Eder J, Kohout L. 1995. Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. Plant Growth Regulation. 17:121-126.

George FE. 1993. Plant tissue culture techniques. En: Plant Propagation by Tissue Culture (Part 1): The Technology. Exegetics Ltd, Edington, Wilts. Editado por Edwin George F. England. pp. 3-38.

Grafí G, Burnett RJ, Helentjaris T, Larkins BA, DeCaprio JA, Sellers, WR, Kaelin WG. 1996. A maize cDNA encoding a member of the retinoblastoma protein family: Involvement in endoreduplication. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 93:8962-8967.

Graille J, Lozano P, Pioch D, Geneste P. 1985. Essais d'alcoolyse d'huiles végétales avec descatalyseurs naturels pour la production de carburants diesels. *Oléagineux*. 5:271-276.

Harries CH. 1990. Lethal yellowing disease of coconut in Jamaica: history, strategy and results. En: *La problemática del amarillamiento letal del cocotero en México*. Editado por Robert LM y Zizumbo D. pp 159-169.

Hartwell LH, Weinert TA. 1989. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 246:629-634.

He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY. 2002. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 99:10185-10190.

- Hemerly AS, Ferreira P, Engler JA, Montagu MV, Engler M, Inzé D. 1993. *Cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *The Plant Cell*. 5:1711-1723.
- Hemerly AS, Ferreira PCG, Van Montagu M, Inzé D. 1999. Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link? *BioEssays*. 21:29-37.
- Himanen K, Boucheron E, Vannestes S, De Almeida EJ, Inzé D, Beckman T. 2002. Auxin mediated cell cycle activation during early lateral root initiation. *Plant Cell*. 14:2339-2351.
- Hindley J, Phear GA. 1984. Sequence of cell division gene from CDC2 from *Schizosaccharomyces pombe*: patterns of splicing and homology to protein kinases. *Gene*. 31:129-134.
- Hoche V, Verdeil JL, Grosdemange F, Huet CH, Bordeix R, N'cho Y, Sangare A, Hornung R, Jans Jörg J, Rillo E, Oropeza C, Hamon S. 1998. Collaboration internationale pour la maîtrise de la multiplication végétative *in vitro* du cocotier (*Cocos nucifera* L.). *Cahiers Agricultures*. 7:499-505.
- Hornung R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plantations Recherche Développement*. 2:38-41.

- Hu Y, Bao F, Li J. 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct ¹⁴CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 24:693-701.
- Inzé D. 2003: Why should we study the plant cell cycle? *Journal of Experimental Botany*. 54:1125-1126.
- Jacqmard A, Houssa C, Bernier G. 1994. Regulation of the cell cycle by cytokinins. En: *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*. Editado por Mok DS y Mok M. CRC Press. pp.197-215.
- Joubés J, Chevalier C, Dudits D, Heberle-Bors E, Inzé D, Umeda M, Renaudin JP. 2000. CDK-related kinases in plants. *Plant Molecular Biology*. 43:607-620
- Lee WH, Shew JY, Hong FD, Sery TW, Donoso LA, Bookstein R, Lee EY. 1987. The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity. *Nature*. 329:642-645.
- Li J, Chory J. 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*. 90:929-938.
- Mandava NB. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 39:25-52.

- Martinez MC, Jorgensen J-E, Lawton MA, Lamb CJ, Doerner PW. 1992. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. Proceedings of National Academy of Sciences of USA. 89:7360-7364.
- Magyar Z, Meszaros T, Miskolczi P, Deak M, Feher A, Brown S, Kondorosi E, Athanasiadis A, Pongor S, Bilgin M, Bako L, Koncz C, Dudits D. 1997. Cell cycle phase specificity of putative cyclin-dependent kinase variants in synchronized alfalfa cells. Plant Cell. 9:223-235.
- Meijer M, Murray JAH. 2000. The role and regulation of D-Type cyclins in the plant cell cycle. Plant Molecular Biology. 43:621-633.
- Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inzé D. 1999. Cyclin-dependent kinases and cell division in higher plants—The nexus. Plant Cell. 11:509–521.
- Miyazawa Y, Nakajima N, Abe T, Sakai A, Fujioka S, Kawano S, Kuroiwa T, Yoshida S. 2003. Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents. Journal of Experimental Botany. 54:2669-2678.

Murashige T. 1974. Plant propagation through tissue culture. Annual Review of Plant Physiology. 25:135-166.

Murray JAH, Doonan J, Riou-Khamlichi C, Meijer M, Oakenfull EA. 2000. G1 cyclins, cytokinins and the regulation of the G1/S transition. En: The Plant Cell Cycle and its Interfaces. Editado por Dennis Francis. Academic Press, Scheffield.

Nakaya M, Tukaya H, Murakami N, Kato M. 2002. Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiology. 43:239-244.

Nemhauser JL, Chory J. 2004. BRing it on: new insights into the mechanism of brassinosteroid action. Journal of Experimental Botany. 55:265-270.

Neumann KH. 2000. Some studies on somatic embryogenesis, a tool in plant Biotechnology. 87th Indian Science Congress. Pune, India.

Oh MH, Clouse SD 1998. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. Plant Cell Reports. 17:921-924.

Ohler JH. 1999. Modern Coconut Management. Palm Cultivation and Products. FAO. Pag. Web.

[http://ecoport.org/EP.exe\\$PassCheckStart?ID=E127](http://ecoport.org/EP.exe$PassCheckStart?ID=E127)

- Oropeza C, Chan JL. 1995. Protocol for the formation of somatic embryos from coconut plumule explants. En: Compendium of protocols. Editado por Verdeil JL. STD3 (ERTBTS3*CT940298). ORSTOM-CIRAD, Montpellier, Francia.
- Oropeza C, Rillo E, Hocher V, Verdeil J-L. (En prensa). Coconut micropropagation. En: Status of Coconut Genetic Resources. Editado por Batugal P y Rao R. IPGRI-APO, Serdang, Malasia.
- Pearson, BE, Nasheuer H-P, Wang TS-F. 1991. Human DNA polymerase α gene: sequences controlling expression in cycling and serum-stimulated cells. *Molecular Cellular Biology*. 11:2081-2095.
- Pérez-Núñez MT. 2005. Ciclo celular y embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.). Documento predoctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 100 pp.
- Pérez-Núñez MT, Chan JL, Sáenz L, González T, Verdeil J-L, Oropeza C. Improved somatic embryogenesis from coconut (*Cocos nucifera* L.) plumule explants cultured *in vitro*. *In Vitro Cellular Development Biology of Plant*. Sometido.
- Pierik RL. 1987. Preparation and composition of nutrient media. En: *In vitro* culture of higher plants. Editado por Pierik RLM. Martinus nijhoff Publishers. pp. 45-82.

- Pines J. 1995. Cyclins and cyclin dependent kinases: theme and variations. *Advances in Cancer Research*. 66:181-212
- Ponsamuel J, Samson NP, Geneshan PS, Sathyaprakash V, Abraham GC. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledonary tissues of cultivated tea (*Cammellia sinensis* L.). *Plant Cell Reports*. 4:210-214.
- Ponsamuel J, Huhman DV, Cassidy BG, Post-Beittenmiller D. 1998. *In vitro* regeneration via caulogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumulas explants of peanut (*Arachys hypogea*). *Plant Cell Reports*. 17:373-378.
- Popenoe J. 1979. Coconut varieties and propagation. En: *Coconuts: Production, processing products*. Editado por Woodroof JG. Avi. Publishing Co. pp 17-29.
- Purseglove WJ. 1968. The origin and distribution of the coconut. *Tropical Science*. 10:191-199.
- Ramírez JG, Piña RJ. 1998. Áreas con potencial para el cultivo de cocotero (*Cocos nucifera* L.) bajo condiciones de temporal en la República Mexicana. Estudio de gran visión. INIFAP, CIR-Sureste. 42 pp.

- Renaudin JP, Doonan JH, Freeman D, Hashimoto J, Hirt H, Inzé D, Jacobs T, Kouchi T, Rouze P, Sauter M, Savoure A, Sorrel DA, Sundaresan V, Murray JAH. 1996. Plant cyclins: a unified nomenclature for plant A-, B- and D-type cyclins based on sequence organization. *Plant Molecular Biology*. 32:1003-1018.
- Reyes-Jael M. 1985. Coconut varieties for sugar production. *Coconuts Today*. 3:30-31.
- Roudier F, Fedorova E, Györgyey J, Feher A, Brown S. 2000. Cell cycle function of a *Medicago sativa* A2-type cyclin interacting with a PSTAIRE-type cyclin-dependent kinase and a retinoblastoma protein. *Plant Journal*. 23:73-83
- Roth PS, Bach TJ, Thompson MJ. 1989. Brassinosteroids: potent inhibitors of growth of transformed tobacco callus cultures. *Plant Science*. 59: 63-70.
- Sáenz, LA. 1999. Desarrollo de protocolos para la regeneración de *cocos nucifera* L. a través de embriogénesis somática. Tesis doctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. 123 pp.
- Sala C, Sala F. 1985. Effect of brassinosteroid on cell division and enlargement in cultured carrot (*Daucus carota* L.) cells. *Plant Cell Reports*. 4:144-147.

- Samosir YMS, Godwin ID, Adkins SW. 1999. The use of osmotically active agents and abscisic acid can optimize the maturation of coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryos. En: Current Advances in Coconut Biotechnology. Editado por Oropeza C, Verdeil J-L, Ashburner GR, Cardeña R y Santamaría J. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 341-354.
- Segers G, Rouzé P, Van Montagu M, Inzé D. 1997. Cyclin-dependent kinases in plants. En: Plant cell proliferate and its regulation in growth and development. Editado por Bryant JA, Chiatante y John Wiley. Chichester, UK. pp 1-19.
- Shaul O, Van Montagu M, Inzé D. 1996. Cell cycle control in *Arabidopsis*. *Annals of Botany*. 78:283-288.
- Slansky JE, Li Y, Kaelin WG, Farnham PJ. 1993. A protein synthesis-dependent increase in E2F1 mRNA correlates with growth regulation of the dihydrofolate reductase promoter. *Molecular Cellular Biology*. 13:1610-1618.
- Slansky JE, Farnham PJ. 1996. Transcriptional regulation of the dihydrofolate reductase gene. *BioEssays*. 18:55-62.
- Stals H, Inzé D. 2001. When plants decide to divide. *Trends in Plant Science*. 6:359-364.

- Thampan PK. 1982. Handbook on coconut palm. 2da. Edición. Oxford e IBH Publishing. pp 27-57.
- Uhl NW, Dransfield J. 1987. Genera Palmarum. The L.H. Bailey Hortorium and International Palm Society. Allen Press, Lawrence, Kansas. pp 1-6.
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemanges F, Rival A, Buffard Morel J. 1992. Coconut (*Cocos nucifera* L.) somatic embryogenesis: Obtention of several clone ramets. *Oléagineux*. 47:465-469.
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemanges F, Rival A, Buffard Morel J. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 3:218-221.
- Verdeil JL, Buffard–Morel J. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.) En: *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 30. Somatic embryogenesis and synthetic seed I. Editado por Bajaj YPS. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Alemania. pp 299-317.
- Villalobos AV, Thorpe AT. 1991. Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Editado por Roca WM y Mronginsk LA. Edit. Técnicos, CIAT; pp 127-172.

- Wang H, Zhou Y, Gilmer S, Whitwill, Fowke LC. 2000. Expression of the plant cyclin-dependent kinase inhibitor ICK1 affects cell division, plant growth and morphology. *Plant Journal*. 24:613-623.
- Weinberg RA. 1995. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*. 81:323-330.
- Xie Q, Suárez-López P, Gutiérrez C. 1995. Identification and analysis of a retinoblastoma binding motif in the replication protein of a plant DNA virus: requirement for efficient viral DNA replication. *EMBO Journal*. 14:4073-4082.
- Yamamoto R, Demura T, Fukuda H. 1997. Brassinosteroids induce entry into the final stage of tracheary element differentiation in cultured *Zinnia* cells. *Plant Cell Physiology*. 8:980-983.
- Yin Y, Wang ZY, Mora-García S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J. 2002. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*. 109:181-191.
- Yoshizumi T, Nagata N, Shimada H, Matsui M. 1999. An *Arabidopsis* cell cycle-dependent kinase-related gene, *cdc2b*, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *The Plant Cell*. 11:1883-1895.

Zhou L, Min H, Dong-Ping G, Yong-Hua Y, Xiao-Ning C, Pei Q, Jian-Ming S. 2003. Effect of brassinolide on callus growth and regeneration in *Spartina patens* (Poaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 73:87-89.

Zizumbo D. 1996. History of coconut in México, 1549-1810. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 43:505-515.

CAPITULO II

ESTABLECIMIENTO DE LOS CULTIVOS *IN VITRO*.

2.1 INTRODUCCION

Las investigaciones en el desarrollo de un protocolo eficiente para la micropropagación del cocotero han incluido diversos tipos de explantes (Hornung *et al.*, 1995) y la utilización de variaciones en el suministro de reguladores del crecimiento vegetal. A la fecha se han venido desarrollando algunas modificaciones por parte del grupo de cocotero del Centro de Investigación Científica de Yucatán, en las que se incluyen procesos de multiplicación a partir de callos embriogénicos y la utilización de embriones en estado globular para inducir callos nuevamente. Estas estrategias se proyectan como prometedoras para la obtención de líneas homogéneas generadas de una sola plúmula. Anteriormente Azpeitia (2003) había realizado experimentos de multiplicación sin resultados favorables. Asimismo, para realizar estudios de expresión génica es necesario reproducir los resultados anteriormente obtenidos por Azpeitia *et al.*, (2003). Por otra parte resulta interesante evaluar el efecto del HBR, del cual ya se tienen diversos reportes sobre su efecto en el cultivo *in vitro* de diferentes especies, en este tipo de explantes. Este capítulo reporta la utilización del HBR para estimular la formación de callo, callo embriogénico a partir de explantes de plúmulas, así como del desarrollo de embriones

somáticos de estructuras embriogénicas utilizadas como explantes, cultivadas *in vitro*.

2.2 MATERIALES Y METODOS

Material vegetal y condiciones de cultivo. Para el desarrollo de este trabajo se colectaron nueces de cocotero Enano Malayo en Dzidzantún, Yucatán. Los embriones cigóticos fueron desinfectados bajo condiciones asépticas de acuerdo al protocolo reportado por Chan *et al.*, (1998). Las plúmulas fueron cultivadas en viales de vidrio con capacidad de 35 ml conteniendo 10 ml del llamado medio I de cultivo, basado en el medio Y3 reportado por Eeuwens (1976), adicionado con sacarosa (5%), Gelrite (0.3%), carbón activado (0.25%) y 0.65 mM de 2, 4-D de acuerdo a Chan *et al.* (1998) y se establecieron bajo la condición I que consiste de oscuridad durante un periodo de tres meses a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ para inducir la formación de callo embriogénico. Al finalizar el periodo de 90 días los cultivos fueron subcultivados en el medio II, también a base de la fórmula Y3 (Eeuwens, 1976) que además contiene sacarosa (5%), Gelrite (0.3%), carbón activado (0.25%), con 300 μM de 6-BAP y 6 μM de 2,4-D de acuerdo a Chan *et al.* (1998). Esta etapa se realizó en la condición de fotoperíodo con 16 h de iluminación ($45\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ppfd)/ 8 h de oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Utilización de estructuras embriogénicas como explantes. Con la ayuda de un microscopio estereoscópico, se aislaron de callos de 75 días las estructuras embriogénicas que se encontraban en la periferia y se

cultivaron en el medio I, en condiciones I. En el caso de los tratamientos con el HBR, se procedió de igual^a forma que con los explantes de plúmula.

Todos los reactivos empleados en la formulación de los macronutrientes, micronutrientes y componentes orgánicos fueron suministrados por Sigma[®], así como los fitorreguladores utilizados (auxinas, citocininas), utilizando el carbón activado lavado ácido (plant cell culture tested, No de catalogo C-6289).

2.2.1 Diseño de tratamientos y condiciones de cultivo

Experimentos con el HBR. El HBR fue disuelto en etanol y esterilizado por filtración (Millipore 0.22 μm) y añadido al medio estéril de cultivo antes de la gelificación. Las concentraciones finales fueron de 0, 0.01, 0.1, y 1 μM . Las plúmulas fueron expuestas durante tres días de precultivo de acuerdo a Azpeitia *et al.*, (2003). La formulación del medio I para el precultivo con el HBR fue modificado: se eliminó el carbón activado, la concentración de 2,4-D se redujo a 1 μM en vez de 0.55 mM (de acuerdo a Azpeitia, 2003). Durante el precultivo se conservaron las condiciones I. Al terminar el precultivo los explantes fueron transferidos al medio I no modificado y permaneciendo durante tres meses en las condiciones I. En el caso de los callos generados de estructuras embriogénicas, fueron transferidos a medio II en las condiciones II hasta que ocurrió la formación de los embriones somáticos.

Análisis estadístico. Para los estudios de la formación de callo y callos embriogénicos, cada tratamiento consistió en tres lotes de 20 plúmulas cada uno (una plúmula por vial). Para los estudios de formación de embriones somáticos, por cada tratamiento, cada experimento consistió de 10 callos y fueron replicados tres veces. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza y a la prueba de comparación de medias S-N-K ($\alpha=0.05$). Estos análisis fueron realizados con el programa Sigmastat.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Experimentos realizados con explantes de plúmula

Se realizaron dos experimentos con plúmulas, utilizando diferentes concentraciones de HBR (de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos) para determinar si los datos del presente trabajo reproducían a este autor y por lo tanto si se podría probar la hipótesis planteada.

En el primer experimento los resultados morfogénicos obtenidos a los 90 días de cultivo *in vitro*, coincidieron parcialmente con los resultados de Azpeitia *et al.*, (2003). Se realizó un análisis de varianza encontrándose diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 2.1), se encontró que la concentración de 1.0 μM de HBR produjo que el 47% de las plúmulas formaran callo embriogénico, respecto al control en el que únicamente el 23 % formó callo embriogénico. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Azpeitia *et al.*, (2003)

quienes observaron que el HBR tenía un efecto positivo en la formación de callo embriogénico y en la formación de embriones somáticos.

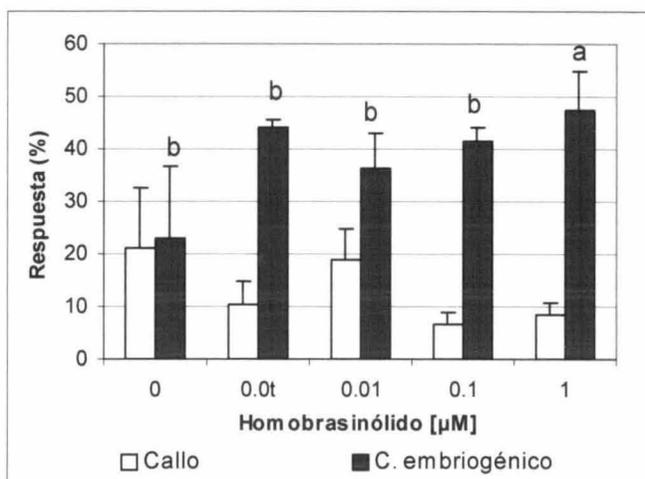


Figura 2.1. Efecto del HBR en la generación de callo y de callo embriogénico observado a los 90 días de cultivo. Estos resultados corresponden al primer experimento llevado a cabo en el presente trabajo (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 20 callos embriogénicos, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, $\alpha=0.05$; las barras representan la desviación estándar).

En un segundo experimento los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tratamientos y nuevamente se presentó un alto nivel de variación en el error estándar (Figura 2.2). Como es de esperarse, el porcentaje de callo se reduce conforme se genera el callo embriogénico. Estos resultados difieren del experimento anterior y de los resultados de Azpeitia *et al.*, (2003). Esta diferencia pudo deberse a la heterogeneidad del material vegetal y por otra parte a que el lote de carbón activado es distinto al utilizado en esos

experimentos. Este cambio podría haber afectado la concentración óptima de 2,4-D para la formación de callo embriogénico (Ebert y Taylor, 1990; Sáenz, 1999).

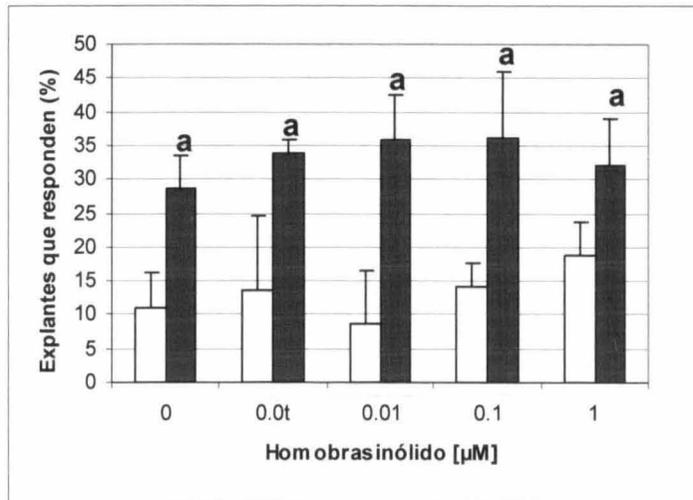


Figura 2.2. Efecto del HBR en la generación de callo y callo embriogénico a los 90 días de cultivo. Estos datos corresponden al segundo experimento llevado a cabo en el presente trabajo. Las columnas blancas corresponden al callo, las columnas negras al callo embriogénico (n=3, donde cada repetición estuvo formada con 20 callos embriogénicos, medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes, $\alpha = 0.05$; las barras representan la desviación estándar).

Los resultados de este experimento mostraron que, aunque estadísticamente no hay diferencias significativas, en este caso se observa un efecto positivo del subcultivo, tal como lo observaron Azpeitia *et al.*, (2003). La formación de callo embriogénico fue ligeramente superior en los explantes inducidos con 1.0 y 0.1 µM de HBR. Cabe mencionar que los embriones a los que se les extrajo la

plúmula habían estado sometidos a un estrés como consecuencia del paso de un huracán. Por otra parte la disponibilidad de material seleccionado fue menor que en el primer ensayo, lo que pudo también incidir en una mayor heterogeneidad en las respuestas morfogénicas. Las tendencias de estos resultados fueron corroborados por otros miembros del grupo en experimentos independientes realizados en condiciones similares a las del segundo experimento (Chan y Pérez-Núñez, com. pers.).

2.3.2 Efecto del HBR en estructuras embriogénicas como explantes

Debido a la poca disponibilidad de material biológico y al desarrollo de un proceso de multiplicación de callo por segmentación, se estableció otro experimento independiente utilizando como fuente de explante las estructuras embriogénicas de callos embriogénicos de 75 días (Figura 2.5A). Este proceso tiene las ventajas de que el suministro de material es más frecuente y también más homogénea. Al momento de su utilización las líneas sometidas a tres fases de multiplicación. Esto significa que de una plúmula se indujo callo embriogénico; este callo embriogénico fue seccionado para inducir nuevamente callo embriogénico, constituyendo el primer ciclo de multiplicación y así sucesivamente. Las condiciones de cultivo fueron las mismas que para los experimentos anteriores.

Los resultados mostraron que a los 90 días de realizado el tratamiento, no se detectaron diferencias estadísticas entre los tratamientos utilizando un análisis de varianza, a pesar de la homogeneidad del material de inicio. Sin embargo, al utilizar una prueba de *t* pareada, se detectó una diferencia significativa entre el control convencional y el tratamiento con 0.01 μM . En las demás combinaciones posibles no se encontró tal diferencia (Figura 2.3).

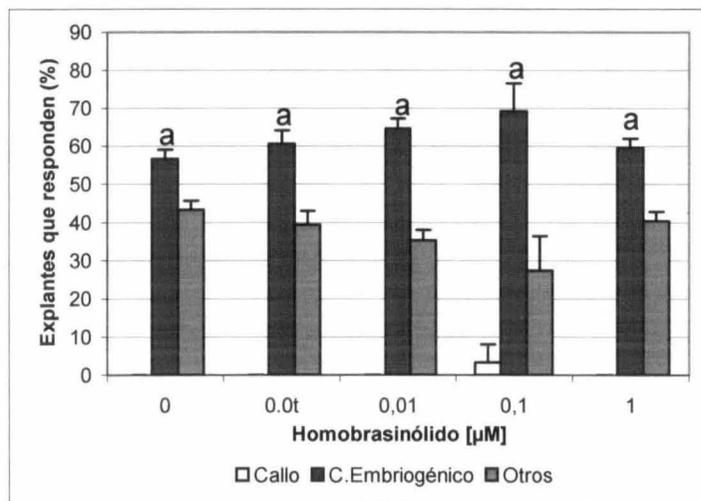


Figura 2.3. Efecto del HBR en la respuesta morfogénica a los 75 días de cultivo utilizando estructuras embriogénicas como explantes. ($n=3$, donde cada repetición estuvo formada con 20 callos embriogénicos, tratamientos con letras iguales no son estadísticamente diferentes, $\alpha = 0.05$; las barras representan la desviación estándar).

La ventaja de la utilización de este sistema, es que el tiempo requerido para la formación de callo embriogénico nuevamente es menor y la respuesta de los explantes en este proceso es mayor que el obtenido con las plúmulas (Pérez-Núñez, 2005).

2.3.3 Formación de embriones somáticos

Una vez transferidos los callos a etapa II, se dio seguimiento al desarrollo de los embriones somáticos. Finalmente a los 30 días se evaluó el número de embriones somáticos originados en cada uno de los tratamientos (Figura 2.4).

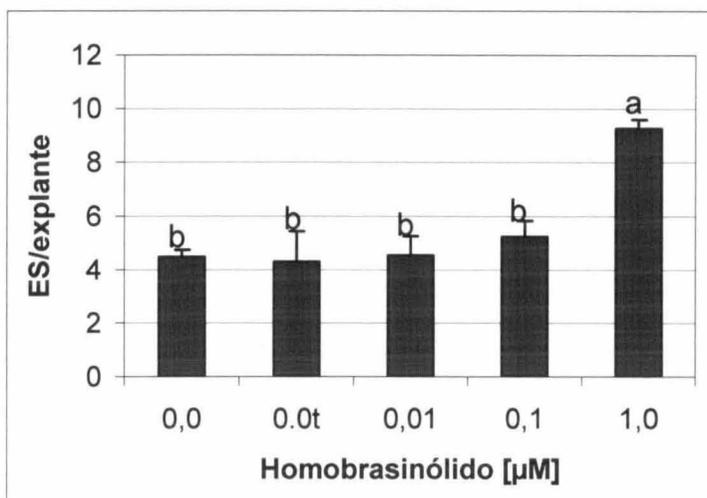


Figura 2.4. Efecto del HBR sobre la formación de embriones somáticos en callos embriogénicos obtenidos de explantes de callo. ($n=3$, donde cada repetición estuvo formada con 20 callos embriogénicos, tratamientos con letras iguales no son estadísticamente diferentes, $\alpha=0.05$; las barras representan la desviación estándar).

Los resultados indican que el HBR tuvo un efecto positivo en la formación de embriones. Este efecto fue observado con la concentración de $1.0 \mu\text{M}$ ($\alpha=0.05$). A esta concentración la formación de embriones somáticos se incrementó en más de 100% (de 4 ES/explante a 9 ES/Explante). En los otros tratamientos no existe diferencia

estadística significativa con respecto al control. Algunos de los callos que originaron embriones se presentan en la Figura 2.5.

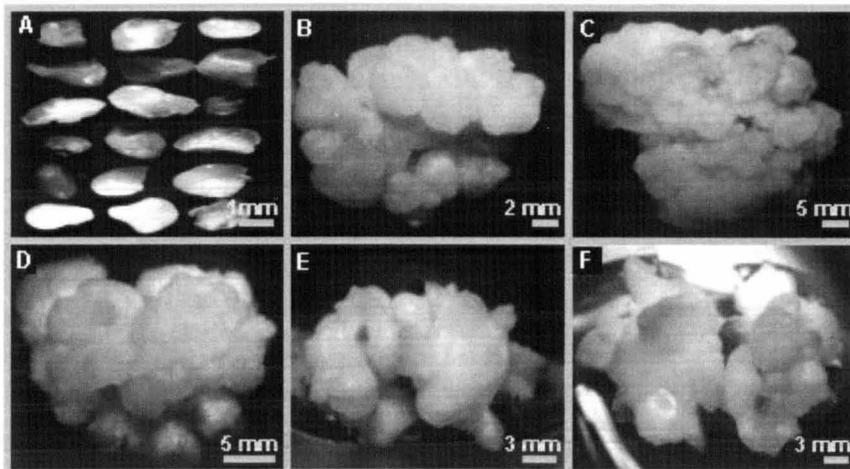


Figura 2.5. Desarrollo de embriones somáticos en explantes de callo pretratados con HBR después de 30 días de haber sido transferidos a etapa II. A) Estructuras utilizadas como explantes de callo embriogénico. B) Embriones somáticos en un callo no tratado sin subcultivo; C) ES en callo con subcultivo; D) ES en un callo con $0.01 \mu\text{M}$ de HBR; E) ES en un callo con $0.1 \mu\text{M}$ de HBR; F) ES en un callo tratado con $1.0 \mu\text{M}$ de HBR.

2.4 DISCUSIÓN

Se sabe que los BRs actúan sinérgicamente con las auxinas (Katsumi, 1985) los fitoreguladores requeridos para la inducción de los callos embriogénicos a partir de los explantes de plúmula (Hornung, 1995; Chan *et al.*, 1998) y pueden estar relacionados con el desarrollo de los embriones en plantas (Jang *et al.*, 2000). En este estudio se evaluó el efecto de un BR, el HBR, en la respuesta morfológica de los explantes

de plúmula cultivados *in vitro* con el propósito de reproducir los resultados de Azpeitia *et al.*, (2003) y de determinar si este efecto se debía a un incremento en la transcripción de un gen regulatorio de la fase G1: *CDKA*.

Se probaron diferentes concentraciones de HBR (0.01, 0.1 y 1 μ M), exponiendo los explantes al BL durante tres días de precultivo de acuerdo a Azpeitia *et al.*, (2003). Estos resultados mostraron que los explantes respondieron favorablemente a mayor concentración de HBR, lo que sugiere que incrementaron su capacidad para formar callos embriogénicos. En el segundo experimento debido a la variación observada, no hubo diferencias significativas. En el experimento con estructuras embriogénicas, si bien no hubo diferencias significativas en la formación de callo embriogénico si lo hubo en la formación de embriones somáticos, ya que se obtuvo el doble en promedio de embriones somáticos formados por callo embriogénico, cuando el HBR fue aplicado durante tres días de precultivo de acuerdo a lo obtenido por Azpeitia *et al.*, (2003). En su caso los resultados fueron más notables en la formación de callo embriogénico, en este trabajo se observa un efecto estimulador menor del HBR sobre la respuesta morfogénica. Parte del problema pudo ser debido a que el material biológico utilizado era muy heterogéneo, es decir, había una mezcla de ecotipos amarillo y verde, se había observado antes que el ecotipo amarillo es menos responsivo que el ecotipo verde (Azpeitia, 2003). Por otra parte se obtuvo una mayor formación de embriones somáticos, consistente a lo reportado por Azpeitia *et al.*, (2003) con la utilización de

estructuras embriogénicas procedentes de una línea homogénea de callos.

En general los callos embriogénicos mostraron morfológicamente una mayor abundancia de estructuras nodulares. La capacidad embriogénica ha sido asociada con la presencia de nódulos meristemáticos en diferentes especies (Schwendiman *et al.*, 1990; Alemanno *et al.*, 1996), incluyendo cocotero (Verdeil *et al.*, 1994; Chan *et al.*, 1998). Por lo tanto una mayor abundancia de estos dos tipos de estructuras puede explicar el incremento en los ES de los explantes tratados con HBR. Esta promoción de la morfogénesis por HBR en explantes de plúmula de cocotero puede estar relacionado con la acción sinérgica de los BRs con las auxinas (Katsumi, 1985) o su posible función en la regulación de señales durante la división celular y expansión celular durante el desarrollo embriogénico (Jang *et al.*, 2000). Por otro lado, los BRs son también conocidos por actuar sobre los niveles endógenos de citocininas. Gaudinova *et al.*, (1995) reportaron que en callos de tabaco, el efecto de dos BRs podría estar relacionado con los niveles endógenos de citocininas. El efecto fue inhibitorio o estimulador dependiendo de la concentración de los BRs utilizados, ya que concentraciones nanomolares la favorecieron y concentraciones micromolares, la inhibieron. Aunque los BRs utilizados por Gaudinova *et al.*, (1995) fueron diferentes a los utilizados en este trabajo, el análisis de los niveles endógenos de citocininas en callos derivados de plúmula mostró una relación inversa entre la capacidad embriogénica y el contenido endógeno de citocininas (Sáenz, 1999). De esta manera que

el HBR podría tener algún efecto sobre los niveles endógenos de citocininas en los explantes de cocotero cultivados *in vitro*.

2.5 LITERATURA CITADA

Alemanno L, Berthouly M, Michaux-Ferriere NM. 1996. Histology of somatic embryogenesis from floral tissues cocoa. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 46:187-194.

Azpeitia A. 2003. Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de explantes de plúmula. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 129 pp.

Azpeitia A, Chan JL, Sáenz L, Oropeza C. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78:591-596.

Chan JL, Sáenz L, Talavera C, Hornung R, Robert M, Oropeza C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 17:512-521.

Ebert A, Taylor HF. 1990. Assesment of the changes of 2,4-diclorophenoxyiacetic acid concentration in plant tissue culture

media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 20:165-172.

Eeuwens CJ. 1976. Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera* L.) and date palms (*Phoenix dactylifera*) cultured *in vitro*. *Physiologia Plantarum*. 36:23-28.

Gaudinova H, Süssenbeková H, Vojtěchová K, Eder J, Kohout L. 1995. Different effects of two brassinosteroids on growth, auxin and cytokinin content in tobacco callus tissue. *Plant Growth Regulation*. 17:121-126.

George EF. 1993. Plant growth regulators. En: *Plant Propagation by Tissue Culture (Part 1) The Technology*. Editado por George EF. Exegetics. pp 420-479.

Hornung R. 1995. Micropropagation of *Cocos nucifera* L. from plumular tissue excised from mature zygotic embryos. *Plantations, Recherche, Développement*. 2:38-41.

Jang JC, Fujioka S, Tasaka M, Seto H, Takatsuto S, Ishii A, Aida M, Yoshida S, Sheen, J. 2000. A critical role of sterols in embryogenic patterning and meristem programming revealed by the *fackel* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*. 14:1485-1497.

- Katsumi M. 1985. Interaction of a brassinosteroid with AIA and GA₃ in the elongation of cucumbers hypocotyls sections. *Plant Cell Physiology*. 26:615-625.
- Mandava NB. 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 39:23-52.
- Pérez-Núñez MT. 2005. Ciclo celular y embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.). Documento predoctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 100 pp.
- Ponsamuel J, Samson NP, Geneshan PS, Sathyaprakash V, Abraham GC. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledonary tissues of cultivated tea (*Camellia sinensis* (L). O. Kuntze). *Plant Cell Reports*. 34:210-214.
- Ponsamuel J, Huhman DV, Cassidy BG, Post-Beittenmiller D. 1998. *In vitro* regeneration via caulogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumular explants of peanut (*Arachys hypogea* L.) CV. Okrun. *Plant Cell Reports*. 17:373-378.
- Pullman GS, Zhang Y, Phan BH. 2003. Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports*. 22:96-104.

- Sáenz LA. 1999. Desarrollo de protocolos para la regeneración de *cocos nucifera* L. a través de embriogénesis somática. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C. 123 pp.
- Schwendiman J, Pannetier C, Michaux-Ferriere N. 1990. Histology of embryogenic formation during *in vitro* culture of oil palm *Elaeis guineensis* Jacq. *Oléagineux*. 45:409-415.
- Verdeil JL, Huet C, Grosdemange F, Buffard-Morel J. 1994. Plant regeneration from cultured immature inflorescence of coconut (*Cocos nucifera* L.): evidence for somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 13:218-221.

CAPITULO III

EFECTO DEL HBR SOBRE LA EXPRESION DEL GEN *CDKA*

3.1 INTRODUCCION

La CDKA es una cinasa de serina-treonina cuya actividad es clave para que las células puedan pasar a la fase S del ciclo celular. En un trabajo previo de personal del CICY se aisló el ADNc de este gen, a partir de un banco de ADNc de plúmulas de cocotero germinadas *in vitro* en el laboratorio de Genetrop (IRD, Francia).

La expresión del gen CDKA es un indicador de la existencia de un estado de competencia a la división en las células donde se localiza (Hemerly *et al.*, 1993). Esto significa que un mayor nivel de expresión correlaciona con un mayor estado de competencia a la división. En animales, se han hecho trabajos donde se reporta la activación transcripcional del gen en etapas específicas del ciclo celular (Welch *et al.*, 1992), cuando se presentan algunas señales ambientales o estas son inducidas por fitoreguladores (De Veylder *et al.*, 1999; Riou-Khamlichi *et al.*, 2000; Inzé, 2003). Otros trabajos se han enfocado a la activación postraducciona desde un punto de vista bioquímico (Zhang *et al.*, 1996). Por otra parte, aunque se ha demostrado que los BRs tienen efectos en la activación del ciclo celular a través de la expresión de genes, como las ciclinas (Hu *et al.*, 2000; Miyazawa *et al.*, 2003) no

existen reportes de que afecten la expresión de la *CDKA* en ninguna especie.

Para determinar si el HBR tenía efecto en la expresión del gen *CDKA* se procedió a utilizar la técnica de PCR cuantitativo. Esta técnica está basada en el hecho de que la síntesis de ADN en los primeros ciclos de reacción, cuando los reactivos no son limitantes, ocurre de manera exponencial (Dorak, 2003). De tal manera, si calculamos el ciclo al cual la síntesis exponencial de ADN (ciclo umbral o Ct) en cada muestra, se encuentra por encima del nivel de fondo, y posteriormente se le compara con el valor de los umbrales de una curva estándar de fluorescencia de distintas concentraciones de ADN o con un el ciclo umbral de un gen que se expresa en forma constitutiva, se puede calcular ya sea la concentración del templado, la expresión relativa del gen respectivamente, o ambos. Esta técnica se ha utilizado con éxito para cuantificar la expresión de transcritos poco abundantes en casos clínicos de enfermedades en una fase temprana (Bustin, 2000). En plantas se ha utilizado en la caracterización de genes como los de la subunidad corta y larga de la ribulosa fosfato carboxilasa (Goda *et al.*, 2002), genes responsivos a auxinas y genes relacionados con embriogénesis (Thomas *et al.*, 2004) y su uso se ha venido ampliando en los últimos dos años. La detección del incremento de cadenas sintetizadas puede hacerse de diferentes maneras. Una consiste en incluir en la mezcla de reacción una sonda dual fluorescente (es decir tiene un fluoróforo que emite fluorescencia cuando es excitado y otro que absorbe la fluorescencia, “apagador”, cuando se encuentra cercano

al emisor) específica al ADN blanco intercalado entre los oligonucleótidos (sonda TaqMan) (Heid *et al.*, 1996) conforme ocurre la síntesis de las cadenas las sondas son degradadas y el apagador ya no puede absorber la fluorescencia emitida por el fluoróforo, por lo que puede ser detectada con una cámara que va registrando el aumento en la fluorescencia que equivale a la síntesis de nuevas cadenas de ADN. Existen otras alternativas para detectar el ADN sintetizado que no involucran sondas, como puede ser un nucleótido marcado (fluoróforo) en el iniciador. El método más simple es la inclusión de un fluoróforo que se intercala con el ADN de doble hebra sintetizado por la ADN polimerasa, como el fluoróforo SYBR-GREEN I o el bromuro de etidio y cuya fluorescencia se incrementa durante la síntesis de ADN. Para el presente trabajo se utilizó el fluoróforo SYBR-GREEN I. En un trabajo relacionado al presente, este método se reportó en la literatura para detectar transcritos de homólogos de SERK en explantes cultivados *in vitro* de girasol (Thomas *et al.*, 2004).

En esta fase del proyecto el objetivo fue determinar si el HBR tiene efecto en la activación del ciclo celular durante la etapa I de la embriogénesis somática del cocotero, determinando la expresión del gen de la CDKA en tejidos de cocotero cultivados *in vitro* con un pretratamiento con diferentes concentraciones de este compuesto.

3.2 MATERIALES Y METODOS

3.2.1 *Colecta de material vegetal*

Se colectaron los callos embriogénicos de 90 días para los cultivos provenientes de plúmula. Este período equivale al total de la etapa I. Para el caso de los callos que provenían de estructuras embriogénicas, el periodo fue de 75 días, ya que por tener un crecimiento activo el periodo de cultivo se reduce. Se tomaron 3 callos embriogénicos al azar en cada repetición del tratamiento para su posterior análisis. Para los callos de estructuras embriogénicas además de los callos embriogénicos, también se incluyó el muestreo de callos no embriogénicos para el análisis de expresión.

Se extrajo el ARN total a 200-300 mg de tejido de cada uno de los tratamientos utilizando Trizol (INVITROGEN, USA) según las instrucciones del fabricante. Posteriormente se le dio un tratamiento con DNasa I para eliminar el ADN genómico y evitar falsos positivos por amplificación de este material. Se estimaron las concentraciones de ARN con un espectrofotómetro Beckman DU-65. Finalmente se sintetizó ADNc a partir de 4 µg de ARN de las repeticiones de cada tratamiento (ver anexo 8.1).

3.2.2 *Cuantificación relativa de la expresión de CDKA*

Para los análisis de expresión cuantitativa se utilizó un equipo de PCR en tiempo real iCycler (BIO-RAD, USA). Las reacciones se hicieron con

cantidades iguales de ADNc usando iniciadores específicos para CDKA-Fw (5' TGG ATC AGT ATG AGA AGG TGG AGA AGAT-3') y CDKA-Rv (5'-TCG ATC TCA GAA TCT ACA GGA AAC AGT G-3'). El protocolo de amplificación fue el siguiente: 1 paso de 95°C por 3 min, un segundo paso de 94°C por 1 min, 62°C por 40 s, 72°C por 40 s por 36 ciclos y un tercer paso de síntesis a 72°C por 10 min.

La interpretación de los resultados está basada en el método de cuantificación relativa de la expresión de un gen (Pfaffl, 2001; Dorak, 2003). Para esto primero se calcula la ΔCt . Este parámetro consiste en calcular el cambio, del ciclo umbral del gen de interés de (*CDKA* por ejemplo) respecto al ciclo umbral de un gen de referencia (como el *18S*), es decir que la $\Delta Ct = Ct_{\text{gen (CDKA)}} - Ct_{\text{normalizador (18S)}}$. La ΔCt de la muestra que presentó el valor más alto se le denomina ΔCt de la línea base. Este valor es restado al valor de ΔCt de las otras muestras y se le denomina $\Delta\Delta Ct$ ($\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{línea base}} - \Delta Ct_{\text{muestra}}$). El último paso en la comparación del nivel de expresión fue calcular las unidades relativas con la fórmula: $UR = 2^{-\Delta\Delta Ct}$

3.2.3 Análisis de productos amplificados por PCR

Los productos finales de la PCR cuantitativa de *CDKA*, obtenidos a partir del ARN de los tejidos bajo diferentes pretratamientos de HBR, fueron corridos por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, a un voltaje de 80 V durante 25 min. Los productos amplificados fueron teñidos con una solución de bromuro de etidio ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$) durante 15

min. Los geles fueron fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta con una cámara digital KODAK (Mod. DC120).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Estandarización de la técnica de PCR cuantitativa

a) *Prueba de especificidad de oligonucléotidos.* Con la técnica de PCR cuantitativa y el empleo de SYBR-GREEN I como fluoróforo, se determinó si la amplificación del gen *CDKA* con los iniciadores es específica, es decir, no hay formación de dímeros u otros productos no específicos. Esto es importante ya que al utilizar un fluoróforo que se intercala al ADN de manera inespecífica, al presentarse la formación de dímeros en las reacciones, los resultados se ven afectados debido a que el Ct resulta sobreestimado. Para verificar la existencia de estos productos no deseados, se realizaron reacciones de PCR a partir de ADNc sintetizado de ARN de callos embriogénicos de plúmula con diferentes concentraciones de HBR (Figura 3.1). A los productos finales después de la reacción de PCR cuantitativa (36 ciclos), se realizó una curva de desnaturalización para determinar la presencia de un sólo producto amplificado en cada reacción. Los resultados mostraron un solo pico de fusión a los 86°C lo que indica que no hay formación de dímeros (Figura 3.1A), de otra manera se observaría otro pico a una temperatura de fusión más baja. Con este experimento se determinó que los oligonucléotidos CDK-Fw y CDK-Rv, podían ser utilizados en los ensayos posteriores. Por otra parte, también se verificó que los

productos amplificados procedieran del ADNc sintetizado y no de contaminación genómica. Para esto se realizó una PCR con el ARN extraído de algunas muestras empleado para hacer la síntesis del ADNc (Figura 3.1B).

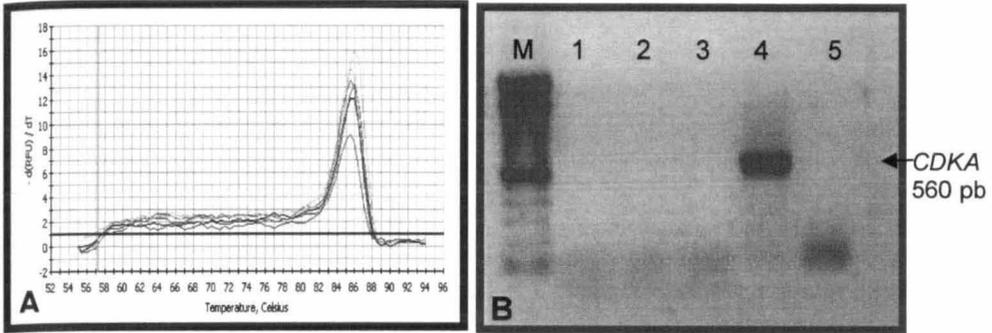


Figura 3.1. Pruebas de dimerización de los oligonucleótidos. A) Curva de desnaturalización del amplicón de CDKA con varias muestras; la presencia de un pico único indica la existencia de un solo producto amplificado. B) Controles negativos de la RT-PCR semicuantitativo para el mismo gen obtenidos utilizando el ARN de cada tratamiento. Con este ensayo se determinó la ausencia de amplificación de ADN genómico. M: Marcador de peso molecular 100 pb; 1) ARN de callos con 0.01 μM de HBR; 2) ARN de callos con 0.1 μM de HBR; 3) ARN de callos con 1.0 μM de HBR; 4) control positivo; 5) control negativo sin templado.

b) *Determinación de la eficiencia de la PCR.* Debido a las características de la PCR, cambios en órdenes de magnitud de 10 en las concentraciones de templado provocan diferencias de 3.3 ciclos en los umbrales de cada reacción. Por esta razón se realizó este ensayo con dos concentraciones plasmídicas del gen, una de las cuales estaba diluida 10 veces respecto a la concentración inicial (Figura 3.2). Los resultados indican que la reacción de PCR cuantitativa presentó una

diferencia de alrededor de 3.3 ciclos, tal como se esperaba entre los dos ordenes de magnitud utilizados. Debido a la naturaleza exponencial de la reacción, esta diferencia de 3.3 ciclos equivale a que el estándar esté 10 veces más concentrado que la dilución

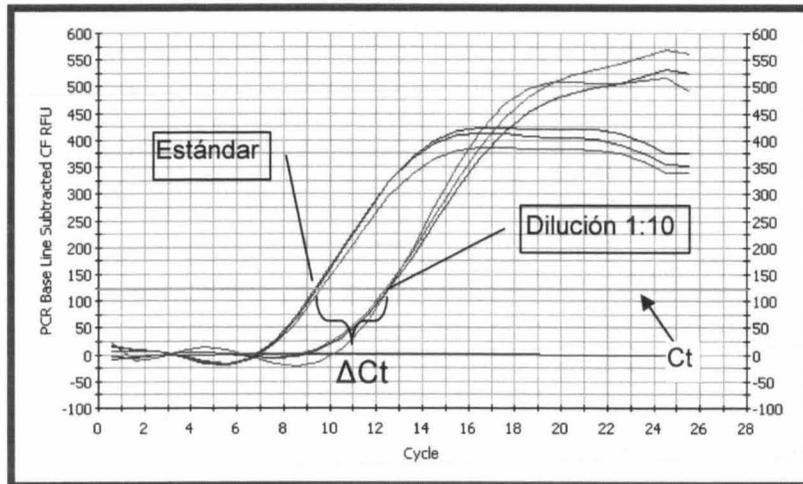


Figura 3.2. Gráfica de tiempo real de una concentración estándar de *CDKA* y su dilución 1:10. Esta prueba fue realizada para determinar la eficiencia de la PCR.

c) *Normalización de las reacciones.* La reacción de PCR tiempo real partiendo de ADNc, se normaliza utilizando un control que se encuentra expresado constitutivamente (Dorak, 2003). Tal es el caso del gen de la subunidad ribosomal 18S. Otros ejemplos de genes normalizadores son los que codifican para la β -actina y para la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Bustin, 2000; Dorak, 2003). Para la normalización de la PCR tiempo real se probaron los oligonucléotidos que amplifican la subunidad pequeña del gen ribosomal 18S para determinar el cambio en los ciclos umbral (ΔCt) entre una concentración

estándar de ADNc ($95.2 \text{ ng } \mu\text{l}^{-1}$) y su dilución 1/10. De esta forma, al igual que en el caso anterior, se espera que haya una diferencia de 3.3 ciclos del Ct de cada dilución (Figura 3.3).

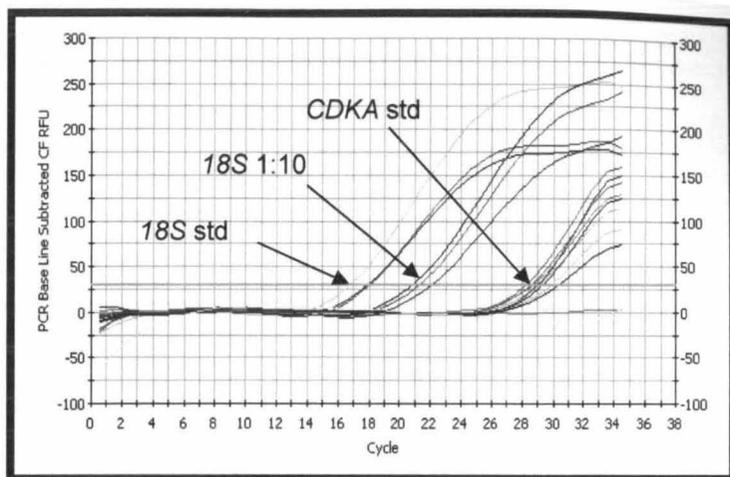


Figura 3.3. Gráfica de determinación de la linealidad para el gen 18S, tras 36 ciclos de amplificación.

3.3.2 Expresión de CDKA en callos originados de plúmula

Se determinó la expresión relativa temporal del gen *CDKA* a los 30 y 90 días de cultivo del segundo experimento de cultivo *in vitro* por medio de la técnica de RT-PCR cuantitativo (Figuras 3.4 y 3.5). Se encontró que a los 30 días la expresión relativa del gen *CDKA* disminuyó ligeramente con respecto al control (Figura 3.4). Sin embargo, a los 90 días de cultivo se encontró un mayor nivel de expresión del gen en los callos obtenidos de explantes tratados a la concentración de $0.1 \mu\text{M}$ de HBR, correspondiente a alrededor de siete veces respecto al control (Figura

3.5A). El nivel de expresión en estos tejidos fue de una magnitud tal que pudo observarse claramente en un gel de agarosa (Figura 3.5B).

Esto coincide con lo señalado por Miyazawa *et al.*, (2003) quienes sometieron a tratamiento con BRs a cultivos celulares de la línea BY2 de tabaco y obtuvieron un incremento en el nivel de expresión de genes del ciclo celular.

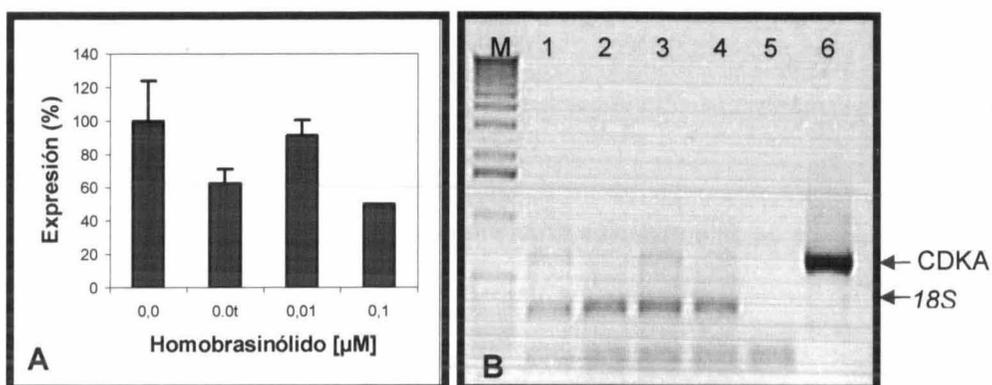


Figura 3.4. Expresión relativa del gen *CDKA* a los 30 días de cultivo. A) Porcentaje de expresión del gen *CDKA* en los callos de explantes embriogénicos tratados con HBR. Las barras representan la desviación estándar ($n=3$). B) Visualización de los productos de RT-PCR semicuantitativa de la expresión de *CDKA* en callos embriogénicos con: carriles 1) control (0.0); 2) control con transferencia (0.0t); 3) 0.01 μM de HBR; 4) tratamiento con 0.1 μM de HBR. 5) control negativo de *CDKA*; 6) control positivo de *CDKA*.

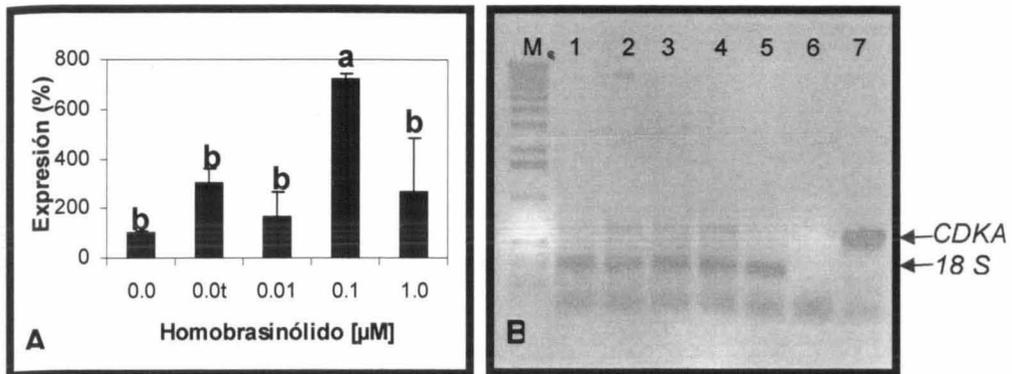


Figura 3.5. Expresión relativa del gen *CDKA* a los 90 días de cultivo. A) Porcentaje de expresión. B) RT-PCR semicuantitativa. Carriles: 1) control (0.0); 2) control con transferencia (0.0t); 3) 0.01 μM de HBR; 4) tratamiento con 0.1 μM de HBR. 5) tratamiento con 1.0 μM de HBR. 6) control negativo de *CDKA*; 7) control positivo de *CDKA*.

3.3.3 Expresión de *CDKA* en callos originados de estructuras embriogénicas

La expresión de *CDKA* en los callos originados a partir de las estructuras embriogénicas de 65 días (Figura 3.6A), se modificó con el tratamiento de HBR. La concentración de 0.01 μM incrementó el nivel de expresión relativa ocho veces en relación al control (0.0). Aunque en menor proporción, también se dio un incremento de tres veces la expresión relativa del gen a las concentraciones de 0.1 y 1.0 μM de HBR. Por otra parte, en los callos no embriogénicos se observó una disminución de la expresión de *CDKA* en los explantes tratados con las tres concentraciones de HBR utilizados (Figura 3.6B).

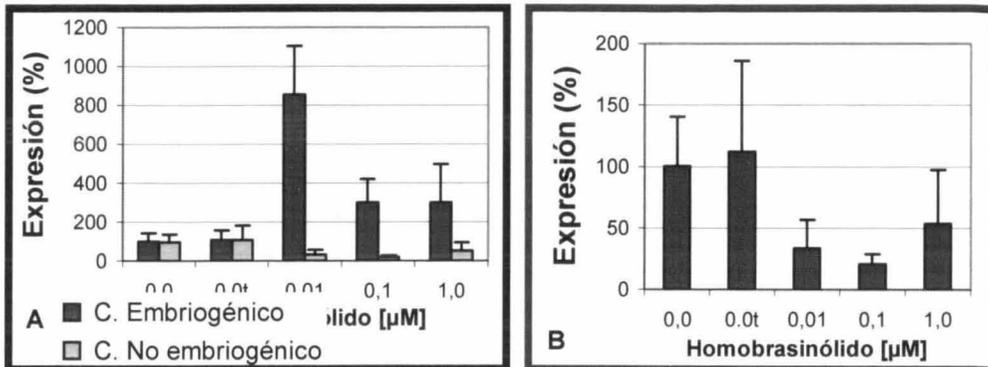


Figura 3.6. Expresión relativa del gen *CDKA* en callos embriogénicos y no embriogénicos, obtenidos de estructuras embriogénicas tratadas con HBR a los 75 días de cultivo. A) Expresión *CDKA* en callos esponjosos con respecto a la expresión encontrada en callos embriogénicos con los diferentes tratamientos. B) Expresión relativa de *CDKA* en callos no embriogénicos. Los porcentajes se calcularon con respecto al control sin tratamiento (n=3). Se graficó el promedio entre ellas.

En la Figura 3.7 se muestran los geles de electroforesis con los productos finales de la amplificación de los callos embriogénicos y no embriogénicos (Figura 3.7A y 3.7B, respectivamente) tratados con diferentes concentraciones de HBR.

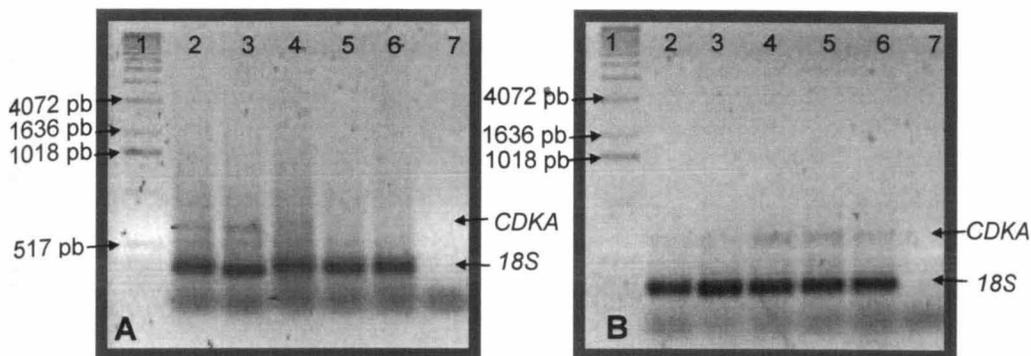


Figura 3.7. Gel de electroforesis en agarosa con los productos de PCR. A) Productos de PCR de los callos embriogénicos. B) Productos de PCR de los callos no embriogénicos. Carriles A y B: 1) Marcador de masa de 1 kb; 2) Control sin HBR (0.0). 3) Control con transferencia (0.0t); 4) 0.01 μM de HBR; 5) 0.1 μM de HBR; 6) 1.0 μM de HBR; 7) Control negativo de la PCR. 18S es el gen utilizado como normalizador.

3.4 DISCUSION

La CDKA es una cinasa dependiente de ciclinas que está relacionada con la regulación del ciclo celular a través de la vía de la retinoblastoma (Sherr, 1996). Su actividad también determina otros procesos relacionados con el citoesqueleto y la matriz nuclear. De esta forma está implicada en la determinación de las tasas de crecimiento de los tejidos y asociada a procesos morfogénicos mediante la interacción con su ciclina reguladora, por lo tanto su expresión está localizada principalmente en los tejidos con crecimiento meristemático (Hemerly *et al.*, 2000). En este trabajo se analizó su expresión en callos embriogénicos y no embriogénicos de cocotero de dos tipos de explantes con diferentes tratamientos de HBR.

Los resultados obtenidos demostraron que efectivamente el HBR tuvo un efecto positivo en la estimulación de la expresión de *CDKA* 7-8 veces en relación a los controles sin HBR. El análisis de la expresión relativa de *CDKA* de callos procedentes de explantes de plúmula, la concentración de HBR que más incrementó la expresión del gen fue 0.1 μM ; con las otras condiciones se registró un aumento que no fue consistente con el incremento o la disminución de la concentración del HBR, incluso se dio un aumento importante en el caso del control con transferencia (0.0t). Esta misma condición produjo por si misma un aumento en la generación de embriones en el trabajo de Azpeitia *et al.*, (2003).

Respecto a la expresión de *CDKA* a partir de estructuras embriogénicas utilizadas como fuente de explante, el mayor efecto en la expresión relativa del gen se obtuvo con una concentración diez veces menor (0.01 μM) del HBR. En este caso, las otras concentraciones mayores registraron 3 veces el nivel de expresión del control (0.0t). Esta diferencia podría deberse al contenido endógeno de reguladores del crecimiento en los explantes, principalmente de auxinas, ya que se ha visto que los BRs actúan sinérgicamente con este tipo de hormonas (Katsumi, 1985) mismas que tienen efecto en la tasa de división celular.

Por otro lado son pocos los estudios donde se ha demostrado el efecto de los BRs sobre los componentes que regulan alguna fase del ciclo celular. Recientemente se encontró que un gen de *Arabidopsis* que codifica para una cinasa dependiente de ciclo celular, *CDC2b*, fue

inducida por BR en la oscuridad. Sin embargo, se determinó que ese gen juega un papel importante en la elongación de hipocótilo, alargamiento del cotiledón y la formación de la curvatura apical, más que al control del ciclo celular (Yoshimuzi *et al.*, 1999). Otro gen de ciclo celular del que se ha demostrado su responsividad a BRs es el de la ciclina D3, en *Arabidopsis thaliana* (Hu *et al.*, 2003). Las células de la línea BY2 de tabaco muestran un incremento de la expresión de una ciclina mitótica y la histona H4 (Miyazawa *et al.*, 2003). Sin embargo, en el caso de la *CDKA* no existen estudios de activación transcripcional por BRs y menos aún en cocotero.

Respecto a los callos no embriogénicos, hubo una disminución de la expresión de la *CDKA* bajo las diferentes concentraciones de HBR. Este tipo de callo suele formarse frecuentemente durante el cultivo *in vitro* y no presenta estructuras embriogénicas. Sus células no se agrupan en centros meristemáticos como lo hacen los callos embriogénicos, por lo tanto se consideran no embriogénicos. La disminución en la expresión de la *CDKA* podría deberse a que este tipo de tejido tiene un crecimiento heterogéneo, pierde su potencial de proliferación y termina necrosándose y acumulando fenoles. Por otra parte, existen reportes donde los BRs han mostrado efectos negativos en la división celular, por ejemplo en células transformadas de tabaco, el BR no tuvo efecto en promover la división celular (Roth *et al.*, 1989); Azpeitia *et al.*, (2003) también encontraron que la exposición prolongada de los explantes de plúmula al HBR provoca necrosamiento general. Al respecto anteriormente se reportó que los BRs inducen la

formación de etileno (Arteca *et al.*, 1983; Arteca, 1984; Arteca *et al.*, 1984; Arteca *et al.*, 1988).

3.5 LITERATURA CITADA

Arteca RN, Tsai DS, Shlanghauser CD, Mandava NV. 1983. The effect of brassinolide on auxin-induced ethylene production by etiolated mung bean segments. *Physiologia Plantarum*. 59:539-544.

Arteca RN. 1984. Calcium acts synergistically with brassinosteroids and IAA in stimulating ethylene production in etiolated mung bean (*Vigna radiata* cv. Berken) hypocotyls segments. *Physiologia Plantarum*. 62:102-104.

Arteca RN, Schlaghauser. 1984. The effect of brassinosteroid and 2,4-D and L-aminoacid conjugates on ethylene production by etiolated mung bean (*Vigna radiata* cv, Berken) segments. *Physiologia Plantarum*. 62:445-447.

Arteca RN, Bachman JM, Mandava NB. 1988. Effects of indole-3-acetic acid and brassinosteroid on ethylene biosynthesis in etiolated mung bean hypocotyls segments. *Journal of Plant Physiology*. 133:430-435.

Azpeitia A, Chan JL, Sáenz L, Oropeza C. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants

of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 78:591-596.

Bustin SA. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 25:169-193.

Clouse SD, Zurek DM. 1991. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. En: Brassinosteroids chemistry, bioactivity, & applications. Editado por Cutler HG, Yokota T, Adam G American Chemical Society, Washington D.C., pp 122–140

De Veylder L, de Almeida Engler J, Burssens S, Manevski A, Lescure B, Van Montagu M, Engler G, Inzé D. 1999. A new D-type cyclin of *Arabidopsis thaliana* expressed during lateral root primordia formation. Planta. 208:453-62.

Dorak T. 2003. Real-Time PCR.
<http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>;

Hemerly AS, Ferreira P, Engler JA, Montagu MV, Engler M, Inze D. 1993. *Cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. The Plant Cell. 5:1711-1723.

Hemerly AS, Ferreira PC, Van Montagu M, Engler G, Inzé D. 2000. Cell division events are essential for embryo patterning and

morphogenesis: studies on dominant-negative *cdc2aAt* mutants of *Arabidopsis*. *Plant Journal*. 23:123-130.

Hu Y, Bao F, Li J. 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CycD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 24:693-701.

Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S. 2002. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 130:129-134.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Research*. 6:986-994.

Inzé D. 2003. Why should we study the plant cell cycle?. *Journal of Experimental Botany*. 54:1125-1126.

Katsumi M. 1985. Interaction of a brassinosteroid with AIA and GA₃ in the elongation of cucumbers hypocotyls sections. *Plant Cell Physiology*, 26:615-625.

Miyazawa Y, Nakajima N, Abe T, Sakai A, Fujioka S, Kawano S, Kuroiwa T, Yoshida S. 2003. Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene

- expression, and organellar DNA contents. *Journal of Experimental Botany*. 54:2669-2678.
- Nakajima N, Shida A, Toyama S. 1996. Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Japanese Journal of Crop Science*. 65:114-118.
- Oh MH, Clouse SD 1998. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports*. 17:921-924.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. Vol. 29.
- Riou-Khamlichi C, Menges M, Healy JM, Murray JAH. 2000. Sugar control of the plant cell cycle: differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Molecular Cell Biology*. 20:4513-4521.
- Roth PS, Bach TJ, Thompson MJ. 1989. Brassinosteroids: potent inhibitors of growth of transformed tobacco callus cultures. *Plant Science*. 59:63-70.
- Sherr CJ. 1996. Cancer cell cycles. *Science*. 274:1672-1677.

- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A. 2004. Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:35-42.
- Welch PJ, Wang JYJ. 1992. Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. *Proceedings of National Academy of Science of USA*. 89:3093-3097.
- Yoshizumi T, Nagata N, Shimada H, Matsui M. 1999. An *Arabidopsis* cell cycle–dependent kinase-related gene, *cdc2b*, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *The Plant Cell*. 11:1883-1895.
- Zhang K, Letham DS, John PC. 1996. Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34cdc2-like H1 histone kinase. *Planta*. 200:2-12

CAPITULO IV

DETERMINACION DE LA EXPRESION ESPACIO-TEMPORAL DE *CDKA*

4.1 INTRODUCCION

La hibridación *in situ* es una técnica que permite detectar la expresión de genes en células específicas de un tejido. El principio de la técnica consiste en el apareamiento de sondas marcadas de ADN o ARN, complementarias a la secuencia del transcrito blanco en tejidos fijados, seguido por la detección de la sonda. Durante la década de los noventa la hibridación *in situ* se convirtió en un método esencial en biología molecular y celular para la localización y detección de secuencias de transcritos de interés. La técnica es capaz de vincular secuencias de ARN con su patrón de expresión en tejidos durante el desarrollo, por lo que ha venido complementando otros métodos de análisis génico. Su uso se ha extendido en los últimos años, dada la importancia de los datos que genera en especies que no han podido ser transformadas (Schwarzacher y Harrison, 2000). Aunque existen varios tipos de hibridación *in situ* en función del tipo de sonda utilizada y si la secuencia blanco es ADN o ARN, este trabajo se refiere exclusivamente a la hibridación de ribosondas con ARN mensajeros. Estas técnicas han sido utilizadas tanto en tejidos animales, para detectar principalmente la presencia de virus como el VIH (Patterson *et al.*, 1993) como en plantas para la ubicación de mensajeros, por ejemplo, que codifican para factores de transcripción (Yanofsky *et al.*, 1990; Drew *et al.*, 1991).

Actualmente esta técnica se utiliza ampliamente para investigar la expresión de genes en células en ambos tipos de organismos.

Algunos genes asociados al crecimiento en plantas han sido estudiados utilizando técnicas como la hibridación *in situ*. Entre los genes de regulación del ciclo celular destacan *CDKA* (Martínez *et al.*, 1992; Fobert *et al.*, 1994 y 1996; Boucheron *et al.*, 2002) y ciclinas B (Fobert *et al.*, 1994; Boucheron *et al.*, 2002). Cabe mencionar que estos estudios se han realizado en meristemas donde la actividad meristemática está asociada a la aparición de primordios foliares e inflorescencias (Fobert, *et al.*, 1994). En este trabajo se presentan los pasos iniciales para establecer la técnica de hibridación *in situ* de *CDKA* en explantes de cocotero cultivados *in vitro*.

4.2 MATERIALES Y METODOS

4.2.1 Preparación de las muestras

Los callos colectados fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente fueron deshidratados en series crecientes de etanol, el cual fue sustituido después con combinaciones progresivas de etanol y un solvente de parafina (Histochoice; SIGMA, USA) en forma progresiva hasta llegar al 100 % de solvente.

A los tejidos inmersos en el solvente se les fueron adicionando hojuelas de parafina lentamente a temperatura ambiente y en agitación. Al día

siguiente los tejidos fueron incubados a 58°C con cambios frecuentes de parafina líquida, que se siguieron durante varios días hasta sustituir completamente el solvente con la parafina. Los tejidos se montaron en bloques y se cortaron en un microtomo MICROM HM 325 a un grosor de 10-14 µm; posteriormente se adhirieron a portaobjetos cubiertos con polilisina (Polyprep; SIGMA, USA) manteniéndolos en una estufa a 42°C durante 24 horas.

4.2.2 Síntesis de la sonda marcada con digoxigenina

Para la síntesis de las sondas sentido (SS) y antisentido (AS) de *CDKA*, se partió del plásmido pCDKA, el cual contiene un inserto de 1330 pb correspondiente a la secuencia total del ADNc del gen. Este ADNc se obtuvo a partir del escrutinio de una biblioteca de ápice de cocotero.

La sonda antisentido se obtuvo por la linearización de este plásmido con EcoRI, el cual fue sometido a una reacción de transcripción *in vitro* con la T7 polimerasa y el nucleótido UTP como reportero, marcado con digoxigenina (ROCHE, Alemania). De la misma manera, la sonda sentido se sintetizó del plásmido linearizado con XhoI, el cual fue utilizado como templado para otra reacción de transcripción *in vitro* con la T3 polimerasa (Figura 4.1).

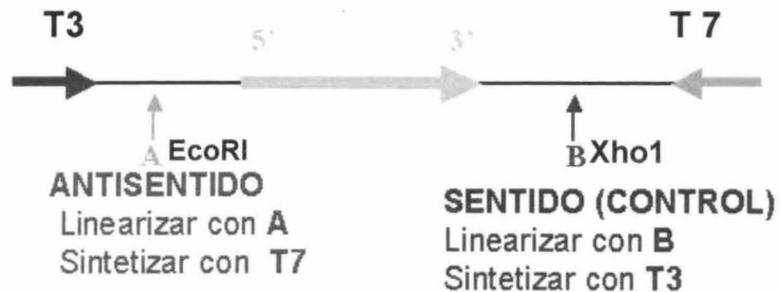


Figura 4.1. Diagrama de obtención de las sondas sentido y antisentido de pCDKA.

Dado el gran tamaño del inserto del plásmido (1.33 kb), las sondas inicialmente obtenidas fueron sometidas a una hidrólisis alcalina a 60°C durante aproximadamente 23 min para generar fragmentos de alrededor de 300 b. Las sondas obtenidas fueron cuantificadas por comparación con tiras de referencia (DIG- control test strips) y resuspendidas en amortiguador de hibridación y almacenadas a -20°C (ver protocolo detallado en el anexo 8.2.2).

4.2.3 Hibridación *in situ*

La primera parte del protocolo de hibridación *in situ* consiste en desparafinar, hidratar, permeabilizar, refijar y deshidratar el tejido que se encuentra adherido a los portaobjetos. Posteriormente se inicia la hibridación que consiste en adicionar 85-100 µl de la dilución de la sonda correspondiente a cada portaobjetos. Los portaobjetos se cubrieron con una mica especial (Coverslip, SIGMA, USA) y se colocaron en una caja húmeda cerrada herméticamente. Se probaron dos condiciones de lavado, una basada en dos lavados de formamida al

50% y SSC 2X y, por otra parte, una condición alternativa basada en dos lavados con SSC 0.1X y SDS 0.1%, seguidos de un tratamiento con ribonucleasa A. Los lavados tienen la finalidad eliminar el exceso de sonda que no haya hibridado específicamente con los mensajeros blanco. Posterior a los lavados, sigue una etapa final de detección de la sonda que consiste en un tratamiento bloqueador seguido de una incubación con el anticuerpo antidigoxigenina acoplado a una fosfatasa alcalina, una serie de lavados y el revelado que consiste en incubar los cortes en una solución de NBT/BCIP durante 24-48 horas. Los cortes hibridados se observaron al microscopio y se fotodocumentaron para su análisis. El protocolo utilizado se basó en el protocolo de Ferrándiz *et al.*, (2002) modificado por Burgeff *et al.*, (2002) (ver protocolo en anexo 8.2.3).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Síntesis de la sonda

Los pasos seguidos para la obtención de la sonda son presentados en la figura 4.2. En el panel A se ilustra la linearización de pCDKA y en el panel B, el resultado de la transcripción *in vitro*.

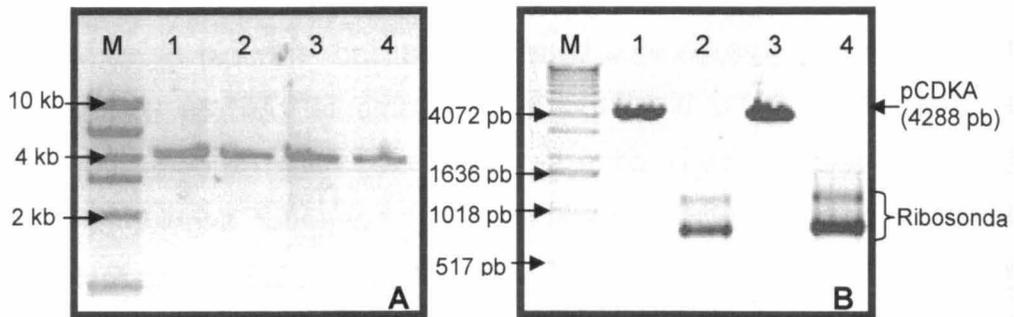


Figura 4.2. Síntesis de las ribosondas. A) gel de agarosa al 1% que indica la linearización de pCDKA (4288 pb). Carriles: M) marcador de masa molecular de 100 pb; 1 y 2) plásmido linearizado con XhoI (sonda sentido); 3 y 4) plásmido linearizado con EcoRI (sonda antisentido). B) gel de electroforesis en agarosa de los productos de la transcripción. Carriles: M) marcador de masa molecular de 1 kb; 1) plásmido linearizado con EcoRI. 2) sonda antisentido; 3) plásmido linearizado con XhoI; 4) sonda sentido (control negativo).

4.3.2 Optimización del protocolo de hibridación

La sonda antisentido corresponde a una secuencia complementaria del transcrito de *CDKA*, lo que le permite hibridar con él. Por convención, para determinar si la señal de hibridación es específica se emplea un control negativo que consiste en la utilización de la sonda marcada en dirección sentido que corresponde con la secuencia del transcrito, por lo que no debe hibridar de manera específica.

Se probaron dos protocolos de lavado, los resultados obtenidos en ensayos con una temperatura de hibridación de 52°C y lavados posteriores basados en el uso de formamida al 50% y SSC 2X (ver protocolo detallado en el anexo 8.2.4) con la sonda específica

antisentido de *CDKA* fueron heterogéneos (Figura 4.3). En algunos de estos resultados la señal fue menos intensa que la obtenida con respecto a la sonda sentido (Figura 4.3 B, F). En otros casos no se detectó ningún tipo de señal aún cuando el tejido se reveló por 48 h (datos no mostrados). Sin embargo, hubo algunos cortes que mostraron señal en las zonas de crecimiento y en regiones que coinciden con las áreas de formación de nódulos meristemáticos reportados por Azpeitia *et al.*, (2003) en sus trabajos de histología convencional (Figura 4.5 D y F). Los resultados obtenidos con la sonda sentido muestran la existencia de una señal de fondo heterogénea en la mayoría de los casos (Figura 4.3 B, D, F y 4.4 B, D, F).

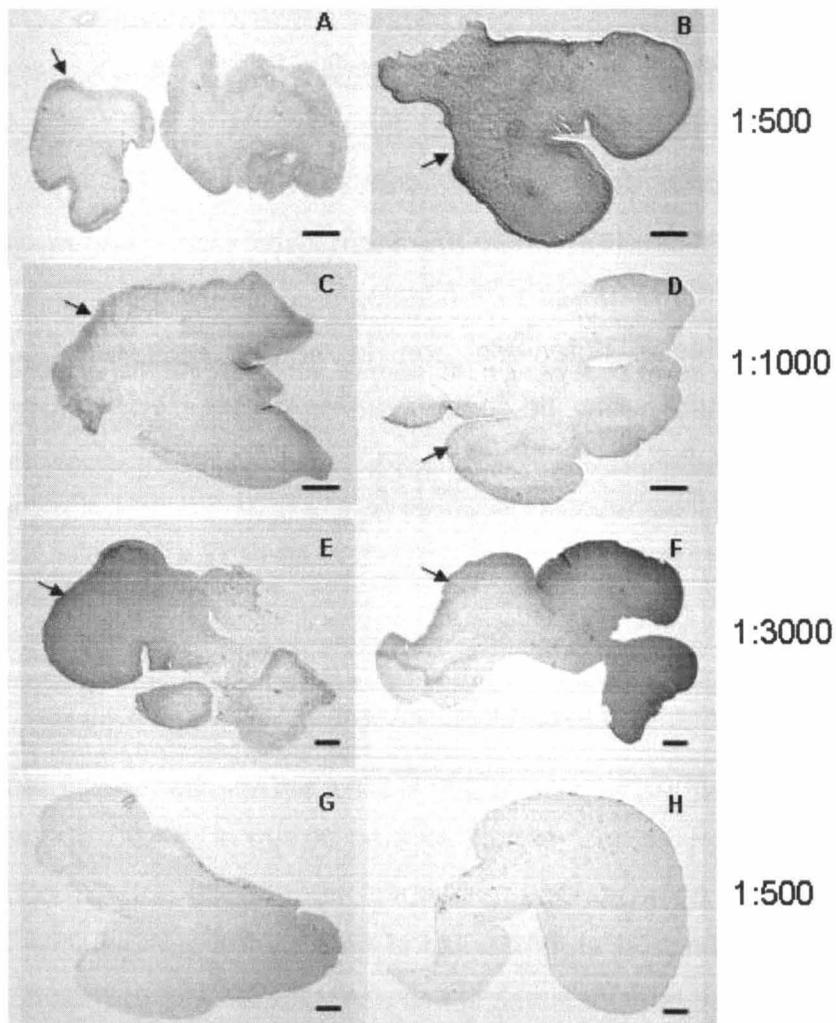


Figura 4.3. Hibridación *in situ* con sondas de *CDKA* en cortes histológicos de callos de 90 días. Resultados obtenidos a una temperatura de 52°C con lavados con formamida 50 % y SSC 2X. **A, C, E:** sonda antisentido. **B, D, F:** sonda sentido. **A-B** Dilución de Ac 1:500; **C-D** Dilución de Ac 1:1000; **E-F** Dilución de Ac 1:3000; **G-H** Controles externos, dilución de Ac 1:500; **G** testigo sin sonda; **H** sonda heteróloga del gen *FLOR1* de *Arabidopsis thaliana*. Barra: 1 mm.

En un trabajo anterior se determinó que los explantes de cocotero cultivados *in vitro* no tuvieron actividad de fosfatasa endógenas (Alcocer, 2004). Esto se realizó debido a que la detección de la sonda hibridada se basa en la utilización de un anticuerpo acoplado a una fosfatasa alcalina. Este anticuerpo reconoce a la 11-UTP-digoxigenina incorporada en la sonda y la fosfatasa alcalina hidroliza el sustrato NBT/BCIP lo que genera un precipitado insoluble de color café-azul oscuro. La presencia de actividad de fosfatasa inherente al tejido puede ocasionar un fondo natural que interfiera con la visualización de la sonda correspondiente. En dicho trabajo no se encontró actividad de esta enzima, por lo que el método de revelado es adecuado para la detección de la expresión de *CDKA* (Alcocer, 2004). En este trabajo se corroboró que no existe esta actividad enzimática al no encontrarse señal en los testigos sin sonda (Figura 4.3 G y 4.4 G). Estos testigos además permiten determinar si el anticuerpo interacciona con algún componente del tejido de cocotero. En la Figura 4.3G el tejido no presenta señal alguna, por lo que no parece haber interacción del anticuerpo con las estructuras de la célula del cocotero.

Por otra parte, para descartar un efecto de pegado inespecífico de la sonda que pudiera producir señal de fondo, se utilizó una sonda antisentido para el gen *FLOR1*, específico de inflorescencias de *Arabidopsis thaliana* (Gamboa *et al.*, 2001) donado por la Dra. A. Gamboa, Instituto de Ecología, UNAM. En nuestro sistema no se encontró señal de fondo aún con altas concentraciones de anticuerpo (1:500; Figura 4.3 H).

Este mismo tipo de resultados se obtuvieron en un principio con una temperatura de 50°C, por lo que se incrementó la temperatura a 52°C, buscando que la señal de fondo disminuyera al aumentar la astringencia de las condiciones de hibridación y de lavado.

De forma alterna a los lavados con formamida, se implementó otro tipo de lavados a base de SDS al 0.1% y SSC 0.1X, seguido de un tratamiento con ribonucleasa A, (Burgeff com. Pers.; ver protocolo detallado en anexo 8.2.4). Con este tratamiento se buscó disminuir la señal de fondo. En la figura 4.4 se presentan los resultados obtenidos con este tipo de lavados y diferentes concentraciones de anticuerpo.

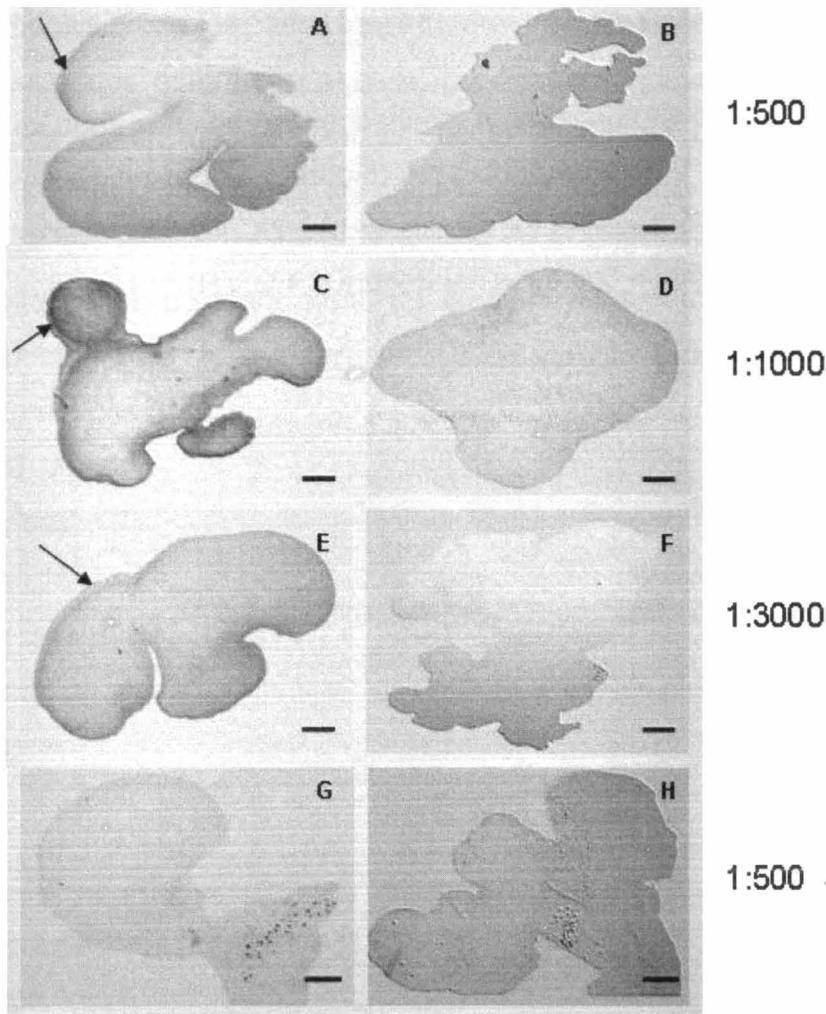


Figura 4.4. Hibridación *in situ* con sondas de *CDKA* en cortes histológicos de callos de 90 días. Resultados obtenidos a una temperatura de 50°C con lavados a base de SSC 1x y SDS 0.1X seguidos de un tratamiento con RNasa A. **A, C, E:** sonda antisentido. **B, D, F:** sonda sentido. **A-B** Dilución de Ac 1:500; **C-D** Dilución de Ac 1:1000; **E-F** Dilución de Ac 1:3000; **G-H** Controles externos, dilución de Ac 1:500; **G** testigo sin sonda; **H** sonda heteróloga del gen *FLOR1* de *Arabidopsis thaliana*. Nótese la existencia de un patrón de tinción muy fuerte cercano a los bordes y que ha sido señalado con flechas. Barra: 1 mm.

Con este lavado se encontraron resultados favorables cuando se utilizó una dilución de 1:1000 de anticuerpo (Figura 4.4 C). Al igual que en el caso de los lavados con la formamida y SSC 2X, los controles externos no produjeron ningún tipo de señal (Figura 4.4 G y H).

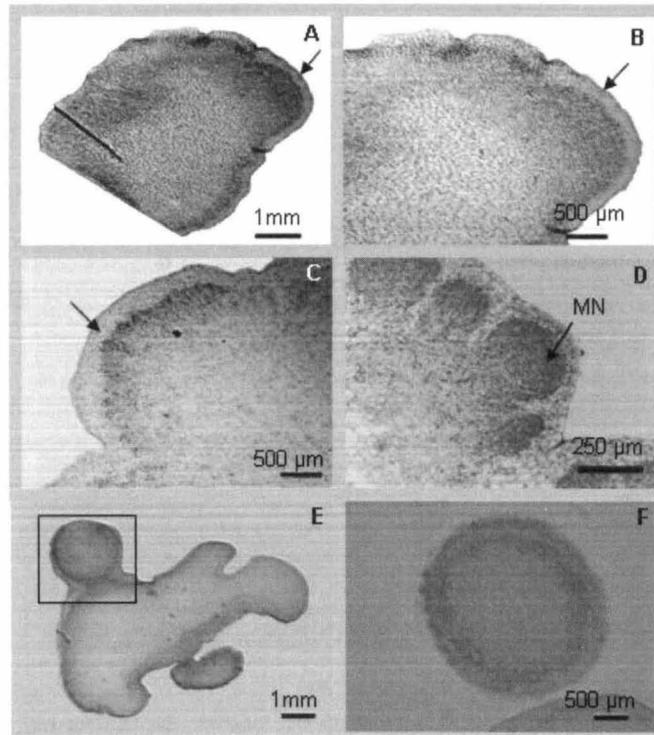


Figura 4.5. Expresión de *CDKA* en callos embriogénicos de 90 días, comparados con cortes histológicos con tinciones clásicas. **A, B, C, E:** Vista general del patrón de expresión obtenido con la sonda AS de *CDKA*. **B, C:** Acercamiento de las zonas de mayor nivel de expresión, donde puede observarse con mayor detalle la marca específica de la hibridación (flechas). **D:** Tinción con naftol blue black (cortesía de Alfonso Azpeitia). Obsérvese la conformación de nódulos meristemáticos hacia los bordes del callo. **F:** Tinción diferencial con Schiff/naftol blue black de una zona con crecimiento activo.

La composición de los callos muestra que hay diferentes morfologías de las células que conforman al callo, por lo que se detectaron al menos dos tipos de tinción, una en la que la tinción se observa hacia la periferia y por otra parte en células con un patrón de crecimiento periclinal en donde existe un área cercana a la protodermis que no presenta señal, posteriormente un área muy marcada de crecimiento que posteriormente pueden dar origen a los llamados nódulos meristemáticos (Figura 4.5 C y D) de acuerdo a lo descrito por Verdeil y Buffard Morel (1995), Fernando *et al.*, (2003), y Azpeitia *et al.*, (2003). En ambos casos la intensidad de la tinción va disminuyendo hacia el cuerpo del callo. Es decir, existe un gradiente de expresión donde la mayor concentración de transcritos se localiza en las zonas de reciente proliferación y el gradiente disminuye hacia el interior del tejido y desaparece completamente en la zona basal (Figuras 4.3 - 4.5).

4.4 DISCUSION

La técnica de hibridación *in situ* de ARN:ARN ha sido utilizada en estudios de expresión genética en un gran número de especies destacando *Arabidopsis*, tabaco, *Antirrhinum majus* y arroz. En el caso de estudios de genes involucrados en el control del ciclo celular, algunos de los trabajos reportan la detección *in situ* de la expresión de *cdc2* en relación a la actividad meristemática y la proliferación celular durante el desarrollo en *Arabidopsis thaliana* y rábano (Martínez *et al.*, 1992). Estos trabajos fueron ampliados por Fobert *et al.*, (1994) quienes definieron patrones de división celular asociados a la regulación

transcripcional del ciclo celular en *Antirrhinum majus*. Posteriormente en esta misma especie, se analizó la expresión de cuatro genes relacionados al *cdc2* de *Saccharomyces pombe* (Fobert *et al.*, 1996). Los transcritos de estos genes fueron ubicados en inflorescencias jóvenes y se determinó que dos de ellos se encontraban en regiones con altas tasas de división, mientras que los del tipo *c* se les encontraba en células en fase S y durante la transición G2/M; los del tipo *d* resultaron ser específicas de las fases G2 y M. Otro caso de detección *in situ* de CDKs es el reportado por Umeda *et al.*, (1999) en arroz, donde se determinó el patrón de expresión de tres tipos de CDKs encontrando la expresión de dos de ellos en las regiones proliferativas del ápice de la raíz y también en células diferenciadas del esclerenquima, periciclo, y parénquima del cilindro central del mismo órgano. En el caso de cocotero, específicamente en meristemas se ha aplicado esta técnica para la detección *in situ* del transcrito del gen de la ciclina D3 (Sandoval, 2003). En el presente trabajo se utilizó el enfoque de hibridación *in situ* para determinar el patrón de acumulación de *CDKA* en relación a las zonas de proliferación celular del tejido embriogénico y el tejido que conforma el cuerpo del callo. Los resultados con la sonda antisentido muestran que en los tejidos correspondientes a callos embriogénicos de 90 días. La tinción se localizó en los bordes externos del callo, correspondiendo con el patrón de crecimiento periférico de las estructuras embriogénicas. (Figuras 4.3 - 4.5). Esto podría indicar que en las áreas de mayor tinción existe una proliferación celular activa y por lo tanto una alta competencia a la división y hacia las áreas teñidas con menor intensidad tal estado de

competencia ha disminuido. Como han reportado anteriormente Jesty y Francis (1992), en los callos el mayor porcentaje de las células se encuentran en fase G0-G1, por lo que la señal pudiera estar indicando el estado de competencia a la división, más que un proceso de división celular. La comparación de los resultados de expresión con diferentes tinciones convencionales en tejidos del mismo origen, muestra una correlación entre los puntos de crecimiento hacia el borde del callo y la señal producida por la detección de *CDKA*, donde se generan posteriormente los llamados nódulos meristemáticos. Estos resultados han sido corroborados mediante RT-PCR *in situ* en fase acuosa por Pérez-Núñez (2005) y por otros integrantes del grupo, en los que los patrones de tinción son semejantes a los obtenidos en este trabajo.

Muchos de los resultados mostraron que los controles negativos (sonda sentido) generaron una fuerte señal de fondo, lo que dificulta la interpretación de los datos. Los factores que pueden estar interviniendo en dar esta señal de fondo en la sonda sentido son varios: A) una incorrecta selección de las condiciones de astringencia que impidan eliminar el exceso de pegado inespecífico de la sonda (Schwarzacher y Harrison, 2000). B) el tipo de tejido que debido a que las células son pequeñas y con una pared celular gruesa pudiera estar interactuando con la sonda específica *CDKA*, dada su composición de nucleótidos, ya que con una sonda de *Arabidopsis thaliana* no se produjo ningún tipo de señal. Por esta razón pudiera darse la necesidad de utilizar estos protocolos de lavados con otros cortes de callos de diferentes etapas del desarrollo embriogénico e incluso con embriones en formación, así

como incrementar la temperatura de hibridación. Otro factor pudo haber sido que la hidrólisis de la sonda no fue la adecuada y por lo tanto el tamaño de la sonda fue muy grande, lo cual da mayor probabilidad de que la sonda interactúe con las estructuras de la célula. Actualmente se está trabajando en el desarrollo de una sonda de menor tamaño (300 b) a partir de la secuencia de 3' UTR, misma que por su menor tamaño y mayor especificidad, elimina la necesidad de la hidrólisis alcalina y la posibilidad de que la sonda de hibridación cruzada. Estos resultados son un parteaguas para la mayor optimización de condiciones de lavados, incubaciones y otros factores que puedan aportar mejores resultados para posteriores análisis de expresión *in situ*.

4.5 LITERATURA CITADA

Alcocer QG. 2004. Estandarización de la técnica de RT-PCR *in situ* para la detección de genes involucrados en el control de ciclo celular en cultivos *in vitro* de cocotero. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Azpeitia MA. 2003. Estudio de diferentes estrategias para promover la embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.) a partir de explantes de plúmula. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 129 pp.

Azpeitia A, Chan JL, Sáenz L, Oropeza C. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants

of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology. 78: 591-596.

Boucheron E, Guivarc'h A, Azmi A, Dewitte W, Onckelen H, Van Chriqui D. 2002. Competency of *Nicotiana tabacum* L. stem tissues to dedifferentiate is associated with differential levels of cell cycle gene expression and endogenous cytokinins. *Planta*. 215:267–278.

Burgeff C, Liljegren SJ, Tapia-López R, Yanofsky MF, Alvarez-Buylla ER. 2002. MADS-box gene expression in lateral primordia, meristems and differentiated tissues of *Arabidopsis thaliana* roots. *Planta*. 214:365-372.

Drew GN, Bowman JL, Meyerowitz EM. 1991. Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell*. 65:991-1002.

Fernando SC, Verdeil JL, Hocher V, Weerakoon LK, Hirimburegama K. 2003. Histological analysis of plant regeneration from plumule explants of *Cocos nucifera*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 72:281-284.

Ferrándiz C, Gu Q, Martienssen R, Yanofsky MF. 2000. Redundant regulation of meristem identity and plant architecture by

- FRUITFULL, APETALA1 and CAULIFLOWER. Development. 127:725-734.
- Fobert PR, Coen ES, Murphy GJP, Doonan JH. 1994. Patterns of cell division revealed by transcriptional regulation of genes during the cell cycle in plants. The Embo Journal. 13:616-624.
- Fobert PR, Gaudin V, Lunness P, Coen ES, Doonan JH. 1996. Distinct classes of *cdc2*-related genes are differentially expressed during the cell division cycle in plants. Plant Cell. 8:1465-1476.
- Gamboa A, Paez-Valencia J, Acevedo GF, Vazquez-Moreno L, Alvarez BER. 2001. Floral transcription factor AGAMOUS interacts in vitro with a Leucine-Rich repeat and an acid phosphatase protein complex. Biochemical and biophysical Research Communications. 288:1018-1026.
- Jesty JH, Francis D. 1992. Cellular responses of leaf explants of *Cocos nucifera* L. *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 28:235-244.
- Martínez MC, Jorgensen J-E, Lawton MA, Lamb CJ, Doerner PW. 1992. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. Proceedings of National Academy of Sciences of USA. 89:7360-7364.

- Patterson BK, Till M, Otto P, Goolsby C, Furtado MR, McBride LJ, Wolinsky SM. 1993. Detection of HIV-1 DNA and messenger RNA in individual cells by individual PCR-driven *in situ* hybridization and flow cytometry. *Science*. 260:976-979.
- Pérez-Núñez MT. 2005. Ciclo celular y embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.). Documento predoctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 100 pp.
- Sandoval A. 2003. Contribution a l'étude du cycle cellulaire au sein de tissus cocotier (*Cocos nucifera* L.) cultivés *in vitro* et recherche de marqueurs moléculaires de l'activité meristematique. These de Docteur. Ecole National Supérieur Agronomique de Montpellier.
- Schwarzacher T, Harrison HP. 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited. Editado por F. Kingston. Oxford, UK. 250 pp.
- Thomas C, Meyer D, Himber C, Steinmetz A. 2004. Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*. 42:35-42.

- Umeda M, Umedahara C, Yamaguchi M, Hashimoto J, Uchimiya H. 1999. Differential expression of genes for cyclin dependent protein kinases in rice plants. *Plant Physiology*. 119:31-40.
- Verdeil JL, Buffard Morel J. 1995. Somatic embryogenesis in coconut (*Cocos nucifera* L.). En: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 30. Springer-Verlag. Berlin Heidelberg, Alemania. pp 299-317.
- Welch PJ, Wang JYJ. 1992. Coordinated synthesis and degradation of cdc2 in the mammalian cell cycle. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 89:3093-3097.
- Yanofsky MF, Ma H, Bowman JL, Drews GN, Feldman KA, Meyerowitz EM. 1990. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*. 346:35-39.

V. DISCUSIÓN GENERAL

El cocotero es una especie de suma importancia en las zonas tropicales y subtropicales del mundo por ser fuente de materia prima para diversas industrias. Sin embargo, este cultivo está amenazado por diversas causas tanto biológicas como socioeconómicas, con un detrimento en la superficie plantada y en la producción. Por estas razones se necesita replantar las zonas afectadas con materiales más atractivos para los productores; sin embargo, la propagación por semilla es demasiado lenta para este propósito. Por esta razón se ha intentado establecer un protocolo de micropropagación del cocotero basado en la embriogénesis somática con plúmulas y estructuras embriogénicas o embriones globulares (Pérez-Núñez, 2005). Con este protocolo ha sido posible obtener embriones somáticos y regenerar plantas en forma reproducible (Chan *et al.*, 1998) y con una eficiencia mayor a la alcanzada con otros tipos de explantes, aunque no a una proporción que pudiera ser viable a mediana o gran escala. Con la finalidad de obtener una mayor eficiencia en la propagación *in vitro* de esta especie se han realizado estudios sobre diferentes aspectos que incluyen: la asimilación de nutrimentos en callos de cocotero (Dussert, *et al.*, 1995), el establecimiento de suspensiones celulares (Magnaval, 1995), estudios sobre condiciones de cultivo (Chan *et al.*, 1998), evaluación de los cambios en los niveles del 2,4-D en el medio de cultivo en presencia de carbón activado y la respuesta en el crecimiento en explantes de inflorescencias (Ebert y Taylor, 1990), adición de un precultivo con BRs

(Azpeitia *et al.*, 2003). Uno de los enfoques importantes para el estudio de la embriogénesis somática es la influencia de la reactivación del ciclo celular sobre este proceso. Esto se fundamenta por la existencia de un bloqueo del 99% de las células en la fase G0-G1 (Jesty y Francis, 1991). Por otra parte se ha demostrado que los BRs tienen efectos, entre otros, a nivel molecular en los procesos de reactivación del ciclo celular y también en diversos procesos morfogénicos (Sathiyamorthy y Nakamura, 1990; Ponsamuel *et al.*, 1996; 1998; Sasaki, 2002; Azpeitia *et al.*, 2003). Por esta razón se abordó el tema de la relación que pudiera existir entre los BRs, el ciclo celular y la embriogénesis somática.

A pesar de que se conoce la posible ruta de síntesis y degradación de los BRs, así como su injerencia en la activación de genes implicados en procesos fisiológicos como respuesta a estrés ambiental y desarrollo morfogénico durante la germinación, se desconoce como podrían estar actuando los BRs para promover una respuesta favorable en los procesos de organogénesis. Una hipótesis probable es que podría estar induciendo el ciclo celular, sin embargo, a pesar de que el efecto de los BRs sobre elongación celular está plenamente comprobado, aún existen dudas sobre su efecto en la estimulación del ciclo celular ya que se han reportado resultados contradictorios. Por ejemplo la aplicación de concentraciones nanomolares de BR a explantes cultivados *in vitro* de *Helianthus tuberosus* estimularon la división celular, ya que se encontró 50% de incremento en el número total de células en la presencia de auxinas y citocininas (Clouse y Zurek, 1991). En

protoplastos de repollo chino, el BR promovió la división celular dependiendo de la dosis (Nakajima *et al.*, 1996). Se han reportado también resultados similares para protoplastos de *Petunia* (Oh y Clause, 1998) y la línea BY-2 de células en suspensión de tabaco (Miyazawa *et al.*, 2003). Otros estudios realizados con cultivos celulares de zanahoria y con callos de tabaco transformados con *Agrobacterium*, que no necesitaron fitoreguladores para crecer, mostraron que los BRs no tenían un efecto estimulador de la división celular (Roth *et al.*, 1989; Sala y Sala, 1985).

En relación a los genes reguladores del ciclo celular existen tres reportes del efecto de BR sobre su expresión. Por ejemplo se encontró que el gen *CDC2b* (una cinasa relacionada con el control del ciclo celular) de *Arabidopsis thaliana*, fue inducido por el BR en oscuridad, sin embargo, se ha visto que este gen juega un papel importante en la elongación del cotiledón e hipocótilo y la formación de la curvatura apical en lugar del control del ciclo celular (Yoshizumi *et al.*, 1999). Por otro lado, Hu *et al.*, (2000) encontraron que el gen *CYCD3* que se expresa diferencialmente en tejidos de *Arabidopsis thaliana*, es inducible con la aplicación de BRs y que la estimulación de la expresión de este gen dependió de la dosis. A nivel morfogénico se encontró que el BR podía utilizarse en lugar de la zeatina para la formación de callo y crecimiento de las suspensiones celulares. Miyazawa *et al.*, (2003) utilizando como modelo la línea celular BY-2 de tabaco, encontraron que el gen de una ciclina mitótica y la histona H4 se incrementaron sólo por el efecto del BR en una fase temprana del cultivo, además se

encontró que el índice mitótico también se incrementó en un medio sin reguladores del crecimiento pero que contenía al BL.

Expresión relativa de *CDKA*

En el presente trabajo se estudió si el HBR tenía un efecto en la expresión del gen *CDKA* durante la fase I de la embriogénesis somática en cocotero. La expresión de este gen indica una predisponibilidad de las células a dividirse (Martínez *et al.*, 1992; Hemerly *et al.*, 1993). Los resultados mostraron que concentraciones de 0.1 μM de HBR tuvo un efecto estimulador de alrededor de siete veces la expresión del gen respecto al control en callos procedentes de plúmula (Figura 3.5). Por otra parte cuando se utilizaron explantes procedentes de estructuras embriogénicas globulares, se encontró que la concentración de 0.01 μM producía un efecto semejante al anterior en la expresión del gen (Figura 3.7). Hasta ahora no existía evidencia de que los BRs tuvieran un efecto sobre la expresión de la *CDKA*. Aunque en el trabajo realizado por Goda *et al.*, (2002) en el que mediante un análisis de microarreglo, se identificaron una serie de genes responsivos a BRs en *Arabidopsis thaliana*, muchos no fueron identificados por lo que cabe la posibilidad que *CDKA* pudiera ser uno de ellos.

En el segundo experimento, aunque no hubo diferencias estadísticas, si se observó un efecto en los promedios de formación de callo embriogénico, principalmente a la concentración de 0.01 μM de HBR; sin embargo, no se evaluó la formación de embriones somáticos debido a que la mayoría de los callos embriogénicos del experimento se

utilizaron para la extracción de ARN o la fijación del tejido para analizar mediante la técnica de hibridación *in situ*. Se procedió a realizar un tercer experimento con una línea de callo embriogénico utilizando las estructuras embriogénicas como fuente de explante. En este caso, si bien no hubo un efecto estadístico significativo en la formación de callo embriogénico, si lo hubo para la formación de embriones somáticos, aunque la concentración de HBR a la cual se logró este efecto (1 μM) fue diferente a la de 0.01 μM donde se logró el máximo de expresión de la *CDKA*, no obstante las concentraciones de 0.1 y 1.0 μM de HBR estimularon de 2-4 veces la expresión de la *CDKA* de cocotero.

Por otro lado, hubo una disminución de la expresión de la *CDKA* bajo las diferentes concentraciones de HBR en callo esponjoso o no embriogénico. Este tipo de callo suele formarse frecuentemente durante el cultivo *in vitro*, no presenta estructuras embriogénicas, sus células no se agrupan en centros meristemáticos como lo hacen los callos embriogénicos. Esto podría deberse a que este tipo de tejido a los 90 días, ha detenido su crecimiento y perdido su potencial de proliferación, encaminándose a un proceso de necrosamiento y fenolización.

Los datos obtenidos en la presente tesis muestran claramente que el HBR induce la expresión del gen *CDKA* en nuestro sistema. Si bien no hay una relación directa entre las concentraciones, la expresión del gen de la *CDKA*, la formación de callo embriogénico y la formación de embriones somáticos, es porque para lograr el proceso morfogénico no sólo se necesita estimular la división celular sino que esta estimulación

debe estar integrada al crecimiento y a la diferenciación. Un estudio posterior sería determinar el efecto del HBR en genes relacionados directamente con el proceso de embriogénesis, como es el caso de *SERK* u otros.

Expresión espacio-temporal de *CDKA*

La citogenética molecular y los métodos de hibridación *in situ* han revolucionado el entendimiento de la estructura, función, organización y evolución de los genes y el genoma. Estos métodos han establecido el vínculo entre los datos moleculares de la secuencia del ADN con la información cromosómica y de expresión en los tejidos a nivel celular y subcelular y han cambiado la forma de aplicar la genética tanto en la medicina o en la agricultura (Schwarzacher y Harrison, 2000), como se mencionó anteriormente.

El montaje de la técnica de hibridación *in situ* en callos de cocotero y embriones en desarrollo es una herramienta muy útil para el estudio de genes que se expresan durante la embriogénesis somática o para diferenciar estados específicos del ciclo celular indicados por genes marcadores de cada fase, así como definirlos o correlacionarlos con un estado de competencia para estos procesos. Es probable que esta técnica también pueda fortalecer su alcance cuando se le conjugue con tinciones específicas de ácidos nucleicos, como el DAPI y que ya han sido reportados en otros trabajos.

En este caso se trabajó en la estandarización de la hibridación *in situ* con el gen de la CDKA. Los cortes^hhistológicos hibridados con la secuencia antisentido mostraron señal positiva hacia los bordes (Figuras 4.3 - 4.5) aunque por otro lado los controles negativos (sonda sentido) también dieron señal de fondo lo que hace que nuestros resultados con la sonda positiva puedan argumentarse. Ambos resultados se obtuvieron con lavados a base de formamida al 50% y solución de SSC 2X. Con un lavado alternativo a base de SDS y tratamiento con ribonucleasas los resultados mostraron menor señal de fondo, sin embargo, las posibles zonas de expresión del gen *CDKA* no se encontraron bien definidas. Por otra parte, utilizando la técnica similar de RT-PCR *in situ* se obtuvieron resultados similares con los controles negativos (Alcocer, 2003) con lavados a base de SSC 2X. Esto aporta evidencias de que existen circunstancias implícitas del tejido y de los procesos de preparación de los tejidos que limitan los alcances de ambas metodologías. Otro factor que puede influir es la composición y el tamaño de la sonda, ya que al ser de mayor tamaño y haber necesidad por una hidrólisis aleatoria para obtener fragmentos de menor tamaño, esta reacción puede haber tenido fallas y una sonda grande puede pegarse inespecíficamente a muchos lugares de la estructura celular (Burgeff, com. pers.). La obtención de una sonda de menor tamaño (300 bases) permitiría una mayor especificidad y eliminaría la necesidad de la hidrólisis. Pérez-Núñez *et al.*, (2005) al utilizar RT-PCR *in situ* e hibridación *in situ* en fase acuosa, respectivamente, encontraron un patrón de expresión del gen localizado hacia los bordes de las estructuras embriogénicas, correspondiendo a

lo observado en el presente trabajo. Estos resultados aportan elementos para definir posibles áreas embriogénicas en niveles más avanzados de diferenciación.

El establecimiento adecuado de esta técnica nos permitirá conocer que tipo de células están acumulando a la *CDKA* y si existe un efecto del HBR para estimular la acumulación del transcrito en células que normalmente no lo hacían, como es el caso de las células del cuerpo del callo.

LITERATURA CITADA

Alcocer QG. 2004. Estandarización de la técnica de RT-PCR *in situ* para la detección de genes involucrados en el control de ciclo celular en cultivos *in vitro* de cocotero. Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán.

Azpeitia A, Chan JL, Sáenz L, Oropeza C. 2003. Effect of 22(S), 23(S)-homobrassinolide on somatic embryogenesis in plumule explants of *Cocos nucifera* (L.) cultured *in vitro*. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*. 78:591-596.

Chan JL, Sáenz L, Talavera C, Hornung R, Robert M Oropeza C. 1998. Regeneration of coconut (*Cocos nucifera* L.) from plumule explants through somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*. 17:515-521.

- Clouse SD, Zurek DM. 1991. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. En: Brassinosteroids chemistry, bioactivity, & applications. Editado por: Cutler HG, Yokota T, Adam G. American Chemical Society, Washington D.C. pp 122–140.
- Dussert S, Verdeil J-L, Rival A, Noirot M, Buffard–Morel J. 1995. Nutrient uptake and growth of *in vitro* coconut (*Cocos nucifera* L.) calluses. *Plant Science*. 106:185-193.
- Ebert A, Taylor HF. 1990. Assesment of the changes of 2,4-diclorophenoxyiacetic acid concentration in plant tissue culture media in the presence of activated charcoal. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 20:165-172.
- Goda H, Shimada Y, Asami T, Fujioka S, Yoshida S. 2002. Microarray analysis of brassinosteroid-regulated genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*.130:129-134.
- Hemerly AS, Ferreira P, Engler JA, Montagu MV, Engler M, Inzé D. 1993. *Cdc2a* expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *The Plant Cell*. 5:1711-1723.
- Hu Y, Bao F, Li J. 2000. Promotive effect of brassinosteroids on cell division involves a distinct CyCD3-induction pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 24:693-701.

- Jesty JH, Francis D. 1992. Cellular responses of leaf explants of *Cocos nucifera* L. *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 28:235-244.
- MagnaVal C. 1995. Etude des facteurs nutritifs intervenant lors de l'initiation de l'embryogenese somatique du cocotier (*Cocos nucifera* L.) en milieu gelose et mise au point des suspensions embryogenes. Ph. D. Diss. Universite P. Et M. Curie (Paris VI), Paris, France.
- Martínez MC, Jorgensen J-E, Lawton MA, Lamb CJ, Doerner PW. 1992. Spatial pattern of *cdc2* expression in relation to meristem activity and cell proliferation during plant development. *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*. 89:7360-7364.
- Miyazawa Y, Nakajima N, Abe T, Sakai A, Fujioka S, Kawano S, Kuroiwa T, Yoshida S. 2003. Activation of cell proliferation by brassinolide application in tobacco BY-2 cells: effects of brassinolide on cell multiplication, cell-cycle-related gene expression, and organellar DNA contents. *Journal of Experimental Botany*. 54:2669-2678.
- Nakajima N, Shida A, Toyama S. 1996. Effects of brassinosteroid on cell division and colony formation of Chinese cabbage mesophyll protoplasts. *Japanese Journal of Crop Science*. 65:114-118.

- Nakaya M, Tukaya H, Murakami N, Kato M. 2002. Brassinosteroids control the proliferation of leaf cells of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 43:239-244.
- Oh MH, Clouse SD 1998. Brassinolide affects the rate of cell division in isolated leaf protoplasts of *Petunia hybrida*. *Plant Cell Reports*. 17:921-924.
- Pérez-Núñez MT. 2005. Ciclo celular y embriogénesis somática en cocotero (*Cocos nucifera* L.). Documento predoctoral. Centro de Investigación Científica de Yucatán. 100 pp.
- Ponsamuel J, Samson NP, Geneshan PS, Sathyaprakash V, Abraham GC. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature cotyledonary tissues of cultivated tea (*Cammellia sinensis* L.). *Plant Cell Reports*. 4:210-214.
- Ponsamuel J, Huhman DV, Cassidy BG, Post-Beittenmiller D. 1998. *In vitro* regeneration via caulogenesis and brassin-induced shoot conversion of dormant buds from plumulas explants of peanut (*Arachys hypogea*). *Plant Cell Reports*. 17:373-378.
- Roth PS, Bach TJ, Thompson MJ. 1989. Brassinosteroids: potent inhibitors of growth of transformed tobacco callus cultures. *Plant Science*. 59:63-70.

- Sala C, Sala F. 1985. Effect of brassinosteroid on cell division and enlargement in cultured carrot (*Daucus carota* L.) cells. *Plant Cell Reports*. 4:144-147.
- Sathiyamorthy, Nakamura S. 1990. *In vitro* root induction by 24-epibrasinolide on hypocotyl segments of soybean (*Glicine max* L. Merr). *Plant Growth regulation*. 9:73-76.
- Sasaki H. 2002. Brassinolide promotes adventitious shoot regeneration from cauliflower hypocotyl segments. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 71:111-116.
- Schwarzacher T, Harrison HP. 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers Limited. Editado por Fran Kingston. Oxford, UK. 25 pp.
- Yoshizumi T, Nagata N, Shimada H, Matsui M. 1999. An *Arabidopsis* cell cycle-dependent kinase-related gene, *cdc2b*, plays a role in regulating seedling growth in darkness. *The Plant Cell*. 11:1883-1895.

VI. CONCLUSIONES GENERALES

1. Se encontró un efecto positivo del HBR, a la concentración de 1.0 μM , en la formación de embriones somáticos, en los callos embriogénicos originados de explantes de estructuras embriogénicas. Este incremento es semejante a lo anteriormente reportado por Azpeitia *et al.*, (2003).
2. Los datos obtenidos en la presente tesis muestran claramente que a los 90 días el HBR induce la expresión del gen *CDKA* en callos embriogénicos de plúmulas de cocotero cultivados *in vitro*.
3. Los callos no embriogénicos mostraron un decremento en la expresión de la *CDKA* aún con los tratamientos con HBR.
4. Se encontró un patrón regular de la expresión de *CDKA* en callos embriogénicos de cocotero, demostrando la existencia de un mecanismo de control de la proliferación durante la fase I de la embriogénesis somática.

VII. PERSPECTIVAS

Algunas perspectivas que resultan de este trabajo son las siguientes:

- Estudiar la expresión temporal cuantitativa de otros genes implicados en el ciclo celular con el tratamiento de HBR y que pudieran estar afectando de alguna forma el proceso de embriogénesis somática.
- Sintetizar una sonda de menor tamaño de *CDKA* de la región 3'UTR, así como realizar el estudio de la expresión espacio-temporal de otros genes del ciclo celular durante la etapa I, así como incluir la etapa II, de la embriogénesis somática en cocotero.
- Probar otras condiciones de lavados más astringentes que permitan disminuir la señal de fondo obtenida con el protocolo actual.
- Realizar estudios de expresión espacio-temporal con genes específicos de embriogénesis somática como *SERK* y *WUSCHEL*.

VIII. ANEXOS

8.1 PROCEDIMIENTOS PARA EL ANALISIS DE LA EXPRESION RELATIVA

8.1.1 *Extracción de ARN total*

El ARN total se obtuvo macerando de 200 a 300 mg de callos con nitrógeno líquido y adicionando, antes de descongelarse este macerado, 2 ml de Trizol. Se transfirió 1 ml de esta mezcla a un tubo Eppendorf y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo y se homogenizó la suspensión. Tras incubar otros 5 min a temperatura ambiente se centrifugó a 12 000 rpm por 15 min. Se transfirió la fase acuosa del sobrenadante a tubos nuevos y se precipitó con 500 µl de alcohol isopropílico a -20°C durante 90 min y luego 30 min a -80°C. Se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min y tras eliminar el sobrenadante se lavó la pastilla centrifugando a 7500 rpm con 1 ml de etanol libre de ribonucleasas al 75% durante 5 min. Se eliminó el sobrenadante, se dejó secar sobre papel estéril y finalmente se resuspendió en 50 µl de agua tratada con DEPC.

8.1.2 *Tratamiento con Desoxiribonucleasa I*

El ARN total extraído se sometió a un tratamiento con desoxiribonucleasa I (ADNasa I) (2 U/µl; Ambion, USA) de la siguiente forma: se preparó la mezcla de reacción que incluye 0.1 volúmenes de

solución amortiguadora y 2 μ l de ADNasa I para cada tubo con 50 μ l de ARN total. Las mezclas se incubaron a 37°C durante 1h. La enzima se inactivó adicionando 0.1 volumen de solución inactivadora, e incubando por 2 min a temperatura ambiente y posteriormente se precipitó la enzima centrifugando a 10 000 rpm durante 1 min. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos etiquetados.

8.1.3 Cuantificación espectrofotométrica

Se cuantificó la cantidad de ARN presente en cada una de las muestras a través de la lectura de su absorbancia mediante un espectrofotómetro de luz ultravioleta (Beckman DU-65), leyendo a 260 nm y posteriormente obteniendo la lectura a 280 nm para determinar la calidad del ARN obtenido. Las concentraciones se calcularon multiplicando por un factor de 40 las lecturas obtenidas de diluciones 1:1000. El ARN se mantuvo a -80°C para su conservación.

8.1.4 Obtención de ADNc

El ADNc se obtuvo siguiendo el protocolo de la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen, USA). En un tubo de reacción que contenía 2 μ g de ARN total y agua hasta un volumen total de 11 μ l se adicionaron 1 μ l de oligonucleótidos (10 μ M, ya sea de poli-T ó hexámeros azarosos), y 1 μ l de una mezcla de dNTP's 10 mM; tras mezclarlos homogéneamente se dio un precalentamiento a 70°C por 10 min. Posteriormente se adicionó 4 μ l de amortiguador 5x, 2 μ l de DTT 0.1M y

1 μl de inhibidor de ribonucleasas RNAsin (Ambion, USA). La mezcla se incubó a 37°C durante 2 min y se agregó 1 μl (200 U μl^{-1}) de enzima Transcriptasa Reversa (Superscript II; Invitrogen, USA), para un volumen total de 21 μl . Se incubó a 37°C durante 60 min. Finalmente se desactivó la enzima calentando la mezcla a 70°C durante 15 min. Se realizó una prueba de amplificación por PCR con los iniciadores para *CDKA* para comprobar la obtención del ADNc. El ADNc se mantuvo a -20°C en un congelador.

8.2 PROCEDIMIENTOS PARA EL ANALISIS DE LA EXPRESION ESPACIO TEMPORAL

8.2.1 Preparación de las muestras

Fijación. Los callos seleccionados fueron fijados en paraformaldehído 4% disuelto en amortiguador de fosfatos (PBS) a pH ajustado a 7.2. La fijación se realizó durante 24 h, aplicando presión negativa hasta 30 psi. Después de la fijación los callos fueron deshidratados progresivamente sometiéndolos a series de etanol (30, 50, 70, 96 y 100%) durante una hora cada uno, en refrigeración. El siguiente paso fue sustituir el etanol con un solvente de parafina siguiendo una serie progresiva de etanol: Histochoice (SIGMA, USA) hasta llegar al 100%. Cada cambio se dio por una hora a temperatura ambiente y con agitación.

Inclusión en parafina. A los tejidos inmersos en Histochoice se les agregaron hojuelas de parafina y se incubaron a temperatura ambiente

con agitación durante toda la noche. Al día siguiente se aumentó gradualmente la cantidad de hojuelas de parafina hasta el medio día; y luego se inició la incubación a 58°C. Se siguió incorporando las hojuelas hasta tener una relación 1:1 con respecto al Histochoice (SIGMA, USA). En este momento se realizó el primer cambio de parafina y a partir de entonces se realizaron tres cambios de ésta durante la jornada de trabajo. Estos cambios se realizaron hasta que se eliminó completamente el solvente con la parafina. Por último los callos se montaron en bloques para cortarlos al microtomo.

Corte de los bloques y montaje de las secciones. Los callos montados en los bloques de parafina, se cortaron en un microtomo MICROM HM 325 a un espesor de 10-14 µm; posteriormente se adhirieron a portaobjetos cubiertos con polilisina (Polyprep; SIGMA, USA) manteniéndolos en una estufa a 42°C durante 24 horas.

8.2.2 Síntesis de la ribosonidas marcadas con digoxigenina

Linearización del plásmido que contiene CDKA. Para la obtención de las sondas se utilizaron las enzimas EcoRI y XhoI para la linearización del plásmido que contiene al gen *CDKA*, según las siguientes condiciones:

Se incubaron por 5 horas a 37°C, las dos mezclas de reacción que contenían los siguientes componentes:

1 µg del plásmido
2 µl del amortiguador 10x correspondiente a cada enzima
1 µl de enzima (ya sea para EcoRI [$15 \text{ U}\mu\text{l}^{-1}$] o para XhoI [$40 \text{ U}\mu\text{l}^{-1}$])
x µl de agua para un volumen final de 20 µl.

Posteriormente se precipitó con 0.1 volúmenes de acetato de sodio 3M y 2.5 volúmenes de etanol absoluto, se incubó durante 30 min a -20°C y se centrifugó a 12500 rpm por 15 min. La pastilla se lavó con cuatro volúmenes de etanol al 70% centrifugando a 12500 rpm por 10 min. Los tubos se secaron durante 5 min sobre papel estéril y la pastilla se resuspendió en 6 µl de agua estéril. Se comprobó la linearización de los plásmidos mediante un gel de agarosa al 1% (Figura 4.2).

Síntesis de la ribosonda. En condiciones libres de ARNasas se procedió a sintetizar la ribosonda a través de la transcripción *in vitro* del gen insertado en el plásmido. En esta transcripción se generan dos sondas, una antisentido cuya secuencia es complementaria al transcrito correspondiente al gen de interés, el cual está presente en los tejidos por lo que lo hibridiza y otra sonda sentido que por tener la misma secuencia del transcrito presente en el tejido, no hibridiza con éste. Dependiendo de la orientación del gen en el plásmido respecto a los sitios de inicio de la transcripción del plásmido (T3 y T7), se tendrá cada una de las sondas (Figura 4.1). Respecto a pCDKA, para la transcripción de la secuencia antisentido se utilizó a la polimerasa T7 y para la sonda con secuencia sentido se utilizó a la polimerasa T3. Estos sitios de origen corresponden con las linearizaciones realizadas

previamente con las enzimas EcoRI y XhoI, respectivamente. El procedimiento de síntesis consiste en incubar los componentes de reacción en un tubo a 37°C durante 90 min. Dichos componentes son los siguientes:

Componente	AS/CDKA/EcoRI/T7	S/CDKA/XhoI/T3
Amortiguador de transcripción	2 μ l	2 μ l
Mezcla de marcaje UTP-Dig	2 μ l	2 μ l
Inhibidor de ARNasas (RNAsin; Ambion)	1 μ l	1 μ l
Plásmido CDKA (EcoRI)	--	4 μ l
Plásmido CDKA (XhoI)	2 μ l	--
Polimerasa T7	--	2 μ l
Polimerasa T3	9 μ l	9 μ l
Agua-DEPC	20 μ l	20 μ l
Volumen total		

Después de la transcripción se eliminó el ADN plasmídico con 1 μ l de ADNasa I; la mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Transcurrida la digestión se tomó una alícuota (1 μ l) y se diluyó en 4 μ l de agua-DEPC.

Una vez comprobada la transcripción de las sondas, se aforó con 24 μ l de agua-DEPC, y se agregó 1 μ l de ARNt (10 μ g μ l⁻¹) a cada tubo que las contenía; después se procedió a su purificación al precipitar con 220 μ l de etanol 100%, asistida con 37.5 μ l de acetato de amonio 5M. Las sondas se incubaron a -20°C por 1 h. Posteriormente se verificó la

obtención de productos en un gel de agarosa al 1% (Figura 4.2). Los productos obtenidos se centrifugaron a 12500 rpm. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 250 µl de etanol al 80% libre de ARNasas y se dejó secar la pastilla por 5 min.

Hidrólisis de la sonda. Debido a que la secuencia del gen es muy grande (1.33 kb), y se requiere un tamaño promedio de fragmentos de 300 pb es necesario realizar una hidrólisis alcalina del transcrito obtenido *in vitro*. Las sondas se resuspendieron, cada una, en 50 µl de la mezcla de 30 µl de Na₂CO₃ 100 mM y 20 µl de NaHCO₃ 100 mM (pH 10.2). Enseguida se incubaron a 60°C durante 23 min y 28 seg. Este tiempo fue calculado con la siguiente fórmula:

$$t = (L_o - L_f) / 0.1 * L_o * L_f$$

donde:

t : tiempo de incubación

L_o: longitud inicial del gen en kilobases

L_f: longitud final de los fragmentos en kilobases

Por lo que sustituyendo los valores, resulta:

t : ?

L_o: 1.33 kb $t = (1.33 - 0.3) / 0.1 * 1.33 * 0.30$ t = 23 ' 28''

L_f: 0.30 kb

Esta mezcla se precipitó con 5 μl de ácido acético 5%, 5 μl de acetato de sodio 3M, 1 μl de ARNt (10 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) y 125 μl de etanol 100%. Las mezclas se incubaron a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron 15 min a 12500 rpm. La pastilla se lavó con 250 μl de etanol por 15 min a 12 500 rpm; se dejó secar 5 min y se resuspendió en 20 μl de agua-DEPC. De estas suspensiones se tomaron alícuotas de 1 μl para la cuantificación y los restantes 19 μl se diluyeron en 80 μl de amortiguador de hibridación. Este amortiguador consiste de SSC 6X, SDS 3%, formamida al 50% y ARNt (10 $\mu\text{g } \text{ml}^{-1}$).

Cuantificación de la sonda. Para definir la dilución de la sonda para los ensayos de hibridación *in situ*, primero se determinó la concentración de cada sonda a través de un dot blot. Para esto se tomó una alícuota de 1 μl de la suspensión de las sondas y se hicieron diluciones sucesivas 1:10, 1:100 y 1:500. Se transfirió 1 μl de cada dilución a la membrana y se fijaron en la membrana mediante luz UV utilizando para este fin un fijador de luz UV (Stratalinker). Posteriormente, se incubó la membrana y una tira de control con concentraciones conocidas de sonda en el agente bloqueador al 0.05% disuelto en TBS pH 7.5 durante 15 min; después, el control y la membrana se incubaron en el anticuerpo (dilución 1:5000 en TBS pH 7.5) durante 30 min. Enseguida se lavaron en TBS pH 7.5 por 5 min. Finalmente se revelaron en solución de NBT/BCIP (1 tableta/10 ml de agua) hasta ver el punto con la mayor dilución. La reacción se detuvo con agua corriente. La concentración de trabajo teórica corresponde al punto intermedio entre los dos puntos

más bajos de la tira control. La concentración utilizada para la hibridación es de 30 pg μl^{-1} para ambas sondas.

8.2.3 Protocolo de hibridación *in situ*

Se utilizó un protocolo de hibridación *in situ* comúnmente utilizado para cortes histológicos de *Arabidopsis thaliana* (Burgeff *et al.*, 2002; Ferrándiz *et al.*, 2000) inicia con dos incubaciones en Histochoice por 15 min cada uno, para eliminar toda la parafina impregnada en los tejidos. Enseguida las secciones se rehidrataron en series decrecientes de etanol, iniciando con etanol 100%, hasta llegar a agua-DEPC. Las secciones se permeabilizaron en HCl 0.2M por 20 min y posteriormente con proteinasa K a una concentración de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ durante 30 min. La reacción se detuvo con solución de glicina (2 mg ml^{-1}) en amortiguador de fosfatos por 2 min. Las secciones se fijaron nuevamente por algunos segundos en formaldehído 4%; luego se enjuagaron en amortiguador de fosfatos y se deshidrataron con soluciones crecientes de etanol. Finalmente se dejaron secar en una caja humedecida con etanol 100%.

A cada portaobjeto se le adicionaron 85 μl de la dilución correspondiente a cada sonda. Los portaobjetos se cubrieron con cubreobjetos Coverslip (Sigma, USA) y se colocaron en una caja húmeda cerrada herméticamente. Las condiciones de hibridación fueron de 50 o 52° C, durante toda la noche.

8.2.4 Lavados

En el segundo día, se eliminaron los cubreobjetos en una solución de lavado (formamida 50% y SSC 2X). Las secciones se incubaron dos veces en la misma solución a 50°C por 1 h cada vez. El primer lavado realizado fue con solución de SSC 0.4X a la misma temperatura por 30 min. Alternativamente a este protocolo se utilizó uno que prescinde de la utilización de formamida y en cambio se utiliza una mezcla de SDS 0.1% y SSC 0.1% durante 30 min en dos ocasiones a temperatura de hibridación. Posteriormente se incluyó un tratamiento con RNasa A (10 $\mu\text{g ml}^{-1}$) y dos lavados nuevamente con SSC 2X. Se hizo un lavado con TBS por 5 min a temperatura ambiente y después se incubaron las secciones en solución de bloqueo (Roche, Alemania) durante 1 h. Inmediatamente se lavaron en solución de BSA 1%, Triton X-100 al 0.3% disueltos en TBS por 30 min. Enseguida se incubó con el anticuerpo Anti-DIG acoplado a una fosfatasa alcalina, diluido 1:3000 en la solución TBS durante 90 min. Las secciones se lavaron en la misma solución otras tres veces, 20 min cada vez.

8.2.5 Detección

Las secciones se lavaron en amortiguador de detección (Tris-HCl pH 9.5 100 mM; NaCl 100 mM y MgCl_2 50 mM) por 10 min y finalmente se incubaron toda la noche en NBT/BCIP, en una caja cerrada y protegida contra la luz. Las reacciones se detuvieron a las 24 y 48 hrs, sumergiendo las secciones en agua por 10 min, luego en etanol 100% y nuevamente en agua. Por último se dejaron secar y se montaron en

resina Permount. Una vez seca la resina, se procedió a observar los resultados y a la captura de las imágenes con un microscopio Axioplan (Zeiss, Alemania). Las imágenes obtenidas se editaron con el programa Corel Draw v10.