

Posgrado en Ciencias y Biotecnología de Plantas

**Aspectos bioquímicos y moleculares en el inicio de la
embriogénesis somática en *Coffea canephora***

**Tesis que presenta para obtener el grado de Maestro en
Ciencias**

Hernán de Jesús Villanueva Alonzo

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN

Mérida, Yucatán, México

2006

Reconocimientos

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

Este trabajo fue financiado por la International Foundation for Science (IFS C/3345-1) y una beca de Maestría del CONACyT (núm. 12345) para Hernán de Jesús Villanueva Alonzo.

Agradecimientos

Le agradezco a mi madre y padre por todo el amor y la confianza que me dan.

A mi esposa Coralía por estar siempre conmigo, en las buenas y en las malas.

Le doy gracias a todos mis amigos del CICY, en especial a Gabriel, Juan Colli, Fito, Miguel, Ivan, Yummy, Efraín, Mildred, Elide, Ramón, Eunice y Goretty.

Al Dr. José Juan Zuñiga, por permitirme formar parte de su grupo de investigación.

Agradezco a mi comité tutorial por su tiempo empleado a mi trabajo de tesis.

Lista de abreviaturas

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
AGP	Arabinogalactoproteína
BA	6-benciladenina
DIC	Días de incubación
DTT	1,4 ditioneitol
EDTA	Sal disódica del ácido etilendiaminotetra acético
EMBL	Laboratorio de biología molecular europeo
ES	Embriogénesis somática
EP	Proteína extracelular
IPTG	Isopropil 3-D-tiogalactosa
Kbp	Kilopares de bases
KDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo "Luria Broth"
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SERK	Receptor tipo cinasa de embriogénesis somática
TA	Temperatura ambiente

PMSF Fenil-metil-sulfonil-fluoruro

UV Ultravioleta

X-GAL.- 5-bromo-4-cloro-3-indolil-D-Galactosa

Contenido

	Página
Reconocimientos	i
Agradecimientos	ii
Lista de abreviaturas	iii
Contenido	v
Índice de figuras	x
Resumen	xiii
Abstract	xv
Introducción	1
CAPÍTULO 1	
Antecedentes	3
1.1 La embriogénesis somática	3
1.2 La embriogénesis somática en cafeto	5
1.3 Aspectos moleculares de la embriogénesis somática	6
1.3.1 Genes involucrados en el establecimiento y el desarrollo de la embriogénesis somática	6
1.3.2 Receptor tipo Cinasa relacionada con la embriogénesis somática (SERK)	9

1.4 Aspectos bioquímicos de la embriogénesis somática	12
1.4.1 Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) en la embriogénesis somática	12
1.5 Hipótesis	16
1.6 Objetivo general	16
1.7 Objetivos específicos	16
Bibliografía	18

CAPÍTULO 2

Clonación de sondas moleculares para el estudio de los genes de SERK y de MAPK durante la embriogénesis somática de <i>Coffea canephora</i>	33
2.1 Introducción	35
2.2 Materiales y Métodos	35
2.2.1 Material biológico	35
2.2.2 Inducción de la embriogenesis directa	35
2.2.3 Aislamiento de RNA	35
2.2.4 Amplificación de secuencias de MAPK y SERK por RT-PCR	37
2.2.5 Ligación de los productos de RT-PCR al plasmido vector	38

2.2.6 Protocolo para la clonación de productos de PCR en el vector pGEM-T-Easy®	39
2.2.7 Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico	40
2.2.8 Purificación del ADN plasmídico	40
2.2.9 Análisis de las clonas recombinantes	41
2.3 Resultados	43
2.3.1 Clonación de secuencias de ADNc amplificados con cebadores de MAPK	43
2.3.2 Amplificación de los ADNc clonados	45
2.3.3 Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona M1 en la bases de datos EMBL	51
2.3.4 Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona M3 en la base de datos EMBL	51
2.3.5 Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona M4 en la base de datos EMBL	52
2.3.6 Comparación de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona M6 en la base de datos EMBL	52
2.3.7 Clonación de secuencias de ADNc de SERK	54
2.3.8 Comparación de la secuencia deducida de	58

aminoácidos de la clona de *Coffea canephora* SERK
en la bases de datos EMBL

2.4 Discusión 59

Bibliografía 61

CAPÍTULO 3

Análisis de la expresión de los genes de SERK y de
MAPKs y los niveles de activación de las MAPKs
durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora* 65

3.1 Introducción 65

3.2 Materiales y Métodos 67

3.2.1 Extracción de proteínas 68

3.2.2 Detección de actividades de MAPKs en
extractos de explantes inducidos a la embriogénesis
somática 68

3.3 Resultados 69

3.3.1 Aparición de estructuras embriogénicas en
diferentes etapas de la embriogénesis somática de *C.*
canephora 69

3.3.2 Análisis de la expresión de los genes de SERK
en diferentes estadios de la embriogénesis somática
de *C. canephora* 70

3.3.3 Análisis de la expresión de los genes de MAPK 71

**en diferentes estadios de la embriogénesis somática
de *C. canephora***

**3.3.4 Inmunodetección de MAPK bifosforiladas
(activas) 73**

3.4 Discusión 75

Bibliografía 79

CAPÍTULO 4

Discusión general 85

Bibliografía 90

CAPÍTULO 5

Perspectivas 93

Índice de figuras

Figura 1.1	Comparación de estructuras embriogénicas entre los diferentes estadios de la embriogénesis somática y cigótica	5
Figura 1.2	Expresión de SERK en células con capacidad embriogénica. Ver texto para la descripción	10
Figura 1.3	Esquema que ilustra los componentes de la vía de transducción de señales mediadas por el módulo de MAPK	15
Figura 2.1	Productos de RT-PCR	44
Figura 2.2	Plásmidos extraídos de <i>E. coli</i> por lisis alcalina	45
Figura 2.3	Amplificación por PCR de los insertos en las clonas recombinantes 2- 8	46
Figura 2.4	Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M1 (fue la misma que la clona M2)	47
Figura 2.5	Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M3 (fue la misma que la clona M7)	48
Figura 2.6	Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M6	49

Figura 2.7	Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M4	50
Figura 2.8	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cuatro MAPK de <i>C. canephora</i> aisladas en este trabajo, con MAPKs de otras plantas	53
Figura 2.9	Amplificación por RT-PCR de secuencias nucleotídicas del gen SERK de <i>C. canephora</i>	55
Figura 2.10	Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona que codifica una secuencia de SERK de <i>Coffea canephora</i>	56
Figura 2.11	Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CcSERK de <i>C. canephora</i> con cuatro secuencias de SERK de otras plantas con las que tienen mayor nivel de identidad	58
Figura 3.1	Proceso de embriogénesis somática en <i>C. canephora</i>	70
Figura 3.2	Productos de RT-PCR, empleando ARN total extraído de explantes con diferentes días de inducción	72
Figura 3.3	Inmunodetección de MAPK activadas en diferentes estadios de la ES de <i>C. canephora</i>	74

Resumen

La embriogénesis somática (ES) es el proceso mediante el cual las células somáticas se desarrollan para producir un embrión, cuyo origen puede ser unicelular o pluricelular. Los primeros estadios de desarrollo de los embriones somáticos (globular, acorazonado y cotiledonario) tienen patrones fisiológicos similares a los estadios cigóticos. Así, la ES constituye una importante herramienta experimental para el estudio del proceso embriogénico, que además tiene la ventaja de no contar con barreras naturales como el endospermo.

El presente trabajo tuvo como objetivo principal el determinar si existen cambios en los niveles de activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos durante el inicio y el desarrollo de la embriogénesis somática de *Coffea canephora*, a partir de explantes de hoja. Se clonó y monitoreó la expresión del gen SERK, el cual codifica una cinasa tipo receptor específica del proceso embriogénico y que ha sido aceptada como el marcador molecular más preciso del inicio de la embriogénesis somática. Mediante el monitoreo de los niveles de transcrito de SERK de *C. canephora* se determinó que la transición embriogénica debe ocurrir alrededor de los 5 días en cultivo.

Nosotros determinamos, mediante inmunoblot, la presencia de varias bandas de MAPK activadas de diferentes intensidades; de especial interés fue una banda de ~48 kDa, la cual presentó un nivel basal al inicio del experimento, pero que para el día 5 ya tenía un nivel considerablemente alto. Este nivel de activación tuvo un máximo entre

los 5 y los 10 DIC, retornando a los niveles basales entre los días 20 y 25 de cultivo, manteniéndose así al menos hasta el día 30.

Los resultados anteriores demuestran que efectivamente las MAPK presentan una activación diferencial a lo largo del proceso embriogénico de *C. canephora*, en etapas coincidentes con el establecimiento del inicio molecular del proceso. Lo anterior sugiere que estas enzimas podrían ser consideradas como excelentes candidatos para participar en la regulación del proceso.

Abstract

Somatic embryogenesis (SE) is the process by which somatic cells develop to produce an embryo, whose origin could be both unicellular and multicellular. The first developmental stages of the somatic embryos (globular, heart-shaped embryo and cotyledons), have some physiological similarities to the correspondent cigotic stages. Therefore, SE becomes an important experimental tool to study the embriogenyc process. Besides, it has the advantage, of lacking natural barriers such as endosperm.

The objective of this project was to determine if there exist changes in the activation levels of MAPK during the different phases of the in *C. canephora* somatic embryogenesis in leaf explants.

We cloned and monitored the expression of the SERK gene, which codifier a receptor-like kinase (RLK) that has been widely accepted as the most precise molecular marker for the start of somatic embryogenesis.

Monitoring of the *C. canephora* SERK transcript levels determined that somatic transition occurred by 5 DIC. We then determined, using anti active MAPK-specific antibodies, the presence of several bands that react with the antibody; special attention was paid to a prominent ~48 kDa band, which was present in the leaf explants at the beginning of the treatment. This band showed a noticeable increment by 5 DIC and a maximum between 5 and 10 DIC, returning to basal levels by 20-25 DIC. The basal activation level remained until 30 DIC.

The above results proved that MAPK show a differential activation through out the different stages of the *C. canephora* SE process, having a maximum activation in the SE phases where the molecular switch to differentiation seemed to be turned on. These results suggest that this kind of enzymes might be considered as robust candidates to participate in the regulation of SE process.

Introducción

Los cultivos de café son de importancia económica para México, como quinto productor mundial. Entre las dos especies más cultivadas, *Coffea canephora* es el cultivo de más importancia económica, solamente después de *Coffea arabica*.

El principal inconveniente para el mejoramiento del cultivo de cafeto por métodos tradicionales está dado por el largo ciclo de vida lo que esto significa muchos años de trabajo para crear nuevos cultivares con características especiales, o para la conservación de materiales con rasgos genéticos de interés para la agricultura. Por ello, el desarrollo de técnicas de propagación masiva para la multiplicación de materiales vegetales mejorados constituye una buena alternativa para su aplicación en especies para las cuales la propagación tradicional es muy difícil. Dentro de las técnicas de propagación masiva, el cultivo de tejidos vegetales en general, y la embriogénesis somática en particular, constituyen excelentes opciones para la micropropagación de materiales elite bajo condiciones fitosanitarias apropiadas. La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones similares en muchos aspectos a los embriones cigóticos, con la diferencia de que provienen de células somáticas. Este proceso tiene amplias perspectivas biotecnológicas, ya que algunas células poseen la capacidad latente para dar origen a una planta completa a partir de un pequeño fragmento de tejido. Sin embargo, el mejoramiento de este proceso en el laboratorio se ha basado tradicionalmente en el conocimiento empírico, pues se desconocen los mecanismos celulares

que regulan la diferenciación mediante la cual una célula somática se convierte en una célula embriogénica. Por ello, se hace necesario generar un conocimiento mejor y más amplio de los eventos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que gobiernan este proceso con el fin de mejorarlo. A este respecto, los estudios en el ámbito internacional se han centrado en el entendimiento de los eventos de señalización y de transducción de señales que disparan el inicio del proceso. A pesar de que se ha determinado la existencia de diversos marcadores moleculares del inicio de la embriogénesis somática, se desconocen los mecanismos de transducción de señales que se activan tras la percepción de las señales embriogénicas.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo como objetivo principal el determinar si existen cambios en los niveles de activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) durante el inicio y el desarrollo de la embriogénesis somática de *C. canephora*, a partir de explantes de hoja. Aunque las MAPK constituyen una vía de transducción de señales involucradas en la percepción de una amplia variedad de señales extracelulares, incluyendo señales mitogénicas y de diferenciación, no se conoce cuál es su participación en el proceso embriogénico. Debido a que en el modelo de embriogénesis que empleamos no se sabía cuándo ocurre la transición entre el estado vegetativo y el estado embrionario en las células competentes, decidimos clonar y monitorear la expresión del gen SERK, el cual codifica una cinasa tipo receptor específica del proceso embriogénico y que ha sido aceptada como el marcador molecular más preciso del inicio de la embriogénesis somática.

CAPÍTULO 1

Antecedentes

1.1 LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática (ES) es el proceso mediante el cual las células somáticas se desarrollan para producir un embrión completo a partir de células somáticas, cuyo origen puede ser unicelular (Schmidt *et al.*, 1997), o multicelular (Taylor & Vasil 1996), las cuales logran la bipolaridad desde etapas tempranas como sucede en la embriogénesis cigótica, pero sin la fusión de gametos (Sharp *et al.*, 1980; Williams & Maheswaran, 1986). En la naturaleza se ha observado la formación espontánea de embriones somáticos en el borde de las hojas de plantas de los géneros como *Kalanchoe* (Pretova & Obert, 2003) y *Ranunculus* (Konar *et al.*, 1972). El desarrollo de la ES *in vitro* fue demostrado simultáneamente por tres grupos (Reiner, 1958, Steward *et al.*; 1958, Krikorian & Simola, 1999). En general hay dos vías para la obtención de embriones somáticos *in vitro*, una vía es de forma directa, la cual implica una baja desorganización del explante antes de formar los embriones somáticos y es inducida en parte por una herida; la otra vía es la indirecta, la cual implica el paso por un estadio de proliferación celular intermediario sin organizar (callo) antes de formar el embrión somático (Sharp *et al.*, 1980). Algunos de los principios para la inducción de la ES se conocen; generalmente se requiere de la adición de alguna auxina para la inducción del proceso, posteriormente se elimina o se disminuye

la concentración de la auxina para permitir la maduración del embrión (Dudits *et al.*, 1991). Se sabe que hay varios factores que influyen en la inducción de la ES, como son la adición de fitorreguladores, tipo de explante y el estadio de desarrollo de la planta, requerimientos nutricionales y el genotipo (Ammirato, 1983; Rose *et al.*, 1999). La relación entre los diferentes tipos de extremos ambientales y la ES aún no se entiende, no obstante, se ha sugerido que bajo condiciones de estrés, se inhibe la proliferación celular normal de las células desdiferenciadas y como consecuencia, se estimula la producción de embriones somáticos (Lee *et al.*, 2001).

Ya que los primeros estadios de desarrollo de los embriones somáticos (globular, acorazonado y cotiledonario) tienen patrones fisiológicos similares a los estadios cigóticos como puede apreciarse en la figura 1.1, es muy probable que en los ámbitos molecular y bioquímico ocurran los mismos eventos. Así, la ES constituye una importante herramienta experimental para el estudio del proceso embriogénico, que además tiene las ventajas de no contar con barreras naturales como el endospermo, además de poder disponer de líneas genéticamente homogéneas y poder ser inducida bajo condiciones controladas (Dodeman *et al.*, 1997).

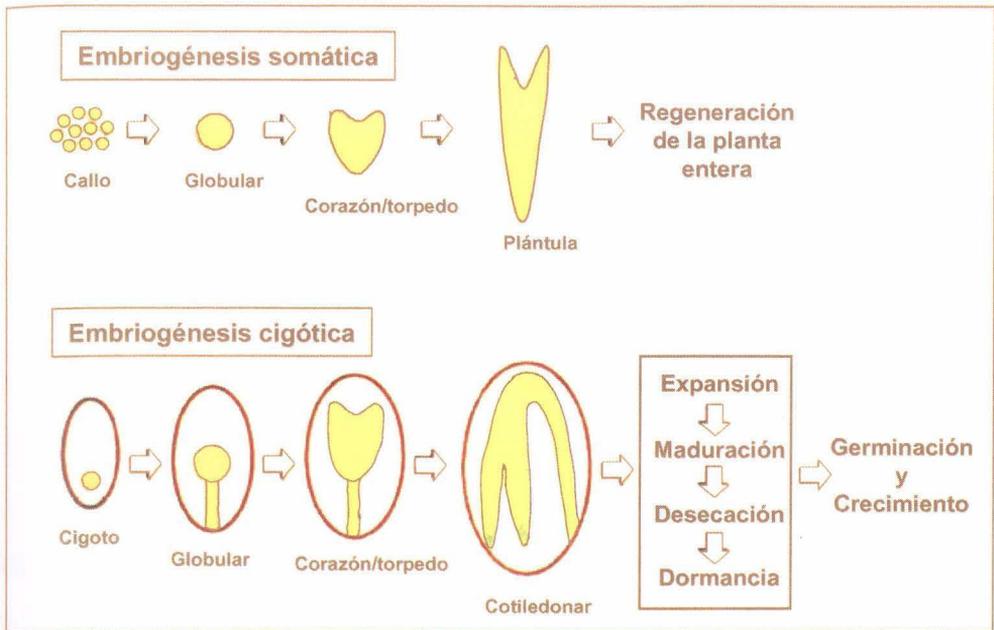


Figura 1.1 Comparación de estructuras embriogénicas entre los diferentes estadios de la embriogénesis somática y cigótica (Traducido de Zimmerman, 1993).

1.2 LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN CAFETO

Staritsky (1970) fue el primero en reportar el desarrollo de embriones somáticos en *Coffea canephora* (cv Pierre) a partir de ramas ortotrópicas. Posteriormente Söndahl & Sharp (1977) describieron un procedimiento para obtener un callos con alta frecuencia embriogénica a partir de explantes foliares de *C. arabica* (cv Bourbon). Söndahl *et al.* (1979) demostraron que los embriones somáticos en café se originan de las células del mesófilo. Posteriormente, se han realizado diversos trabajos acerca de la inducción de embriones somáticos en cafeto (Dublín, 1981; Pierson, 1983; Yasuda, 1985; Hatanaka *et al.*, 1991;

Neuenschwander & Baumann, 1992; Bieysse *et al.*, 1993; Menéndez y Nieto, 1994; Menéndez & García, 1997). Quiroz Figueroa *et al.* (2002) reportaron un estudio histológico sobre el desarrollo de la ES tanto directa como indirecta en *C. arabica*, en el cual a la primera semana se pudo caracterizar una célula relativamente isodiamétrica con un prominente núcleo, un citoplasma denso, una gruesa pared celular y con signos de polaridad, lo cual les permitió concluir que el origen de la ES en *C. arabica* es unicelular.

1.3 ASPECTOS MOLECULARES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

1.3.1 GENES INVOLUCRADOS EN EL ESTABLECIMIENTO Y EL DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En los años 80 se reportó por primera vez, en *Daucus carota*, que algunas proteínas excretadas al medio de cultivo por cultivos altamente embriogénicos podían promover la embriogénesis somática (Sengupta *et al.*, 1980). Se observó que los cultivos embriogénicos secretaban algunas proteínas específicas que modificaban la diferenciación de embriones y que podían ser utilizadas para caracterizar su potencial embriogénico (De Vries *et al.*, 1988a, 1988b). Debido a esto, el efecto de un medio condicionado sobre la embriogénesis somática ha recibido mucha atención. En suspensiones celulares de *D. carota*, *Cucumis sativus*, *Vitis vinifera* y *Hordeum vulgare* se ha observado la presencia de proteínas extracelulares específicas durante la embriogénesis

somática (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992; Nielsen & Hanse, 1992; Filipecki & Przybecki, 1994).

La posible función de las proteínas extracelulares se ha derivado de las siguientes tres observaciones:

1. La velocidad de adquisición del potencial embriogénico de células del hipocótilo de *D. carota* aumenta considerablemente por la adición de proteínas extracelulares de una suspensión embriogénica ya establecida (De Vries *et al.*, 1988b).

2. La capacidad en la embriogénesis somática de líneas celulares con bajo potencial embriogénico o líneas celulares no embriogénicas puede ser parcialmente restablecida por la adición de componentes secretados por líneas celulares embriogénicas (De Vries *et al.*, 1988b).

3. Durante la embriogénesis somática los mayores cambios detectados ocurren en las proteínas de membrana o las que se secretan al medio de cultivo. Se han aislado genes que codifican diferentes proteínas extracelulares que influyen en la embriogénesis, las cuales han sido denominadas EP1, EP2, EP3, EP4 y EP5, respectivamente (De Jong *et al.*, 1992; Poulsen *et al.*, 1996).

Los estudios realizados en los embriones del mutante ts11 de *D. carota*, la cual desarrolla el proceso de la ES normal a 24°C pero a 32°C el proceso no va más allá del estadio globular al menos de que el sistema sea complementado con medio condicionado de cultivos silvestres o del mismo cultivo a 24°C (Lo Schiavo *et al.*, 1990), revelaron que es necesaria la actividad de una o varias proteínas extracelulares para la

transición del estadio globular al de torpedo en el embrión somático (De Jong *et al.*, 1993, 1995, Van Engel y De Vries 1992). Posteriormente esta proteína fue identificada como una glicoproteína de 32 kDa con actividad de quitinasa, llamada EP3 (De Jong *et al.*, 1995); se demostró que esta proteína es específica de la fase globular y que es indispensable para el desarrollo avanzado de la embriogénesis somática (De Jong *et al.*, 1995). En *C. arabica*, Rojas-Herrera *et al.*, (2002) observaron la expresión de una quitinasa clase III, la cual pudiera tener un papel importante en el establecimiento de la ES. En el caso de *C. canephora* var. Robusta se han reportado la presencia de EP3 y EP32 (Rodríguez *et al.*, 2000) a partir del momento en que se expresaron los agregados celulares embriogénicos, la detección disminuyó cualitativamente en las etapas correspondientes a la fase de torpedo del desarrollo embrionario. La presencia de estas dos proteínas durante casi todo el desarrollo del proceso embriogénico al parecer condiciona el medio desde sus etapas iniciales, para el posterior progreso de la embriogénesis somática. Resultados similares han sido informados en cultivos celulares de *Saccharum* sp. (Blanco *et al.*, 1997). Por otro lado se ha demostrado que cuando se adiciona el pentapéptido α -fitosulfocina al medio de inducción para la embriogénesis somática se produce un aumento en el número de embriones (Kobayashi *et al.*, 1999). Sin embargo la función de la α -fitosulfocina podría estar relacionada con el crecimiento de las células mas que con el desarrollo de los embriones (Hanai *et al.*, 2000).

Existen diversos reportes de genes involucrados en la regulación de los estadios tardíos de la ES (Zimmerman, 1993; Schmidt *et al.*, 1997), pero

se sabe muy poco en el ámbito molecular sobre los procesos de inducción de la ES. Durante la inducción de la ES en *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado la expresión ectópica de diferentes genes. Por ejemplo, la expresión de los genes LEAFY COTYLEDON 1 (LEC 1)(Lotan *et al.*, 1998), LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2)(Stone *et al.*, 2001), BABY BOOM (BBM)(Boutillier *et al.*, 2002), WUSCHEL (WUS)(Zuo *et al.*, 2002), produce la formación espontánea de embriones somáticos en plantas o en explantes. Los tres genes codifican factores de transcripción.

1.3.2 CINASA TIPO RECEPTOR RELACIONADA CON LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (SERK)

Como se mencionó anteriormente, la expresión ectópica de diferentes genes en *A. thaliana* induce la ES; sin embargo, hasta la fecha poco se conoce sobre los mecanismos bioquímicos y moleculares de dicha inducción. Recientemente se han publicado diversos trabajos sobre una cinasa tipo receptor de la embriogénesis somática (SERK), en los que se muestra que es un marcador de la ES en *D. carota*, *D. glomerata* y *A. thaliana* (Schmidt *et al.*, 1997; Somleva *et al.*, 2000, Hecht *et al.*, 2001). El primer reporte sobre este gen fue en 1997 en *D. carota* (Schmidt *et al.*, 1997). En este modelo se aisló un gen que codifica para una proteína con una secuencia de aminoácidos rica en leucina y con un dominio con actividad de cinasa, la cual se nombró DcSERK y se estableció como un marcador de la transición de aquellas células somáticas que poseen la competencia para formar células

embriogénicas, debido a que en este sistema los embriones somáticos se formaron únicamente a partir de las células que expresaron SERK (Schmidt *et al.*, 1997). Los autores sugieren que el empleo de SERK como marcador molecular permite distinguir en el ámbito unicelular aquellas células somáticas que han adquirido la facultad embriogénica. Como puede observarse en la figura 1.2, únicamente aquellas células de explantes de hipocotilo que expresan SERK (G) pueden desprenderse del tejido (H) y dar lugar a un embrión somático. Además, células en suspensión transformadas con el gen de la luciferasa bajo el control del promotor de SERK, expresan el gen reportero a lo largo del proceso embriogénico hasta la formación de estructuras globulares (panel inferior).

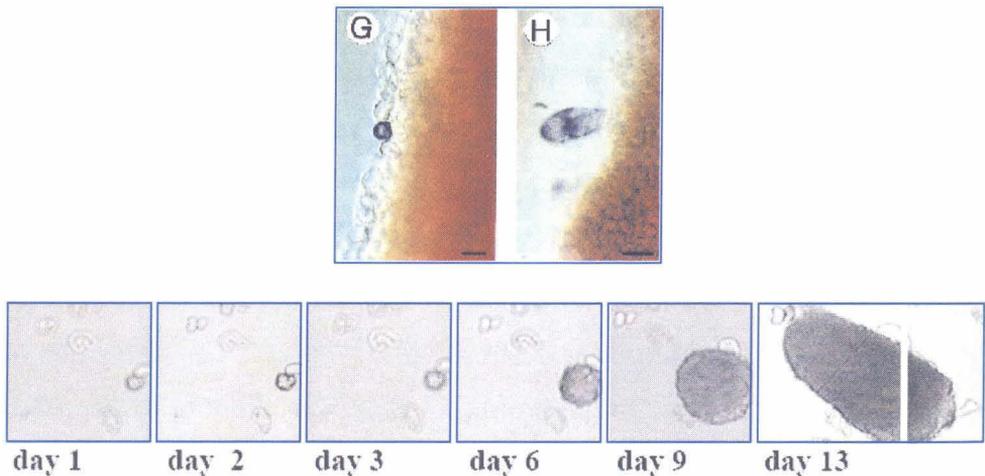


Figura 1.2. Expresión de SERK en células con capacidad embriogénica. Ver texto para la descripción (Schmidt *et al.*, 1997).

La identificación de SERK en *Dactylis glomerata* (Somleva *et al.*, 2000) indica que SERK también funciona en plantas monocotiledóneas. En *A. thaliana*, se encontró que AtSERK1 se expresa normalmente en los óvulos y durante el inicio de las embriogénesis cigótica y somática. Por otro lado, Hecht *et al.* (2001) encontraron que la sobreexpresión de AtSERK1 aumenta el potencial embriogénico en *A. thaliana*, lo cual indicaría que AtSERK1 funciona como un promotor de la competencia embriogénica.

Al parecer, las posibles funciones de SERK no se limitan al proceso embriogénico; por ejemplo, en cultivos de arroz (*Oryza sativa*) se demostró que OsSERK además de intervenir en la regulación de la ES, es inducido por moléculas señalizadoras de defensa, y confiere resistencia en contra de infecciones de hongos (Hu *et al.*, 2005). Por otro lado estudios realizados en cultivo de tejidos de *Medicago truncatula* han encontrado que la expresión de MtSERK es inducida por el ácido naftalenacético (ANA, una auxina), mientras que la citocinina bencilaminopurina (BA) no tiene efecto alguno sobre su expresión; sin embargo, cuando se emplearon simultáneamente los dos fitoreguladores ANA y BA se pudo observar un efecto de sinergia en la expresión de MtSERK, aumentando el doble la expresión de SERK en comparación de cuando sólo se empleó ANA. A través de este trabajo se pudo determinar que existe una correlación entre la expresión de MtSERK y la ES y se sugirió que MtSERK puede jugar un papel en la morfoogénesis, ya que la formación de raíz de *M. truncatula* es regulada por auxinas (Nolan *et al.*, 2003). Por otro lado, en girasol se pudo observar la expresión de SERK en las primeras horas de

inducción de la ES así como en organogénesis, indistintamente; los niveles de expresión de SERK disminuyen posteriormente en el medio de inducción a la organogénesis, mientras que en el medio de inducción a la embriogénesis se mantiene. Sin embargo, en las primeras 48 h de inducción a la organogénesis aún se puede revertir o cambiar el proceso de inducción de organogénesis a embriogénesis modificando las condiciones del medio de inducción (Thomas *et al.*, 2004). En maíz, los patrones de expresión de SERK son diferentes a los de DcSERK, el cual se expresa solo en callo embriogénico mientras que los genes ZmSERK1 y ZmSERK2 se expresaron tanto en callo embriogénico como en el no embriogénico, (Baudino *et al.*, 2001).

Estos estudios sugieren de que SERK puede constituir una pequeña familia de genes con funciones conservadas en las plantas, con un papel específico en la embriogénesis y posiblemente en otros procesos (Hu *et al.*, 2005).

1.4 ASPECTOS BIOQUÍMICOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

1.4.1 LAS PROTEÍNAS CINASAS ACTIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK) EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las células pueden reaccionar ante cambios en el medio ambiente al percibir señales extracelulares, mediante la producción de respuestas intracelulares. Los estímulos o señales extracelulares pueden ser tanto bióticas como abióticas (Figura 1.3).

Uno de los mecanismos mediante los cuales las células pueden descifrar las señales exteriores es mediante cascadas de fosforilación/desfosforilación mediadas por proteínas cinasas. De manera general, las proteínas cinasas de los organismos eucarióticos forman una gran familia de proteínas relacionadas entre sí; estas enzimas catalizan la transferencia del grupo γ -fosfato del ATP hacia el grupo alcohol de la cadena lateral de los aminoácidos serina y treonina y/o tirosina, formando ésteres fosfóricos. La fosforilación de las proteínas es una de las principales modificaciones que afectan la actividad biológica de las proteínas, entre otros factores afectan su localización subcelular, su vida media o su asociación con otras proteínas (Cohen *et al.*, 2000; Hanks *et al.*, 1988).

Las MAPKs son activadas por una doble fosforilación, una en residuos de tirosina y la otra en residuos de treonina en motivos de fosforilación TXY, pudiendo X ser prolina, glicina, ácido glutámico o ácido aspártico (Payne *et al.*, 1991; Canagarajah *et al.*, 1997); estos residuos están altamente conservados en las MAPKs de los eucariontes.

Las MAPK tienen como sustrato otras proteínas cinasas, proteínas de superficie, proteínas del citoesqueleto y diferentes factores de transcripción, entre los que se encuentran miembros de las familias Jun (Pulverer *et al.*, 1991) y Fos (Muller *et al.*, 1997 & Wasylyk *et al.*, 1998). Un sustrato que ha sido utilizado para determinar la actividad de las MAPKs *in vitro*, es la proteína básica de mielina (MBP): Para determinar MAPK activadas se emplean anticuerpos que reconocen al motivo TXY bisfosforilado (Hirt *et al.*, 2000). Mediante ensayos de cinasa en gel se

pueden observar, por autorradiografía, bandas que migran alrededor de 38 a 56 kDa aunque se han reportado genes en *A. thaliana*, que codifican MAPKs de masas moleculares de hasta 58 kDa.

Las MAPKs están conservadas en todos los eucariontes. Varios estudios han demostrado que las MAPKs de plantas tienen un papel muy importante en diversos aspectos del desarrollo (Wilson *et al.*, 1997), la división celular (Banno *et al.*, 1993; Calderini *et al.*, 1998; Bögre *et al.*, 1999) y la acción de reguladores del crecimiento incluyendo las auxinas (Mizoguchi *et al.*, 1994), el ácido abscísico (Knetsch *et al.*, 1996), el ácido giberélico (Huttly & Phillips, 1995), el etileno (Kieber *et al.*, 1993; Ouaked *et al.*, 2003), el ácido salicílico (Zhang & Klessig, 1997) y el ácido jasmónico (Seo *et al.*, 1995; Gomi *et al.*, 2005).

A pesar de haber sido originalmente descritas por su actividad en rutas de señalización que induce a la proliferación celular, diversas evidencias en los ámbitos fisiológico, bioquímico y molecular sugieren que la actividad de las MAPK de plantas está relacionada con varios tipos de extremos ambientales, incluyendo el daño mecánico (Seo *et al.*, 1995), la invasión por patógenos (Ligterink *et al.*, 1997), el frío, la desecación (Jonak *et al.*, 1996) y el estrés osmótico (Pöpping *et al.*, 1996).

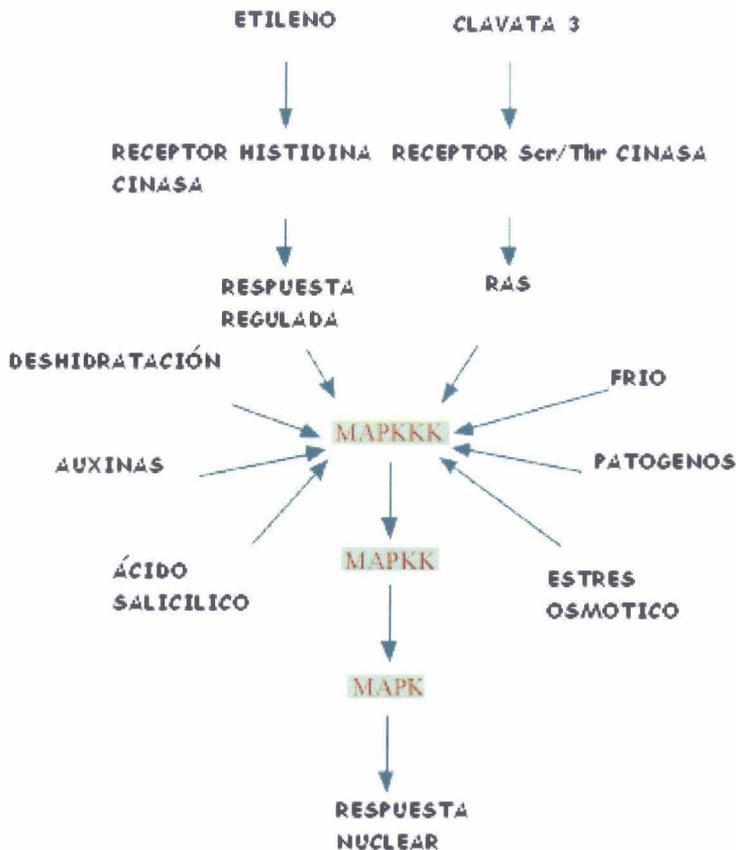


Figura 1.3. Esquema que ilustra los componentes de la vía de transducción de señales mediadas por el módulo de MAPK (modificado de Souza *et al.*, 2001).

Con base en los antecedentes presentados, en el presente trabajo se pretendió establecer si las vías constituidas por las MAPK podrían ser las responsables de la transducción de las señales que disparan la embriogénesis somática en *C. canephora*, analizando sus niveles de activación a lo largo de las primeras etapas del proceso y evaluando si existen modificaciones en su activación en función de las diferentes etapas.

1.5 HIPÓTESIS

Si las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) están involucradas en la señalización que conduce al establecimiento de la ES en *C. canephora*, sus niveles de actividad se incrementarán en la etapa del proceso en donde ocurre la transición del estadio somático al estadio embriogénico.

1.6 OBJETIVO GENERAL

Determinar si existe una coincidencia entre la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y el establecimiento de la transición embriogénica durante la ES de *Coffea canephora*.

1.7 OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar los niveles de activación de las MAPKs antes y después del inicio de la embriogénesis somática de *C. canephora*.

Clonar fragmentos de ADNc correspondientes a transcritos de proteínas cinasas activadas por mitógenos, presentes durante el proceso de la Es de *C. canephora* y analizar la expresión del(los) correspondiente(s) transcrito(s).

Clonar una(s) secuencia(s) de ADNc de proteínas ortólogas de la cinasa tipo receptor de embriogénesis somática (SERK), presente(s) durante el

proceso de la embriogénesis somática de *C. canephora* y analizar la expresión del(los) correspondiente(s) transcrito(s).

Clonar el(los) gen(es) de SERK de *C. canephora* y utilizarlo(s) como marcador(es) molecular(es) para determinar en que etapa se presenta el inicio de la ES.

BIBLIOGRAFÍA

Ammirato P.V. D.A. Evans, W.R. Sharp, Y. Yamada, eds (1983) Embryogenesis. *In*, Handbook of Plant Cell Culture, Vol 1. Techniques in Propagation and Breeding. MacMillan, New York, pp 82-123.

Banno H., K. Hirano, T. Nakamura, K. Irie, S. Nomoto, K. Matsumoto and Y. Machida (1993) NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11 and Byr2 protein kinases. *Mol. Cell Biol.* **13**: 4745-4752.

Baudino S., S. Hansen, R. Brettschneider, V.F.G. Hecht, T. Dresselhaus, H. Lörz, C. Dumas and P.M. Rogowsky (2001) Molecular characterization of two novel maize LRR receptor-like kinase, which belong to the SERK gene family. *Planta* **213**: 1–10.

Bieysse D., A. Gofflot and N. Michaux-Ferriere (1993) Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Can. J Bot.* **71**: 1496-1502.

Blanco, M.D.A., Nieves, N., Sánchez, M., Borroto, C.G., Castillo, R., González, J.L., Escalona, M., Báez, E. y Hernández, Z. (1997) Protein changes associated with plant regeneration in embryogenic calli of sugarcane (*Saccharum sp.*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **51**: 153-158.

Bögre L., O. Calderini, P. Binarova, M. Matauch, S. Hill, S. Kiegerl, C. Jonak, C. Pollaschek, P. Barker, N.S. Huskisson, H. Hirt and E. Heberle-Bors (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* **11**: 101-114.

Boutilier K., R. Offringa, V.K. Sharma, H. Kieftd, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C.-M. Liu, A.A.M. van Lammeren, B.L.A. Miki, J.B.M. Custers and M.M. van Lookeren Campagne (2002) Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *Plant Cell* **14**: 1737-1749.

Calderini O., L. Borgel, O. Vicente, P. Binarova, E. Heberle-Bors and C. Wilson (1998) A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* **111**: 3091-3100.

Canagarajah B.J., A. Khokhlatchev, H.H. Cobb and E.J. Goldsmith (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**: 859-859.

Cohen P. (2000) The regulation of protein function by multisite phosphorylation, a 25 year update. *ITBS* **25**: 596-600.

Coutos-Thévenot P., O. Maës, T. Jouenne, M.C. Mauro, M. Boulay, A. Deloire and J. Guern (1992) Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Sci.* **86**: 137-145.

De Jong. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Vsn Kammen, S. C. De vries (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, **4**: 425-433.

De Jong, A.J., Heidstra, R., Spaink, H.P., Hartog, M.V., Meijer, E.A., Hendriks, T., Lo Schiavo, F., Terzi, M., Bisseling, T., Van Kammen, A. y De Vries, S.C. (1993) *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* **5**: 615-620.

De Jong A. J., T. Hendriks, E. A. Meijer, M. Penning, F. Lo Schiavo, M. Terzi, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1995) Transient reduction in secreted 32 kDa chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variants ts11. *Dev. Genet.*, **16**: 332-343.

Dodeman V.L., G. Ducreux and M. Kreis (1997) Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* **48**: 1493-1509.

Dublin P. (1981) Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de cafeier arabusta. *Café Cacao Thé* **25**: 237–242.

Dudits D., L. Bogre and J. Gyorgyey (1991) Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro. *J. Cell Sci.* **99**: 475–484.

De Vries S.C., H. Booij, R. Janssens, R. Vogel, L. Saris, S. Lo Shiavo, M. Terzi and A. Van Kammen (1988a) Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes Dev.* **2**: 462-476.

De Vries S.C., H. Booij, P. Meyerink, G. Huisman, D.H. Wilde, T.L. Thomas and A. Van Kammen (1988b) Acquisition of embryogenic potential in carrot cell suspension cultures. *Planta* **176**: 196-204.

Filipecki M.K. and Z. Przybecki (1994) Marker proteins of somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Genet. Pol.* **35**: 1-9.

Gomi K., D. Ogawa, S. Katou, H. Kamada, N. Nakajima, H. Saji, T. Soyano, M. Sasabe, Y. Machida, I. Mitsuahara, Y. Ohashi and S. Seo (2005) A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK

is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in Tobacco. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1902–1914.

Hanai H., T. Matsuno, M. Yamamoto, Y. Matsubayashi, T. Kobayashi, H. Kamada, Y. Sakagami (2000) A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic formation. *Plant Cell Physiol.*, **41**:27-32.

Hanks S.K., A.M. Quinn and T. Hunter (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.

Hatanaka T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida and Yamaguchi T. (1991) Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.* **10**: 179–182.

Hecht V., J.P. Vielle-Calzada, M.V. Hartog, E.D. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus and S.C. de Vries (2001) The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* **127**: 803–816.

Hirt H. (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2405–2407.

Hu H., L. Xiong and Y. Yang (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* **222**: 107–117.

Huttly A.K. and A.L. Phillips (1995) Gibberellin-regulated expression of oat aleurone cell of two kinases that show homology to MAP kinases and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* **27**: 1043-1052.

Jonak C., S. Kiegerl, W. Ligterink, P.J. Baker, N.S. Huskisson and Hirt (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**: 11274-11279.

Kieber J.J., M. Rothenberg, G. Roman, K.A. Feldmann and J. Ecker (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis thaliana*, encodes a member of the raf family protein kinases. *Cell* **72**: 427-441.

is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in Tobacco. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1902–1914.

Hanai H., T. Matsuno, M. Yamamoto, Y. Matsubayashi, T. Kobayashi, H. Kamada, Y. Sakagami (2000) A secreted peptide growth factor, phytosulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic formation. *Plan Cell Physiol.*, **41**:27-32.

Hanks S.K., A.M. Quinn and T. Hunter (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* **241**: 42-52.

Hatanaka T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida and Yamaguchi T. (1991) Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep.* **10**: 179–182.

Hecht V., J.P. Vielle-Calzada, M.V. Hartog, E.D. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus and S.C. de Vries (2001) The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* **127**: 803–816.

Hirt H. (2000) Connecting oxidative stress, auxin, and cell cycle regulation through a plant mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 2405–2407.

Hu H., L. Xiong and Y. Yang (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* **222**: 107–117.

Huttly A.K. and A.L. Phillips (1995) Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cell of two kinases that show homology to MAP kinases and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* **27**: 1043-1052.

Jonak C., S. Kiegerl, W. Ligterink, P.J. Baker, N.S. Huskisson and H. Hirt (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**: 11274-11279.

Kieber J.J., M. Rothenberg, G. Roman, K.A. Feldmann and J.R. Ecker (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis thaliana*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427-441.

Knetsch M.L.W., M. Wang, B.E. Snaarjagalska and S. Heimovaaradijkstra (1996) Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase- activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* **8**: 1061-1067.

Konar R.N., E. Thomas and H.E. Street (1972) Origin and structure of embryoids arising from epidermal cells of the stem of *Ranunculus sceleratus* L. *J. Cell Sci.* **11**: 77-93.

Krikorian, A.D. y Simola, L.K. (1999) Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiol. Plant.* **105**: 348-355.

Kobayashi T., C. H. Eun, H. Hanai, Y. Matsubayashi, Y. Sakagami, H. Kamada (1999) Phytosulphokine- α , a peptidic plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *J. Exp. Bot.*, **50**: 1123-1128.

Lee E. K., D. Y. Cho, W. Y. Soh (2001) Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Rep.*, **20**: 408-415.

Ligterink W., T. Kroj, U. zur Nieden, H. Hirt and D Scheel (1997) Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* **276**: 2054-2057.

Lo Schiavo F., G. Giuliano, S.C. De Vries, A. Genga, R. Bollini, L. Pitto, F. Cosan, V. Nuti-Ronchi, M. Terzi (1990) A carrot cell variant temperatura sensitive for domatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Mol. Gen. Genet.*, **223**: 385-393.

Lotan T., M.A. Ohto, K.M. Yee, M.A.L. West, R. Lo, R.W. Kwong, K. Yamagishi, R.L. Fischer, Goldberg R.B. and J.J. Harada (1998) *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* **93**: 1195–1205.

Menéndez-Yuffá A. and E. de Garcia (1997) Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor”. *Protoplasma*. **199**: 208–214.

Menéndez, A. and Nieto, M. (1994) Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Rep.* **13**: 197-202.

Müller J.M., B. Krauss, Ch. Kaltschmidt, P.A. Baeuerle and R.A. Rupec (1997) Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway, *J. Biol. Sci.* **272**: 23435-23439.

Mizoguchi T., Y. Gotoh, E. Nishida, N. Yamaguchi-Shinozaki, T. Iwasaki, H. Kamada and K. Shinozaki (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* **5**: 111-122.

Neuenschwander B. and T.W. Baumann (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* **10**: 608–612.

Nielsen K.A. and I.B. Hansen (1992) Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant. Physiol.* **139**: 489-497.

Nolan K.E., R.R. Irwanto and R.J. Rose (2003) Auxin up-regulates MtSERK1 expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol.* **133**: 218-230.

Ouaked F., W. Rozhon, D. Lecourieux and H. Hirt (2003) A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *EMBO J.* **22**: 1282-1288.

Payne D.M., A. J. Rossomando, P. Martino, A. K. Erickson, J. H. Her, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, M.J. Weber and, T.W. Sturgill (1991)

Identification of the regulatory phosphorylation sites in p42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* **10**: 885-892.

Pierson E.S., A.A.M. Van Lammeren, J.H.N. Schel and G. Staritsky (1983) *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protop.* **115**: 208–216.

Pöpping B., T. Gibbons and M.D. Watson (1996) The *Pisum sativum* MAP kinase homologue (PsMAPK) rescues the *Saccharomyces cerevisiae* hog1 deletion mutant under conditions of high osmotic stress. *Plant Mol. Biol.* **31**: 355-363.

Poulsen G.B., G. Frugis, M. Albrechtsen and D. Mariotti (1996) Synthesis of extracellular proteins in embryogenic and non-embryogenic cell cultures of alfalfa. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **44**: 257–260.

Pretová A. and B. Obert (2003) Flax (*Linum usitatissimum* L.) – a plant system for study of embryogenesis. *Acta Biol. Crac. Series Bot.* **45**: 15–18.

Pulverer B.J., J.M. Kyriakis, J. Avruch, E. Nikolakaki and J.R. Woodgett (1991) Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinase. *Nature* **353**: 670-674.

Quiroz-Figueroa F.R., C.F.J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera and V.M. Loyola-Vargas (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* **20**: 1141–1149.

Reinert J. (1959) Über die Kontrolle der morphogenese und die induction von adventivembryonen an gewebekulturen aus karotten. *Planta*, **53**: 318-333.

Rodríguez Mayra, A. M. Cevallos y Montes Silvia (2000) Proteínas extracelulares marcadoras del potencial embriogénico en suspensiones celulares de *Coffea spp.* *Cultivos Tropicales*. **21**: 11-15.

Rojas-Herrera R. and V. M. Loyola-Vargas (2002) Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. *Plant Sci.* **163**: 705–711.

Rose R.J., K.E. Nolan and L. Bicego (1999) The development of the highly regenerable seed line Jemalong 2HA for transformation of *M. truncatula*: implications for regenerability via somatic embryogenesis. *J. Plant Physiol.* **155**: 788-791.

Sengupta, C. y Raghavan, V. (1980) Somatic embryogenesis in carrot cell suspension I. Pattern of protein and nucleic acid synthesis. *J. Exp. Bot.* **31**, 247-258.

Schmidt E.D.L., F. Guzzo, M.A.J. Toonen and S.C. de Vries (2001) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Develop.* **124**: 2049-2062.

Seo S., M. Okamoto, H. Seto, K. Ishizuka, H. Sano and Y. Ohashi (1995) Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathway. *Science* **270**: 213-216.

Sharp W.R., M.R. Sondhal, L.S. Caldas and G.B. Maraffa (1980) The physiological of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* **2**: 268-310.

Somleva M.N., E.D.L. Schmidt and S.C. de Vries (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep.* **19**: 718-726.

Söndahl MR, Sharp WR (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z Pflanzenphysiol* **81**: 395–408.

Söndahl MR, Spahlinger D, Sharp WR (1979) A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z Pflanzenphysiol* **94**: 101–108.

Souza G.M., A.C.Q. Simoes, K.C. Oliveira, H.M. Garay, L.C. Fiorini, F.S. Gomes, M.Y. Nishiyama-Jr and A.M. da Silva (2001) The sugarcane signal transduction (SUCAST) catalogue: prospecting signal transduction in sugarcane. *Genet. Mol. Biol.* **24**: 25-34.

Staritsky G (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Ned.* **19**: 509–514.

Stone S.L., L.W. Kwong, K.M. Yee, J. Pelletier, L. Lepiniec, R.L. Fischer, R.B. Goldberg and J.J. Harada (2001) *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 11806–11811.

Steward F.C., M.O. Mapes and K. Mears (1958) Growth and organized development of cultured cells: II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.* **45**: 705-708.

Taylor M. G., I. K. Vasil (1996) The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). *Am. J. Bot.*, **83**: 28-44.

Thomas C., D. Meyer, C. Himber and A. Steinmetz (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 35-42.

Wasylyk, B., J. Hagman and A. Gutierrez-Hartmann (1998) Ets transcription factors: nuclear effectors of the Ras-MAP-kinase signaling pathway. *Trends Bioch. Sci.* **23**: 213-216.

Williams E.G. and G. Maheswaran (1986) Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann. Bot.* **57**: 443-462.

Wilson C., V. Voronig, A. Touraer, O. Vicente and E. Heberle-Bors (1997) A developmentally regulated MAP Kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* **9**: 2093-2100.

Van Engelen, F.A. y De Vries, S.C. (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet.* **8**: 66-70.

Yasuda T., Y. Fujii and T. Yamaguchi (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell, Physiol.* **26**: 595–597.

Zhang S. and D.F. Klessig (1997) Salicylic acid activates a 48-kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**: 809-824.

Zimmerman J.L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* **5**: 1411-1423.

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

CAPÍTULO 2

Clonación de sondas moleculares de los genes de SERK y MAPK durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*

2.1 INTRODUCCIÓN

Los estudios de los mecanismos que regulan el establecimiento de la embriogénesis somática en vegetales no han logrado ofrecer información sobre cuáles son exactamente las señales que disparan el proceso en las células somáticas, tampoco cuáles son los mecanismos celulares que transducen dichas señales extracelulares hacia el núcleo para inducir la diferenciación. Sin embargo, se han identificado una serie de elementos bioquímicos y moleculares que permiten determinar con bastante aproximación los tiempos en los cuales podrían iniciarse dichos procesos de diferenciación.

Como ejemplos pueden mencionarse los genes EP3 de *D. carota* (De Jong *et al.*, 1993) y AtEP3 de *A. thaliana* (Passarinho *et al.*, 2000), los cuales codifican endoquitinasas indispensables en el establecimiento de la ES, pero cuya expresión está restringida a las células nodriza; además, los genes que codifican para estas enzimas también presentan niveles importantes de expresión en otros estadios del desarrollo. Por otro lado, se ha demostrado la importancia de ciertas arabinogalacto proteínas (AGPs) en la inducción de la ES en diferentes especies; no

obstante, se ha demostrado, mediante el uso de anticuerpos específicos, que los epítopes correspondientes pueden ser desplegados en diferentes AGP e inclusive en otras moléculas como las pectinas (Showalter, 2001), lo que restringe su uso como marcadores bioquímicos de la ES.

Tanto en *D. carota* (Schmidt *et al.*, 1997) como en *A. thaliana* (Hecht *et al.*, 2001) se ha determinado que el gen SERK se expresa exclusivamente en células somáticas que finalmente tomarán el destino embriogénico, y su expresión se apaga después del estadio preglobular. SERK codifica una cinasa tipo receptor, para la cual se ha demostrado su actividad catalítica *in vitro*. Si bien como para la mayoría de los receptores citoplásmicos de plantas se desconoce la identidad del ligando, su patrón de expresión hace suponer que podría estar involucrado en la unión de la señal embriogénica producida por células vecinas. Estos datos convierten al gen SERK en un marcador del inicio del proceso de ES.

Debido a que en el presente trabajo se analizarán también los niveles de expresión de genes de MAPK antes y después del inicio de la diferenciación embriogénica, la primera parte del trabajo consistió en la clonación de los genes de MAPK y del(os) gen(es) de SERK presentes durante la ES del café.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL BIOLÓGICO

El material biológico utilizado en esta investigación fueron explantes foliares de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* bajo condiciones de fotoperíodo (16/8 h luz/oscuridad) a 25°C, en un medio de cultivo que contiene 4.33 g·L⁻¹ de las sales del medio MS, 0.55mM mioinositol, 0.012 mM de tiamina, 0.158 mM de cisteína, 0.0876 mM de sacarosa, 0.054 mM de ácido naftalenacético, 0.00232 mM de kinetina, y el pH ajustado a 5.8.

2.2.2 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS DIRECTA

Para la inducción de la embriogénesis somática se empleó el protocolo previamente establecido por Quiroz-Figueroa *et al.* (2006). Cada explante fue cortado homogéneamente y colocado en un matraz de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo de Yasuda modificado (Yasuda *et al.*, 1985).

2.2.3 AISLAMIENTO DEL ARN

La extracción de ARN se realizó mediante el reactivo comercial basado en el método de Chomczynski y Sacchi (1987) (Trizol, Invitrogen), de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Macerar 0.9 g de muestra en presencia de nitrógeno líquido y adicionar 1 mL de trizol.
2. Transferir la muestra a un tubo nuevo y dejar reposar por 10 min.
3. Centrifugar a 14,000 x g por 5 min a 4°C.
4. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, agregar 200 µL de una mezcla de cloroformo: alcohol isoamílico (49:1).
5. Incubar por 3 min a TA.
6. Centrifugar a 12,000 x g por 15 min a 4°C.
7. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y adicionar un volumen igual de isopropanol.
8. Incubar por 2 h a -20°C.
9. Centrifugar a 12,000 x g por 15 min a 4°C, desechar el sobrenadante.
10. Lavar la pastilla con etanol al 70%.
11. Centrifugar a 7,500 x g por 5 min a 4°C, desechar el sobrenadante.
12. Incubar la pastilla por 10 min a TA.
13. Resuspender la pastilla en agua libre de RNasas.

2.2.4 AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE MAPK Y SERK POR RT-PCR

Ambos ensayos se realizaron con el paquete comercial SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen), empleando cebadores degenerados. Los cuales fueron diseñados mediante el programa de computación Gene Runner[®] con base en las secuencias conservadas de diferentes MAPKs y SERK, respectivamente. Los cebadores empleados para MAPK fueron:

Directo

(PIG) 5'-GGN GCY TAC GGH ATY GTT TGY TCK-3'

Reverso

(MKIX) 5'-GAA HAT YCA ACC BAC HGA CCA HAC ATC AAT-3'

Para SERK se empelaron varias combinaciones de los siguientes cebadores:

NOMBRE	SECUENCIA (dirección 5' → 3')
Directo 1	GC (C/T) AACAC (C/T) (C/G) GA (A/G) GGTGATGC
Directo 2	GTCTTCTTGCAGAGTTGGGATCC (C/T) AC
Directo 3	TGGA (A/G) CTTTACAG (C/T) AA (C/T) AACATAA (C/G) TGG
Directo 4	CCTGCGYA (A/G) GAGGATCC
Directo 5	TGATTAGCATGGC (A/T/G) G
Reverso 1	CTTGG (A/G) CC (A/G) GA (C/T) A (A/G) (C/T) TC (A/G) ACGGCA (C/T) G
Reverso 2	CTC (C/T) ACTTT (C/T) TGCCA (C/T) TCCCA
Reverso 3	GG (C/G) GA (A/G) CC (C/T) TGCGTGCATCA (T/G) AG (C/G) AG (C/T) GCCAC (C/T) TG
Reverso 4	CC (A/G) TTAGCCATGTA (A/T/G) GG
Reverso 5	C (A/C/T) GCCATGCTAATCA

2.2.5 LIGACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE RT-PCR AL PLÁSMIDO VECTOR

Para ligar directamente los productos del PCR en vectores apropiados, puede aprovecharse la actividad residual de la *Taq* polimerasa, la cual adiciona inespecíficamente 2 ó 3 residuos de desoxiadenilato en los extremos 3'-OH de las cadenas nacientes de ADN, de una manera

independiente de la secuencia del templado, por lo que se forman extremos cohesivos. De esta manera, los productos de RT-PCR del tamaño esperado (~570 pb para MAPKs y ~776 pb para SERK) se ligaron directamente en el vector pGEM-T-Easy® (Promega), de acuerdo con el protocolo descrito a continuación.

2.2.6 PROTOCOLO PARA LA CLONACIÓN DE PRODUCTOS DE PCR EN EL VECTOR pGEM-T-Easy®.

Centrifugar brevemente el tubo que contiene al vector para coleccionar el líquido en el fondo del tubo.

Establecer reacciones de ligación como se describe en el siguiente cuadro.

	REACCIÓN ESTANDAR	TESTIGO POSITIVO
Amortiguador de ligación 2X	5 µl	5 µl
Vector pGEM®-T-Easy (50ng)	1 µl	1 µl
Producto del PCR	1 µl	--
Testigo de inserto DNA	--	2 µl
DNA ligasa T4	1 µl	1 µl
Aforar con agua desionizada hasta el volumen final	10 µl	10 µl

Mezclar la reacción por pipeteo e incubar la reacción a temperatura ambiente por 5 min. Transformar células competentes inmediatamente o almacenar los productos de ligación a -20°C .

2.2.7 TRANSFORMACIÓN DE *E. COLI* POR CHOQUE TÉRMICO.

- 1.- Descongelar las células competentes en hielo.
- 2.- Agregar $1\ \mu\text{l}$ de la solución de ligación, mezclar por agitación suave.
- 3.- Incubar por 30 min en hielo.
- 4.- Incubar a 42°C por 1 min.
- 5.- Incubar en hielo por 10 min.
- 6.- Agregar $900\ \mu\text{l}$ de medio LB e incubar por 1.5 hr a 37°C con agitación suave.
- 7.- Centrifugar por 10 s a $10000\ \times\ g$ y eliminar el sobrenadante
- 8.- Resuspender la pastilla en $100\ \mu\text{L}$ de medio LB
- 9.- Sembrar en cajas Petri en medio LB conteniendo $100\ \text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina, 0.026% de X-Gal y 0.28% de IPTG.

2.2.8 PURIFICACIÓN DEL ADN PLASMÍDICO

- 1.- Centrifugar 3mL de un cultivo saturado de bacterias por 20s a $10,000\ \times\ g$ y retirar el sobrenadante.

- 2.- Adicionar 200 μ L de solución de resuspensión (Tris, PH=8, 50 mM, EDTA 10 mM y RNasa a 100 μ g/mL) y resuspender la pastilla.
- 3.- Adicionar 200 μ L de solución de lisis (NaOH 200mM, SDS 1%), invertir el tubo suavemente hasta que se aclare la solución.
- 4.- Adicionar 200 μ L de solución de neutralización (Amortiguador de acetato 3M y pH=5.5), Invertir el tubo varias veces.
- 5.- Centrifugar a 10,000 x g por 5 min, transferir el sobrenadante a un tubo que contenga 200 μ L de una solución de silica y mezclar.
- 6.- Centrifugar a 10,000 x g por 20s y retirar el sobrenadante.
- 7.- Adicionar 500 μ L de solución de lavado (NaCl 50mM, Tris-HCl 10 mM pH=7.5, EDTA 2.5 mM, 50 % de etanol), resuspender la pastilla.
- 8.- Centrifugar a 10,000 x g por 15s, retirar el sobrenadante y dejar secar la pastilla por 2 min a 55°C
- 9.- Resuspender la pastilla de silica en 35 μ L de agua, e incubar a 55°C por 2 min.
- 10.- Centrifugar por 30s a 10000 x g, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.

2.2.9 ANÁLISIS DE LAS CLONAS RECOMBINANTES

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

a) Liberación de insertos con el uso de enzimas de restricción. El corte de los plásmidos con la enzima *EcoRI* permite determinar si se libera un fragmento y si éste tiene el mismo tamaño del fragmento amplificado, las condiciones de incubación son las siguientes:

Calentar la solución de ADN plasmídico a 95°C por 5 min y enfriar en hielo, agregar cada reactivo como se muestra en el cuadro:

REACION ESTANDAR	
EcoRI	1μL
Buffer H (10X)	1μL
Muestra (plasmido)	8μL

Incubar a 37°C por 2 h.

b) Reamplificación de insertos mediante PCR, en las siguientes condiciones (94°C 30s, 45°C 1min y 72°C 1min en 40 ciclos y 10 min de extensión a 72°C). Los plásmidos obtenidos de las clonas seleccionadas se utilizan como templados para amplificar segmentos de ADNc, se deben obtener fragmentos del tamaño pronosticado de acuerdo con el diseño de los cebadores. De esta manera se descartan aquellos segmentos inespecíficos que pudieran tener el mismo tamaño de los insertos deseados.

c) Secuenciación de insertos. Una vez realizadas las dos pruebas anteriores, se seleccionan las clonas positivas para extraerle los plásmidos por absorción en sílica. Los plásmidos recombinantes adecuado se envían a secuenciar.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 CLONACIÓN DE SECUENCIAS DE ADNc AMPLIFICADOS CON CEBADORES DE MAPK

Una vez verificada la integridad de las muestras de ARN y después de ser tratadas con DNasa I libre de RNasa, éstas se utilizaron como templados para la síntesis del ADNc y su amplificación por medio de PCR empleando cebadores degenerados diseñados para alinear en las secuencias conservadas de MAPK. Para la amplificación de secuencias de MAPKs en café se utilizaron los cebadores degenerados PIG y MKIX y como templado una mezcla de ARN total de explantes con 15 y 20 días de inducción. Los productos de RT-PCR obtenidos se fraccionaron en geles nativos de agarosa y se visualizaron bajo luz UV. En la figura 2.1 se puede observar la presencia de un fragmento de aproximadamente 570 pb (esperado), por lo cual se decidió analizarlo.

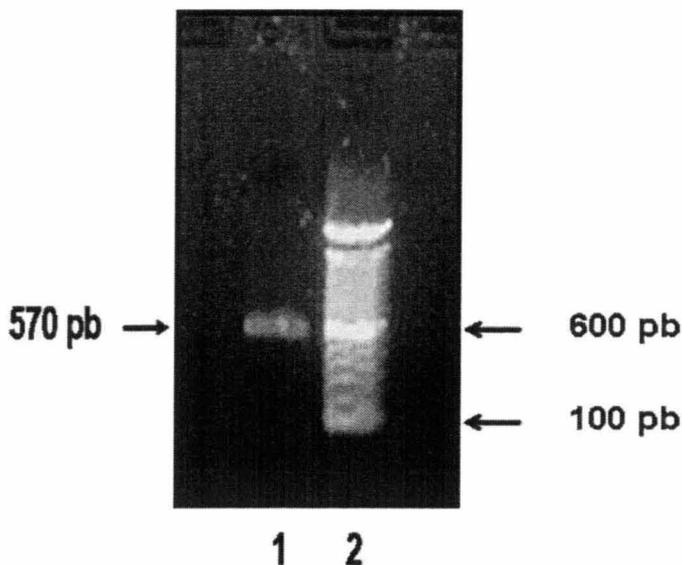


Figura 2.1. Productos de RT-PCR. Muestras de ARN de 15 y 20 días de inducción de la ES en *Coffea canephora*, fueron sometidas a ensayos de RT-PCR empleando los cebadores MKIX y PIG. Los productos fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1: producto de RT-PCR; carril 2: escalera de ADN de 100 pb.

Debido a que en el gel se observa una sola banda, decidimos ligar directamente el producto de PCR en el vector pGEM-T-Easy. Los productos de ligación fueron utilizados para transformar la cepa DH5a de *E. coli* por medio de un choque térmico.

Fueron aisladas las colonias blancas para ser cultivadas en medio LB con $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina a 37°C toda la noche, posteriormente se procedió a la extracción de los plásmidos. En la figura 2.2 se muestran los resultados de la extracción.

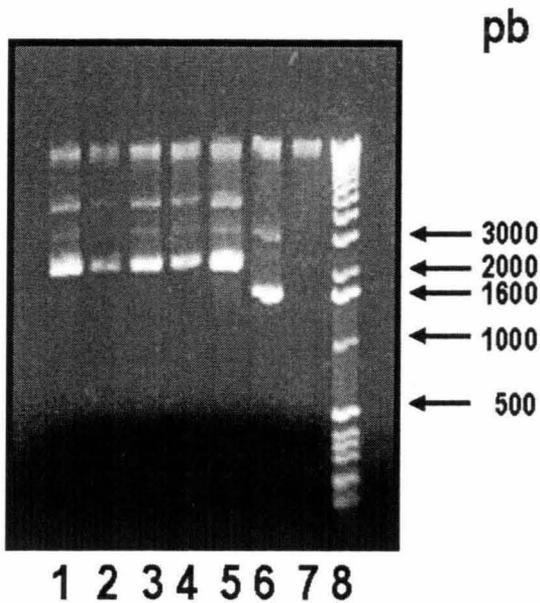


Figura 2.2. Plásmidos extraídos de *E. coli* por lisis alcalina. Electroforesis nativa en gel de agarosa al 1%, teñida con $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carriles 1 a 7: plásmidos aislados de diferentes colonias blancas; carril 8: escalera de ADN.

2.3.2 AMPLIFICACIÓN DE LOS ADNc CLONADOS.

Previo al envío para su secuenciación, se corroboró la presencia de secuencias de MAPK en cada clona, mediante su amplificación por PCR utilizando los cebadores degenerados específicos para MAPK, PIG y MKIX. Los resultados se muestran en la figura 2.3. En las siete clonas se pueden observar una banda que corresponde al tamaño del inserto.

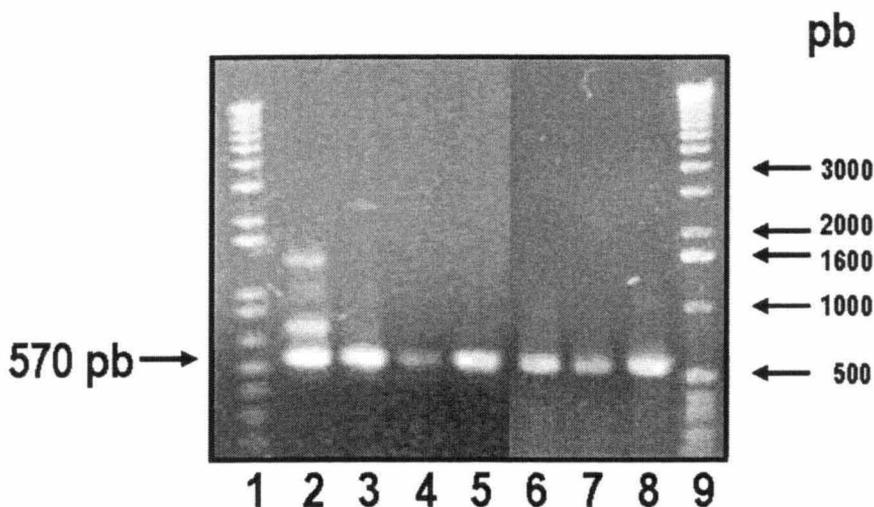


Figura 2.3. Amplificación por PCR de los insertos en las clonas recombinantes 2-8. Fraccionamiento de productos de PCR obtenidos con los cebadores PIG y MKIX, en gel de agarosa al 1.1% y teñidos con $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carriles 1 y 9: escalera de ADN.

Después de la corroboración de la presencia de una posible secuencia de MAPK, las clonas fueron enviadas para su secuenciación al CINVESTAV Irapuato.

En las figuras 2,4 a la 2.7 se muestran las secuencias de nucleótidos y las secuencias deducidas de aminoácidos de cada una de ellas.

ggcgcttacggcattgtttgctctgttttgaattcggagacgaatgagatggtggctgta	60
G A Y G I V C S V L N S E T N E M V A V	20
aagaagattgccaatgctttcgataattacatggacgccaaacgtactctccgggaaatc	120
K K I A N A F D N Y M D A K R T L R E I	40
aagcttcttcgccatttggatcatgaaaatgtaatcgccataagagatgtgattctccg	180
K L L R H L D H E N V I A I R D V I P P	60
cccttgaggaggagttttctgacgtctacatagccacagagctcatggacactgacctt	240
P L R R E F S D V Y I A T E L M D T D L	80
caccaaattattcgatccaatcaatctttgtcogaagagcattctcagtatttcttgat	300
H Q I I R S N Q S L S E E H S Q Y F L Y	100
cagatccctcgaggcctgaaatatatacactctgcaaaagtaattcatagggatcttaa	360
Q I P R G L K Y I H S A K V I H R D L K	120
ccaagcaaccttttggatgaaatgcaaatgtgatcttaagatcattgattttggtcttgcc	420
P S N L L V N A N C D L K I I D F G L A	140
cgcccaaacacgaaaaatgaagtcatgacagagtatggttgactagatggtaccgggca	480
R P N T K N E V M T E Y V V T R W Y R A	160
cctgagctgctcctaaattcatcagattatactgccgaattgatgtgtggtcagtcggt	540
P E L L L N S S D Y T A A I D V W S V G	180
tggattttca	550
W I F	183

Figura 2.4. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M1 (fue la misma que la clona M2). El recuadro indica la presencia del motivo TEY, que es la firma de las MAPK.

aacctactgaccacacatcaattgcggcagtataatctgatgaatttaggagcagctcag	60
L V I G A Y G I V C S V L N S E T N E M	20
gtgcccggtaccatctagtcacaacatactctgtcatgacttcattttccggtgtttgggc	120
V A V K K I A N A F D N Y M D A K R T L	40
gggcaagacaaaatcaatgatcttaagatcacaatttgcattcaccaaaaggttgcttg	180
R E I K L L R H L D H E N V I A I R D V	60
gtttaaagatccctatgaattacttttgcagagtgtatatatttcaggcctcgaaggatct	240
I P P P L R R E F S D V Y I A T E L M D	80
gatacaagaaatactgagaatgctcttcggacaaagattgattggatcgaataatttgg	300
T D L H Q I I R S N Q S L S E E H S Q Y	100
gaaggtcagtgccatgagctctgtggctatgtagacgtcagaaaactccctcctcaagg	360
F L Y Q I L R G L K Y I H S A K V I H R	120
gcgagggaatcacatctcttatggcgattacattttcatgatccaaatggcgaagaagct	420
D L K P S N L L V N A N C D L K I I D F	140
tgatttccggagagtaogtttggcgtccatgtaattatcgaaagcattggcaatcttct	480
G L A R P N T E N E V M T E Y V V T R W	160
ttacagccaccatctcattcgtctccgaattcaaaaccgaacaaacaataccgtaggccc	540
Y R A P E L L L N S S D Y T A A I D V W	180
caatcactagt	551
S V G	183

Figura 2.5. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M3 (fue la misma que la clona M7). El recuadro indica la presencia del motivo TEY, que es la firma de las MAPK.

acctactgaccacacatcaattgcggttgataatcagaagaattcaacaataattctgg	60
R R L R M L L I T G S M R R G L C E R S	20
tgctcgataccatcttgtaacaacatattccggtcataaaaatccggttccggatgttacacg	120
S F F A I W I M K T S V V A I R D I I P	40
agccaatccaaaatcgcatatTTTTtagatcacaattggcatttaagaggagattgctagg	180
P P Q R E A F N D V Y I A Y E L M D T D	60
cttcaagtctctatgaagaacatttgcagaatggataatTTTtaaccgcggaggatctg	240
L H Q I I R S N Q A L S E E H C Q Y F L	80
atacaagaaatactgacaatgctcctctgatagtgctgattagaacgaataatctgatg	300
Y Q I L R G L K Y I H S A N V L H R D L	100
gagatcagtatccataagttcataagcaatgtaaacatcattaaatgcttcctctgagg	360
K P S N L L L N A N C D L K I C D F G L	120
tggtggaattatatctctaattgcaacaactgacgttttcatgatccatattggcgaagaa	420
A R V T S E T D F M T E Y V V T R W Y R	140
gcttgatctctcgcaaagtccctcttcgcatcgatcctgttatcaaaagcattcgcaatct	480
A P E L L L N S S D Y T T A I D V W S V	160
tcttc	485
G	161

Figura 2.6. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M6. El recuadro indica la presencia del motivo TEY, la firma de las MAPK.

aacctacagaccacacatcaattgCGGTTgtataatcagaagaattcaacaataattctg	60
L V I G A Y G I V C S A L N S E T T E H	20
gtgctcgataccatcttgaacaacatatccgtcataaaatccggttccggatgttacac	120
V A L K K I A N A F D N R I D A K R T L	40
gagccaatccaaaatcgcatatTTTTtagatcacaattggcatttaagaggagattgctag	180
R E I K L L R H M D H E N V V A I R D I	60
gcttcaagtctctatgaagaacatttgcagaatggatataTTTTaaccCGGGaggatct	240
I P P P Q R E A F N D V Y I A Y E L M D	80
gatacaagaaatactgacaatgctcctctgatagtgcttgattagaacgaataatctgat	300
T D L H Q I I R S N Q A L S E E H C Q Y	100
ggagatcagtatccataagttcataagcaatgtaaacatcattaatgcttccctctgag	360
F L Y Q I L R G L K Y I H S A N V L H R	120
gtggtggaattatatctctaattgcaacaacgTTTTcatgatccatattggcgaagaagct	420
D L K P S N L L L N A N C D L K I C D F	140
tgatctctcgcaaagtcctcttcgcatcgatcctgTTTcaaaagcattcgcaatcttct	480
G L A R V T S E T D F M T E Y V V T R W	160
tcagcgccacatgctcagtggtctccgaattcaacgCCGAGcaaacgattccgtaggcac	540
Y R A P E L L L N S S D Y T T A I D V W	180
caatcactagt	551
S V G	183

Figura 2.7. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona M4. El recuadro indica la presencia del motivo TEY, la firma de las MAPK.

Podría afirmarse que estas secuencias corresponden a MAPK por presentar el dominio conservado TEY, el cual es considerado como la firma de las MAPK; por ello las cuatro secuencias fueron comparadas en el banco de secuencias EMBL. A continuación se muestran los datos de la comparación de cada clona:

2.3.3 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE LA CLONA M1 EN LA BASES DE DATOS EMBL

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gb AAV34677.1 	Mitogen-activated protein kinase 3 [Brassica napu	<u>340</u>	2e-92
dbj BAC53771.1 	Wound-inuduced protein kinase [Nicotiana bentham	<u>337</u>	1e-91
dbj BAE79636.1 	Wound induced protein kinase [Nicotiana tabacum]	<u>337</u>	1e-91
gb AAV68711.1 	Mitogen-activated protein kinase 3 [Chorispورا bu	<u>337</u>	1e-91
gb AAP20421.1 	Mitogen-activated protein kinase 3 [Lycopersicon	<u>337</u>	2e-91
dbj BAE44363.1 	MAP kinase [Solanum tuberosum]	<u>336</u>	2e-91
dbj BAA09600.1 	WIPK [Nicotiana tabacum]	<u>335</u>	5e-91
gb AAF81419.1 	MAP kinase 1 [Capsicum annuum]	<u>335</u>	7e-91
dbj BAA04866.1 	MAP kinase [Arabidopsis thaliana]	<u>335</u>	7e-91
ref NP_190150.1 	ATMPK3 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 3);...	<u>335</u>	7e-91

2.3.4 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE LA CLONA M3 EN LA BASES DE DATOS EMBL

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gi 634070 	p45Ntf4 serine/threonine protein ki...	<u>358</u>	4e-98
gi 77998071 	Mitogen-activated protein kinase Ntf4	<u>358</u>	4e-98
gi 77998069 	Mitogen-activated protein kinase Ntf4	<u>358</u>	7e-98
gi 7649153 	Mitogen-activated protein kinase [Euph	<u>357</u>	1e-97
gi 33340593 	Mitogen-activated protein kinase 2 [G	<u>357</u>	2e-97
gi 21165525 	Mitogen-activated protein kinase [So	<u>357</u>	2e-97
gi 30171843 	Mitogen-activated protein kinase 2 [L	<u>357</u>	2e-97
gi 38601858 	Mitogen-activated protein kinase 3 [<u>357</u>	2e-97
gi 68342446 	Mitogen-activated protein kinase [Rhe	<u>356</u>	3e-97
gi 298019 	MAP Kinase [Medicago sativa] >gi 58...	<u>355</u>	4e-97

2.3.5 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE LA CLONA M4 EN LA BASES DE DATOS EMBL

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 27884252 emb CAD61274.1 MAP Kinase [Catharanthus roseus]	<u>267</u>	1e-70
gi 20808 emb CAA50036.1 MAP kinase homologue [Pisum sativum]...	<u>264</u>	8e-70
gi 634070 emb CAA58761.1 p45Ntf4 serine/threonine protein ki...	<u>264</u>	8e-70
gi 298019 emb CAA47099.1 MAP Kinase [Medicago sativa] >gi 58...	<u>264</u>	8e-70
gi 77998071 gb ABB16418.1 Mitogen-activated protein kinase Ntf4	<u>264</u>	8e-70
gi 92889449 gb ABE89881.1 Serine/threonine protein kinase, a...	<u>264</u>	8e-70
gi 38601854 emb CAE81274.1 Mitogen-activated protein kinase 1 [<u>264</u>	1e-69
gi 7649153 gb AAF65766.1 Mitogen-activated protein kinase [Euph	<u>263</u>	1e-69
gi 30962145 emb CAD59691.1 Mitogen-activated protein kinase [Ly	<u>263</u>	2e-69
gi 33340593 gb AAQ14867.1 Mitogen-activated protein kinase 2 [G	<u>262</u>	3e-69

2.3.6 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE LA CLONA M6 EN LA BASES DE DATOS EMBL

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
gi 54402040 gb AAV34677.1 Mitogen-activated protein kinase 3 [B	<u>341</u>	7e-93
gi 33328220 gb AAQ09561.1 Trichoderma-induced mitogen activa...	<u>339</u>	3e-92
gi 27374988 dbj BAC53771.1 Wound-induced protein kinase [Nicot	<u>338</u>	5e-92
gi 18143321 dbj BAB79636.1 Wound induced protein kinase [Nicoti	<u>338</u>	5e-92
gi 55978182 gb AAV68711.1 Mitogen-activated protein kinase 3 [C	<u>338</u>	6e-92
gi 30171845 gb AAP20421.1 Mitogen-activated protein kinase 3 [L	<u>338</u>	8e-92
gi 74355985 dbj BAE44363.1 MAP kinase [Solanum tuberosum]	<u>337</u>	1e-91
gi 1136298 dbj BAA09600.1 WIPK [Nicotiana tabacum]	<u>336</u>	2e-91
gi 8925321 gb AAF81419.1 MAP kinase 1 [Capsicum annuum]	<u>336</u>	3e-91
gi 2231034 emb CAA73323.1 MAP kinase I [Petroselinum crispum]	<u>336</u>	3e-91

Como puede observarse, la comparación reveló que las cuatro clonas contienen secuencias que codifican proteínas cinasas activadas por mitógenos.

En la figura 2.8, se muestra la alineación de las secuencias de aminoácidos de cada MAPK clonada de *C. canephora*, con secuencias deducidas de aminoácidos de cuatro especies con las que tuvieron un mayor nivel de identidad. Como se puede observar todas las proteínas MAPK tiene un alto grado de identidad. De igual manera se puede observar el motivo TEY característico de las MAPK.

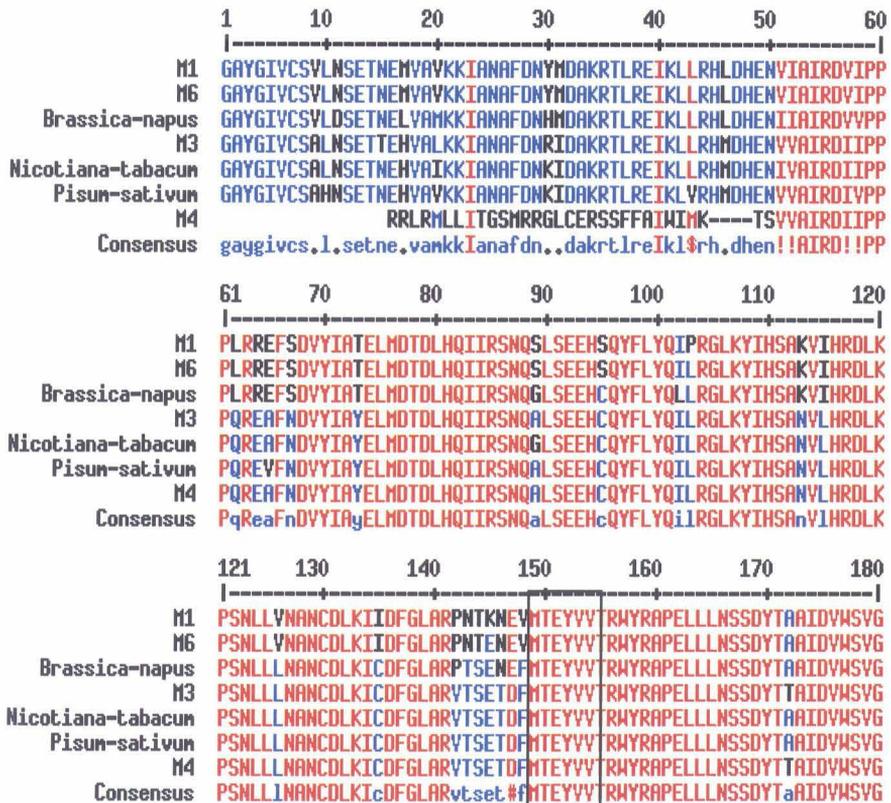


Figura 2.8. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las cuatro MAPK de *C. canephora* aisladas en este trabajo, con MAPKs de otras plantas. En el recuadro se muestra el dominio conservado en las MAPK (TEY). Los números de accesión de cada clona son los siguientes: clona M1, AJ833639; clona M3, AJ833640; clona M4, AJ833641; clona M6, AJ833642.

Con base en los altos niveles de identidad y en la presencia del dominio conservado en las MAPK (enmarcado en la figura 2.8), podemos concluir que efectivamente se pudo clonar los fragmentos de ADN complementario de cuatro MAPK que se expresan durante los primeros estadios de la embriogénesis somática en *C. canephora*.

2.3.7 CLONACIÓN DE SECUENCIAS DE ADNc DE SERK

Una estrategia similar a la empleada para la clonación de MAPKs se aplicó para clonar los ADNc correspondientes de SERK, para ello se probaron diferentes combinaciones de cebadores degenerados para SERK. En la figura 2.9 se muestran los resultados de los ensayos de RT-PCR con diferentes combinaciones de cebadores. Puede observarse que únicamente se obtuvo un producto del tamaño esperado con las combinaciones D3 y R4, y D3 con R5; las demás combinaciones no ofrecieron ningún producto (D3 con R1; D3 con R2; D3 con R4). Los tamaños esperados de ambos segmentos de ADNc fueron de ~855 pb para D3-R4 y de ~776 pb para D3-R5.

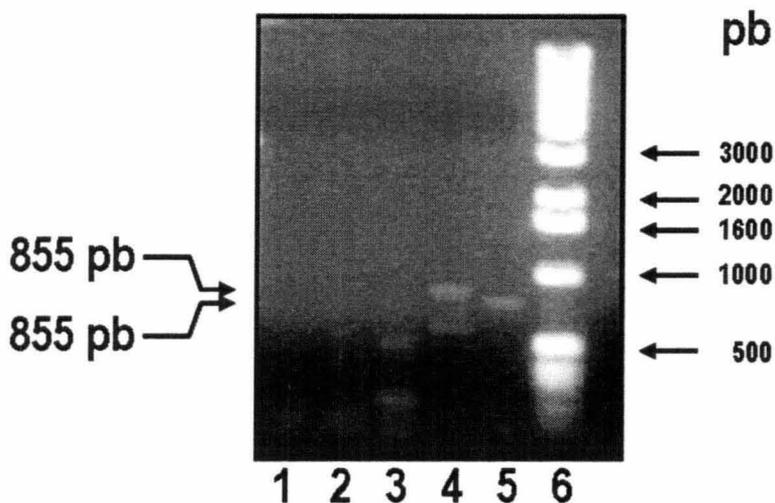


Figura 2.9. Amplificación por RT-PCR de secuencias nucleotídicas del gen *SERK* de *C. canephora*. Los productos obtenidos con diferentes combinaciones de cebadores, fueron fragmentados en un gel nativo de agarosa y teñidos con $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1: combinación D3-R1; carril 2: combinación D3-R2; carril 3: combinación D3-R3; carril 4: combinación D3-R4; carril 5: combinación D3-R5; carril 6: escalera de ADN de 1 Kpb.

Lo que a continuación se hizo fue intentar clonar las bandas de ~ 855 y ~ 776 pb, pero sólo en la de menor tamaño (combinación de cebadores D3-R5), se tuvo éxito. El fragmento de ~ 776 pb se ligó al vector pGEM-Easy, se transformaron células de *E. coli* DH5 α mediante choque térmico, las cuales fueron seleccionadas en un medio selectivo con $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina. En total se obtuvieron 21 colonias blancas, las cuales fueron sometidas a un análisis de extracción de plásmidos por lisis alcalina. Los plásmidos aislados fueron digeridos con *EcoR*I para liberar los fragmentos ligados. Se seleccionaron siete clones al azar

para secuenciar. Una clona se secuenció completa, una no se pudo secuenciar y las otras 5 sólo pudieron ser secuenciadas parcialmente. La secuencia completa y las secuencias parciales al parecer eran la misma. A continuación se muestra el código de la secuencia clonada.

```

cgatttgagctttacagtaataacataaagtgaccaataaccagtgatcttggaaatct 60
D L E L Y S N N I S G P I P S D L G N L 20
tactaatttgggtgagcttggatctctatctgaatagtttcaatggtccaatcccagacac 120
T N L V S L D L Y L N S F N G P I P D T 40
actgggaaagctatcaaaaattgcgattcctgcggtcacaacaacaacagcttgacaggtcc 180
L G K L S K L R F L R L N N N S L T G P 60
ctocccattgtcattgactaacatatacatcgctacaagtccttggatctctctaacaatcg 240
I P L S L T N I S S L Q V L D L S N N R 80
tctttctgggtgctgttccagataaatggttcctttccctatttacaccaattagtttgcg 300
L S G A V P D N G S F S L F T P I S F A 100
taataacttggatctatgtggccctgttactggacgcccttggccaggatctcctccatt 360
N N L D L C G P V T G R P C P G S P P F 120
ctctcctccgctcgtttgtcccaccacctccaattgctactccaggagggaatagtgc 420
S P P P P F V P P P P I A T P G G N S A 140
tactggagctattgctggaggagtgcagctggggctgctctgctgtttgctgctcctgc 480
T G A I A G G V A A G A A L L F A A P A 160
cattgcatttgcattggtggcgtcggcgaaaaccacaagaatatttctttgatgtaccagc 540
I A F A W W R R R K P Q E Y F F D V P A 180
tgaggaggatcctgaggtgcatctagggcagctaaaaggttctccctgagagaattaca 600
E E D P E V H L G Q L K R F S L R E L Q 200
agttgcaacggatagttttagtaataaaaacattctgggttagaggtgggttggggaaggt 660
V A T D S F S N K N I L G R G G L G K V 220
ttacaagggtagacttgctgatggttcttagtggtgtaagcgactaaaggaggagcg 720
Y K G R L A D G S L V A V K R L K E E R 240
aacaccaggtggagagctgcagtttcaaacagaagttgagatgattagcatggcag 776
T P G G E L Q F Q T E V E M I S M A 258

```

Figura 2.10. Secuencia nucleotídica y secuencia deducida de aminoácidos de la clona que codifica una secuencia de SERK de *Coffea canephora*. Los aminoácidos subrayados corresponden al dominio transmembranal del receptor.

La secuencia fue comparada en el banco de secuencias EMBL. A continuación se muestran los datos de la comparación de la clona:

2.3.8 COMPARACIÓN DE LA SECUENCIA DEDUCIDA DE AMINOÁCIDOS DE LA CLONA DE *Coffea canephora* SERK EN LA BASES DE DATOS EMBL

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
gi 55859480 emb CAI10726.1 	somatic embryogenesis receptor-like	<u>412</u>	9e-114
gi 50657183 dbj BAD32780.1 	somatic embryogenesis receptor kinas	<u>394</u>	1e-108
gi 14573457 gb AAK68073.1 	somatic embryogenesis receptor-lik...	<u>385</u>	7e-106
gi 15218543 ref NP_174683.1 	SERK2 (SOMATIC EMBRYOGENESIS REC...	<u>385</u>	1e-105
gi 51458314 gb AAU03482.1 	somatic embryogenesis receptor-like k	<u>385</u>	1e-105
gi 24935326 gb AAN64294.1 	somatic embryogenesis receptor kin...	<u>380</u>	3e-104
gi 2224911 gb AAB61708.1 	somatic embryogenesis receptor-like	<u>369</u>	7e-101
gi 15217584 ref NP_177328.1 	SERK1 (SOMATIC EMBRYOGENESIS REC...	<u>369</u>	9e-101
gi 15081616 gb AAK82463.1 	Atlg71830/F14023_24 [Arabidopsis t...	<u>368</u>	1e-100
gi 50941595 ref XP_480325.1 	putative somatic embryogenesis r...	<u>347</u>	3e-94
gi 90891656 gb AAV58833.2 	somatic embryogenesis receptor kinase	<u>345</u>	8e-94
gi 52854318 gb AAU88198.1 	somatic embryogenesis protein kina...	<u>341</u>	2e-92

Como puede observarse, la clona tiene valores E por debajo de 10^{-20} , lo cual significa que esta clona contiene efectivamente una secuencia que codifica una cinasa tipo receptor que se expresa durante la embriogénesis somática de *C. canephora*.

Esta secuencia fue alineada con cuatro secuencias de otras plantas con las que SERK de *C. canephora* tienen mayor nivel de identidad. En la figura 2.11 se muestra el alineamiento, como se puede ver tienen un elevado grado de identidad. La secuencia fue registrada en la base de datos EMBL con el nombre CcSERK y con el código de acceso AJ863559.

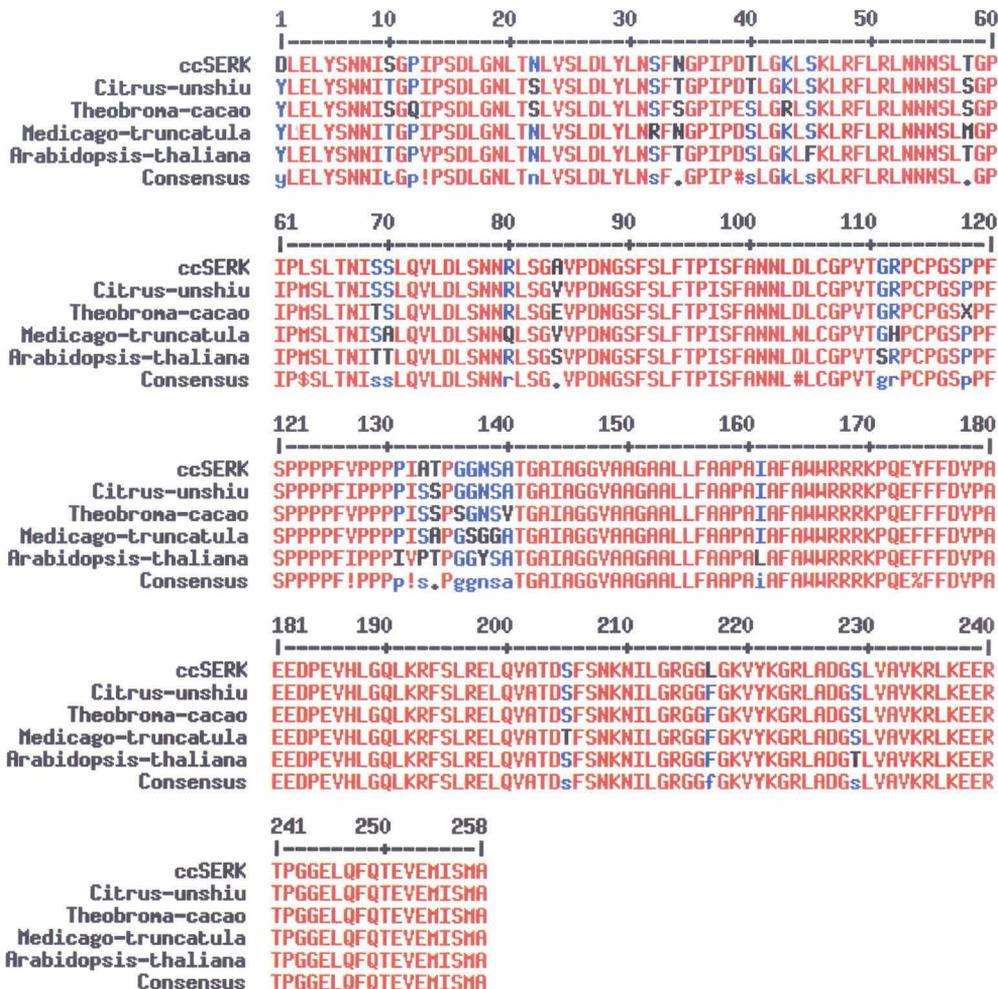


Figura 2.11. Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de la clona CcSERK de *C. canephora* con cuatro secuencias de SERK de otras plantas con las que tienen mayor nivel de identidad. Los números de accesoión de la clona es: CcSERK, AJ863559.

2.4 DISCUSIÓN

Con base en los resultados obtenidos, podemos decir que se logró clonar tres secuencias de MAPK y una secuencia de SERK de *C. canephora*. No sabemos si durante este modelo de diferenciación *in vitro* estén siendo expresadas solamente tres MAPKs de la familia, aunque no se conoce el número de genes que forman la familia de MAPKs en *C. canephora*, es muy probable que se encuentren mas de tres genes, ya que en otras especies sea encontrado que las familias de MAPKs estan formadas por numerosos genes. Por ejemplo en *A. thaliana* cuenta con una familia de 20 genes y en arroz hay 17 genes para MAPKs (Nathan *et al.*, 2006). Sin embargo, tendremos que esperar hasta realizar los análisis de expresión para determinar cuántos genes de MAPK y SERK se están expresando durante la inducción de la ES en *C. canephora*. Las secuencias de MAPK se podrán utilizarán para analizar las modificaciones de los respectivos niveles de expresión a lo largo del proceso embriogénico.

Si bien los genes de las MAPKs son constitutivos, pueden incrementarse los niveles de expresión durante diversos procesos como son: La división celular (Janak *et al.*, 1996), diferenciación y la percepción de fitoreguladores (Lu *et al.*, 2002). El incremento de la expresión transcripcional de uno o varios genes de MAPK durante la ES, incrementa la probabilidad de ser clonados en comparación de los genes de menor nivel de expresión, por lo cual los fragmentos clonados son candidatos en estar participando en la ES

La clona de SERK fue obtenida después de analizar varias clonas mandadas a secuenciar; de las seis que pudieron secuenciarse, todas ellas tenían la misma secuencia, aunque cuatro de ellas no estaban completas. Este resultado se apoya en el hecho de que en otras especies, aunque el genoma contenga más de un gen de SERK únicamente uno de ellos se expresa durante la ES (Nolan *et al.*, 2003; Thomas *et al.*, 2004; de Oliveira Santos *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2005). El gen SERK ha sido utilizado como marcador molecular para identificar y monitorear el proceso de la ES en células embriogénicas (Somleva *et al.*, 2000), por lo que la clona homóloga puede ser utilizada para determinar con mayor precisión cuál es el período en el que ocurre la diferenciación en los explantes de *C. canephora*. De esta manera se han generado las clonas homólogas para los análisis de expresión de los genes de MAPK y de SERK en la embriogénesis somática de café.

BIBLIOGRAFÍA

Chomczynski P. and N. Sacchi (1987) Single-Step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Bioch.* **162**: 156-159.

De jeong A.J., R. Heidstra, H.P. Spaink, M.V. Hartog, , E.A. Meijer, T. Hendriks, F. Lo Schiavo, M. Terzi, T. Biseling, A. Van Kammen and S.C. De Vries (1993) *Rhizobium* lipo-oligosaccharides rescue a carrot somatic embryogenesis mutant. *Plant Cell* **5**: 615-620.

De Oliveira Santos M., E. Romano, K.S. Clemente-Yotoko, M.L. Penha-Tinoco, B.B. Andrade-Dias and F.J. Lima-Aragão (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci.* **168**: 723-729.

Hecht V., J.P. Vielle-Calzada, M.V. Hartog, E.D. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus and S.C. de Vries (2001) The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol.* **127**: 803–816.

Hu H., L. Xiong and Y. Yang (2005) Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* **222**: 107–117.

Jonak C., S. Kiegerl, W. Ligterink, P.J. Baker, N.S. Huskisson and H. Hirt (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**: 11274-11279.

Lu. C, M.-H. Han†, A. Guevara-Garcia‡, and N. V. Fedoroff (2002) Mitogen activated protein kinase signaling in postgermination arrest of development by abscisic acid. *Plant biology* **29**: pp. 15812–15817.

Nathan S. Reyna and Yinong Yang (2006) Molecular Analysis of the Rice MAP Kinase Gene Family in Relation to *Magnaporthe grisea* Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: pp. 530–540.

Nolan K.E., R.R. Irwanto and R.J. Rose (2005) *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiol.* **133**: 218-230.

Passarinho P.A., A.J. Van Hengel, P.F. Fransz and S.C. de Vries (2000) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* *AtEP3/AtchitIV* endochitinase gene. *Planta* **212** : 556-567.

Quiroz-Figueroa, F.R., Monforte-González, M., Galaz-Avalos, R.M. and Loyola-Vargas, V.M. (2006) Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In: *Plant cell culture protocols*. (Loyola-Vargas, V.M. and Vázquez-Flota, F.A., eds.), pp. 111-117. Totowa, New Jersey: Humana Press.

Schmidt E.D.L., F. Guzzo, M.A.J. Toonen and S.C. de Vries (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Develop.* **124**: 2049-2062.

Showalter A. M. (2001) Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**: 1399-1417.

Somleva M.N., E.D.L. Schmidt and S.C. de Vries (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep.* **19**: 718-726.

Thomas C., D. Meyer, C. Himber. Steinmetz (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 35-42.

Yasuda T., Y. Fujii and T. Yamaguchi (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell, Physiol.* **26**: 595-597.

CAPÍTULO 3

Análisis de la expresión de los genes de SERK y de MAPKs y los niveles de activación de las MAPKs durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*

3.1 INTRODUCCIÓN

Para lograr la inducción de la ES en los explantes se requiere de condiciones específicas tanto de incubación como en la composición del medio de cultivo. Las células competentes deben interpretar fisiológicamente estas condiciones y responder expresando el proceso de la ES. Además de las señales presentes en el inicio del proceso, como son los cortes en el explante, la concentración de nutrientes y de fitorreguladores, el tejido secreta posteriormente una gran variedad de compuestos como polisacáridos, aminoácidos, reguladores de crecimiento, vitaminas y péptidos, entre otros (Chung *et al.*, 1992).

Las MAPKs de plantas tienen un papel muy importante en diversos aspectos del desarrollo (Wilson *et al.*, 1997) y la división celular (Banno *et al.*, 1993; Calderini *et al.*, 1998; Bögre *et al.*, 1999). También, participan en el reconocimiento de fitorreguladores del crecimiento, incluyendo las auxinas (Mizoguchi *et al.*, 1994), el ácido abscísico (Knetsch *et al.*, 1996), el ácido giberélico (Huttly *et al.*, 1995), el etileno (Kieber *et al.*, 1993; Chang, 1996), el ácido salicílico (Zhang & Klessig,

1997) y el ácido jasmónico (Seo *et al.*, 1995; Stratmann & Ryan, 1997). Por lo cual, las MAPKs pueden ser consideradas como candidatas para regular la diferenciación de células vegetales para formar embriones *in vitro*. Las cascadas de MAPKs, presentes en los organismos eucariontes, son activadas principalmente en el nivel postraduccional, aunque también se ha determinado que hay un incremento en la transcripción de genes que codifican para MAPKs en plantas que han sido sometidas a diversos tipos de estrés (Jonak *et al.*, 1996; Mizoguchi *et al.*, 1997; Seo *et al.*, 1995) o a tratamientos hormonales (Huttly & Phillips, 1995; Marcote & Carbonell, 2000).

El inicio de la ES se puede determinar a nivel molecular, mediante la detección de SERK (Schmidt *et al.*, 1997), lo cual nos permite realizar estudios bioquímicos y moleculares en etapas tempranas de la inducción, previo a la aparición de las estructuras embriogénicas. Debido a que una de las metas del presente trabajo es determinar los niveles de activación de las MAPK, antes y durante el proceso de la ES. Nosotros analizamos la expresión de SERK durante el proceso de la inducción de la ES, con la finalidad de poder determinar el inicio de la ES. El análisis histológico del proceso de ES en *C. arabica* por (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002) muestra que en la primera semana de inducción ya es posible detectar células embriogénicas.

En este trabajo empleamos el gen SERK para investigar cuál es la etapa en la que se da el disparo embriogénico, y comparar en esos tiempos los niveles de activación de las MAPK para determinar si estas proteínas se regulan durante este proceso.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

El modelo de ES es el que se describe en la sección de Materiales y Métodos del Capítulo 2.

El análisis de la expresión de los transcritos de los genes de SERK y de MAPK se hizo mediante RT-PCR con los reactivos comerciales “SuperScrip One-Step RT-PCR” (Invitrogen), empleando los cebadores D3 y R5 para el gen SERK y los cebadores PIG y MKIX para los genes de MAPK, la secuencia de ambos cebadores se detalla en la sección “Materiales y Métodos” del Capítulo 2. Los productos del RT-PCR a partir de 2 μg de ARN total se fragmentaron en geles nativos de agarosa y se tiñeron con 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Las concentraciones relativas de cada banda en el gel se cuantificaron por densitometría y se normalizaron con relación a la intensidad de bandas de ADNc de actina de *C. canephora*, obtenidas por RT-PCR en los mismos tiempos de la ES. Los cebadores empelados para la amplificación de ADNc de actina fueron los siguientes:

Directo AD: 5'-TTGGCAGATGCTGAGGATATTCAACC-3'

Reverso AR: 5'-CCATCATGAAGTGTGACGTTGATATC-3'

3.2.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

Los explantes fueron macerados (0.9 g por muestra) en nitrógeno líquido y se resuspendieron en 0.4 ml de amortiguador de extracción (HEPES-Tris 50 mM, EDTA 50 mM, EGTA 50 mM, β -glicerofosfato 50mM, ortovanadato de sodio 10 mM, fluoruro de sodio 10 mM, glicerol 10%, PMSF 1 mM, aprotinina $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, DTT 5 mM y leupeptina $1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$). Los extractos se centrifugaron a $22,000 \times g$ a 4°C por 30 min y el sobrenadante se almacenó a -80°C hasta su uso.

3.2.2 DETECCIÓN DE ACTIVIDADES DE MAPKS EN EXTRACTOS DE EXPLANTES INDUCIDOS A LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las determinaciones de los niveles de activación de las MAPK se efectuaron mediante el empleo de anticuerpos específicos contra MAPK activadas. Estos anticuerpos fueron generados por la empresa Santacruz Biotechnology® contra un dodecapéptido de ratón que contiene el motivo TEY bisfosforilado (pTEpY), y se ha aceptado que pueden sustituir al ensayo de cinasa en gel para la detección de MAPK activadas (Lee *et al.*, 2001). Los explantes provenientes de diferentes DIC se homogenizaron para la extracción de las proteínas. Cantidades iguales de proteína se fraccionaron en un gel desnaturalizante de poliacrilamida-SDS al 12%. Después de la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante la aplicación de corriente eléctrica. Una vez que las proteínas fueron transferidas, la membrana se bloqueó con leche descremada al 5% en amortiguador TBS-T durante 1 h. Posteriormente, la membrana se incubó por 2 h con

el anticuerpo anti-pTEpY diluido 1:5000. Al finalizar el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con amortiguador TBS-T por 15 min cada uno, y posteriormente se incubó por 2 h con el anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa) diluido 1:10,000. Al finalizar la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min. La actividad de peroxidasa acoplada al anticuerpo secundario se detectó mediante la oxidación de luminol en presencia de un agente catalizador (reactivos ECL de la compañía Amersham). La membrana fue expuesta por 30 min a una película autorradiográfica a 37°C. La película fue revelada manualmente con revelador y fijador convencionales de la compañía Kodak.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 APARICIÓN DE ESTRUCTURAS EMBRIOGÉNICAS EN DIFERENTES ETAPAS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *C. canephora*

En la figura 3.1 se muestra un experimento representativo de tres repeticiones, obteniéndose los mismos resultados. Puede observarse que la aparición de las primeras estructuras semejantes a embriones preglobulares ocurre en el lapso de los 10 a 15 DIC. Entre los 25 y los 30 días comienzan la aparición de los embriones globulares y disminuye el número de preglobulares. No se analizaron explantes más allá de estos tiempos ya que el estudio estaba enfocado al proceso de transición embriogénica.

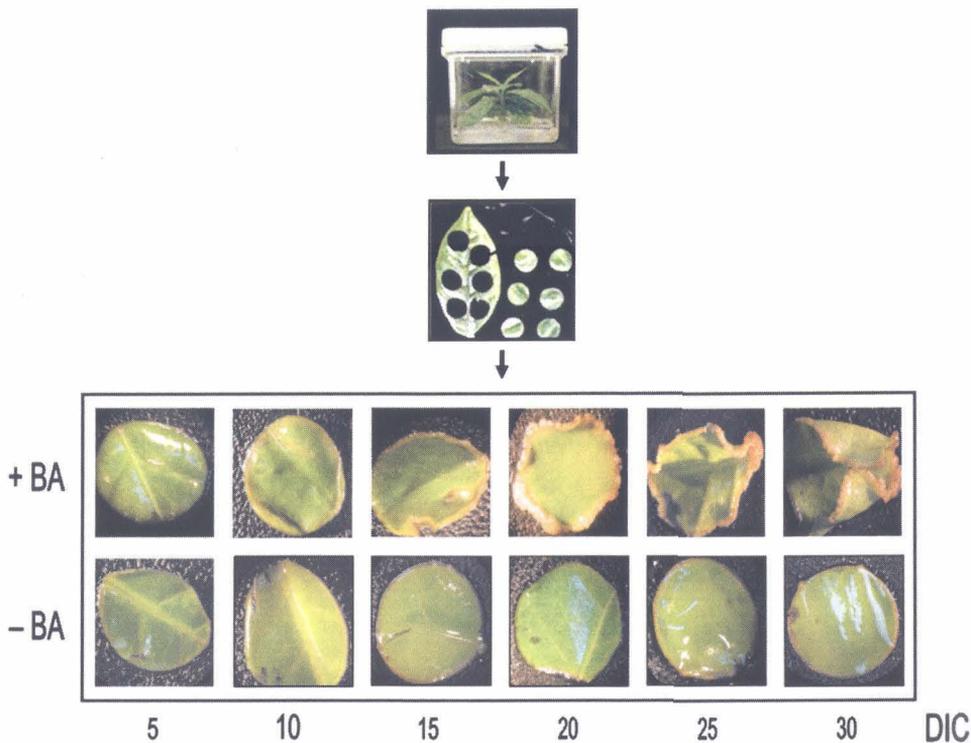


Figura 3.1. Proceso de embriogénesis somática en *C. canephora*. Los explantes obtenidos de plántulas adaptadas *in vitro* fueron incubados en presencia o en ausencia de reguladores del crecimiento por diferentes períodos de tiempo. BA: 5 μ M.

3.3.2 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE SERK EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *C. canephora*

En la figura 3.2 se muestran los resultados de un ensayo de RT-PCR utilizando cebadores del gen de SERK. No se detecta el transcrito al inicio del proceso, pero éste se comienza a acumular alrededor de 5 días después, la expresión aumentó a los 10 días y se mantuvo en un nivel constante hasta los 25 días. Para los 30 días disminuyó y casi

alcanza los niveles observados a los 5 días. Comparando los resultados mostrados en las figuras 3.1 y 3.2, puede observarse que los niveles de transcrito de SERK comienzan a acumularse antes de que se presenten las primeras estructuras embriogénicas (figura 3.1).

3.3.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES DE MAPK EN DIFERENTES ESTADIOS DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *C. canephora*

Aunque el principal nivel de regulación de las MAPK es postraducciona, existen reportes de modificación transcripcional por efecto de diversas señales de estrés (Jonak *et al.*, 1996). En este trabajo se decidió analizar si los niveles de transcrito de las MAPKs se modifica durante la ES. Para ello se utilizaron los cebadores PIG y MKIX que amplifican secuencias de MAPK, generando un fragmento de 551 pb. Como puede observarse en el panel intermedio de la figura 3.2, los niveles de transcrito de MAPK no se modifican notoriamente durante los diferentes estadios de la ES de *C. canephora*. Debe admitirse que con esta estrategia se detectan los niveles de todas las MAPK presentes en los explantes en conjunto.

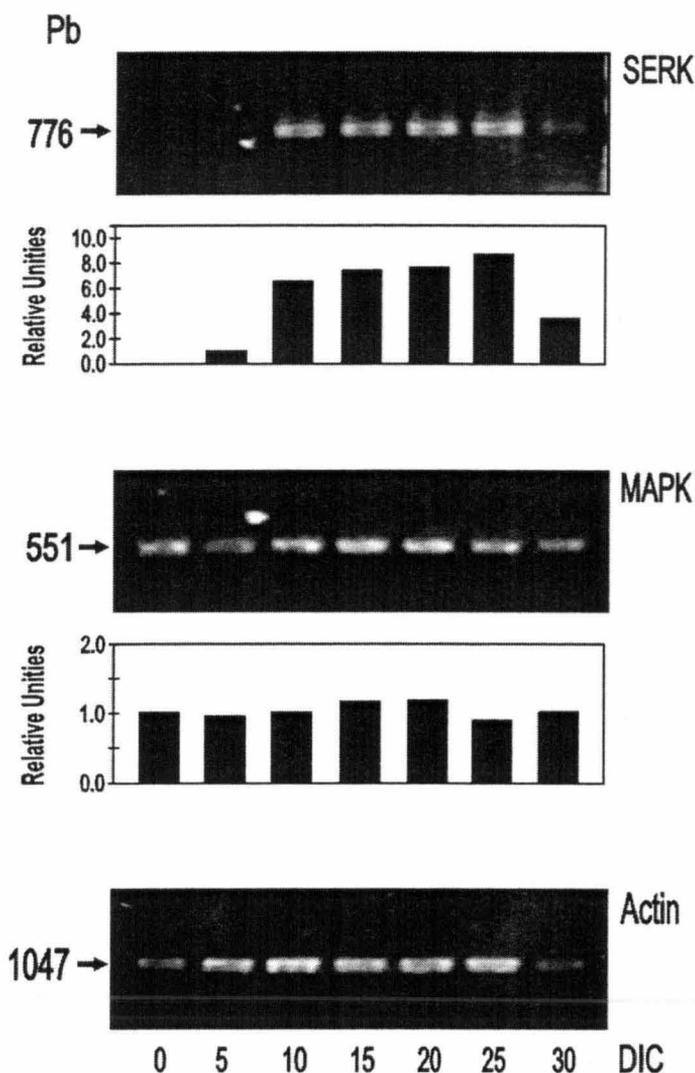


Figura 3.2. Productos de RT-PCR, empleando ARN total extraído de explantes con diferentes días de inducción. Carriles 1 a 7: productos obtenidos con ARN de 0, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 días en cultivo. A: amplificación de SERK con los cebadores D3 y R5; B: amplificación de MAPK con los cebadores PIG y MKIX; C: amplificación de actina con los cebadores AD y AR, la actina se empleó como control de carga de ARN.

3.3.4 INMUNODETECCIÓN DE MAPK BIFOSFORILADAS (ACTIVAS)

Los resultados de la evaluación del estado de fosforilación del motivo TEY, lo cual refleja los niveles de activación de las MAPK, se muestran en la figura 3.3. Como se puede observar en la figura 3.3, los anticuerpos dirigidos contra las MAPK activadas detectan una serie de proteínas con diferentes masas moleculares. De especial interés, pueden observarse proteínas de ~36, ~41 y ~48 kDa, respectivamente (marcadas con una cabeza de flecha en el panel superior de la figura 3.3. Se nota que la proteína de ~48 kDa es la que se detecta con mayor intensidad, y las otras proteínas se detectan menos, También pueden detectarse un par de proteínas de masas moleculares de aproximadamente 58 y 70 kDa, aunque con muy baja intensidad. Por otro lado se puede observar una clara disminución en la intensidad de la proteína de ~48 kDa.

El análisis de la modificación en la fosforilación de la proteína de ~48 kDa demuestra que tiene un valor basal cuando los explantes tienen cero días en cultivo, el cual aumenta a los cinco días, y tiene un valor máximo a los 10 días. Para los 20 días el nivel de fosforilación disminuye alcanzando los valores observados a los 5 días, manteniéndose así hasta los 30 días, mientras que en el carril correspondiente al día 15 los niveles de fosforilación disminuyen notoriamente con respecto a los demás días.

El panel inferior en la figura 3.3 muestra la membrana empleada para el inmunoblot teñida con rojo de Ponceau para verificar la cantidad de proteínas cargadas en cada gel. Puede observarse que

aproximadamente se cargó igual cantidad de proteína y puede verificarse que es muy poco probable que los cambios observados en los niveles de fosforilación de las diferentes proteínas sea el resultado de la utilización de diferentes cantidades de proteína total en cada carril.

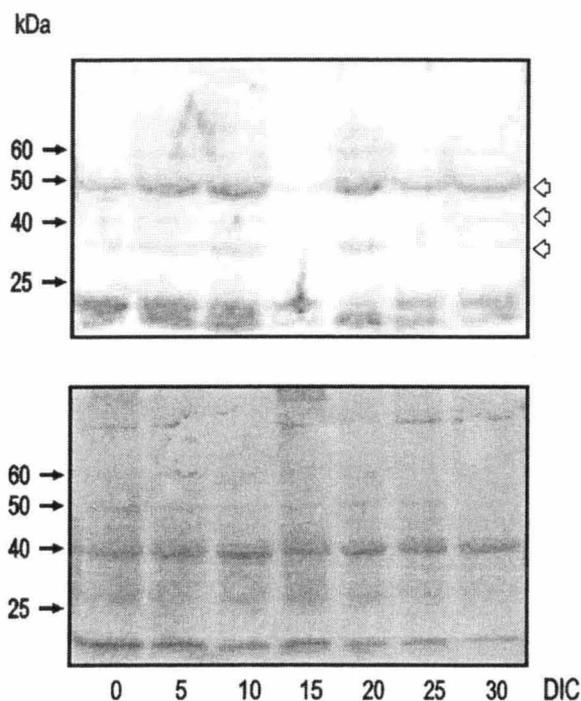


Figura 3.3. Inmunodetección de MAPK activadas en diferentes estadios de la ES de *C. canephora*. Proteínas totales de diferentes estadios del proceso de ES fueron fraccionadas por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida al 12%. Después de ser transferidas a una membrana de PVDF, la presencia de MAPK fosforiladas se realizó como se detalla en materiales y métodos. kDa: marcadores de masa molecular de proteínas (Bio-Rad); DIC: días en que los explantes estuvieron en el medio de inducción. Las cabezas de flecha indican potenciales MAPK. En el panel inferior se muestra la membrana empleada para el inmunoblot teñida con rojo de Ponceau para demostrar la cantidad de proteína cargada en cada carril.

3.4 DISCUSIÓN

En diferentes especies de plantas, la expresión del gen SERK se da con el inicio de la ES y disminuye o deja de expresarse antes de la fase globular; por ejemplo, en *D. carota* se detectan los transcritos de SERK hasta el estadio globular (Schmidt *et al.*, 1997). Aunque en otras especies existe la expresión de SERK en otras etapas del desarrollo, es muy probable que ésta corresponda a genes de la misma familia, pero que no estén relacionados con el inicio de la ES.

De acuerdo con los resultados encontrados en nuestro modelo, representados en la figura 3.1, las primeras estructuras embriogénicas aparecen entre los 10 y los 15 días en cultivo, mientras que los transcritos de SERK se empiezan a acumular desde los 5 días, aunque en niveles muy bajos, precediendo a la aparición de estructuras embriogénicas visibles, como ocurre en otras especies. La razón de que la expresión de SERK en *C. canephora* se mantenga hasta los 30 días cuando algunos embriones ya están inclusive en el estadio de torpedo, se puede deber a dos motivos: 1) la expresión de SERK en el proceso de embriogénesis somática de *C. canephora* se mantiene realmente hasta estadios de desarrollo avanzados, como ocurre en el *D. glomerata* o; 2) la inducción asincrónica de los embriones origina que haya un traslape de embriones en diferentes estadios del desarrollo embrionario. Por lo tanto los niveles de transcritos observados deben reflejar un promedio de los niveles de las poblaciones celulares, más que de células individuales.

De cualquier manera, el principal objetivo de investigar los niveles de expresión de este gen como marcador molecular de la ES consiste en determinar cuándo se presenta el inicio molecular de la ES. Con base en eso, podemos decir que es antes de los 5 días cuando se establece el compromiso de las células embriogénicas para iniciar la diferenciación. En este período nos concentraremos entonces para analizar tanto los niveles de expresión como las modificaciones en la activación de las MAPK en el proceso. Es decir, nosotros analizamos la expresión transcripcional y postranscripcional de MAPK antes y después del inicio en la acumulación del transcrito del gen SERK.

La siguiente pregunta es si las enzimas se modifican en el nivel postraducciona; es decir, si la ruta de las MAPK estuviera involucrada en la señalización del proceso embriogénico, debería fosforilarse necesariamente en el motivo TEY, lo que se revisará mas adelante .

El análisis de los niveles de ARNm medidos por medio de RT-PCR reveló que los transcritos de MAPKs se mantuvieron presentes durante el proceso de inducción. Sin embargo, el principal nivel de regulación de la vía de transducción de señales constituida por las MAPK es postraducciona, mediante la fosforilación de dos residuos presentes en el dominio de activación (Ferrel & Bhatt, 1997), La fosforilación por las cinasas de las MAPK en los aminoácidos treonina y tirosina en el motivo TEY promueve un cambio conformacional que expone el sitio catalítico (Canagarajah *et al.*, 1997). Una vez activadas, las MAPK son traslocadas al núcleo en donde pueden fosforilar factores de

transcripción alterando la expresión génica (Adachi *et al.*, 1999; Whitehurst *et al.*, 2002).

Debido a lo anterior, nosotros analizamos los cambios en los niveles de fosforilación del dominio TEY de proteínas presentes en extractos proteicos obtenidos de diferentes estadios de la ES, como un parámetro de la activación de las MAPK a lo largo del proceso. La metodología se basó en el uso de anticuerpos específicos dirigidos contra un dodecapéptido sintético con la secuencia de MAPK de ratón en estado bisfosforilado (PROMEGA, comunicación personal). Un análisis de las secuencias de ADNc de las diferentes MAPK expresadas durante los primeros estadios de la ES de café, nos permite verificar que las secuencias deducidas de aminoácidos de cada una de ellas contiene prácticamente el mismo motivo utilizado para generar los anticuerpos (datos confidenciales de PROMEGA), por lo que si es posible esperar reacciones positivas de los anticuerpos con los extractos proteicos de la ES de café.

Los resultados obtenidos del inmunoblot muestran que al menos una MAPK de ~48 kDa tiene un ligero incremento en sus niveles de fosforilación en el motivo TEY los 5 y los 10 días en cultivo. Esto coincide con los tiempos en los cuales se detecta un incremento en la acumulación de transcritos del gen SERK de café. Esta coincidencia no significa necesariamente que la activación de las MAPKs sea resultado directo de la expresión del gen SERK, aunque si permite suponer esa posibilidad. Por otro lado la ausencia de MAPKs bifosforilas en el día 15 sugiere que los procesos correspondientes a

este estadio están regulados por la inactivación de las MAPK. Si bien la mayor parte de los reportes sobre las MAPKs muestran incremento en la actividad, existen algunos reportes sobre su inactivación, por ejemplo durante la germinación de la cebada es inactivada una MAPK de 45 kDa (Testerink *et al.*, 2000). Cabe la posibilidad que en el proceso de la ES, se inactive un o varias MAPKs al inicio que estén relacionadas con eventos como la organogénesis, de esta forma inhibirla y favorecer otras vías como la ES. El inicio de la ES y la organogénesis comparten eventos moleculares, como la expresión del gen SERK, el cual en ambas vías se expresa, con la diferencia de que la expresión se mantiene durante la inducción a la ES, mientras que en el medio de inducción a la organogénesis disminuye (Thomas *et al.*, 2004), lo cual se puede deber a una falta de mecanismos activos de traducción de señales, como son las MAPKs las cual se pueden inactivar, como ocurre durante la germinación de la cebada, en la cual es inactivada una MAPK como consecuencia de la hidratación(Testerink *et al.*, 2000).

BIBLIOGRAFÍA

Adachi M., M. Fukuda and E. Nishida (1999) Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive difusión of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO J.* **18**: 5347-5358.

Banno H., K. Hirano, T. Nakamura, K. Irie, S. Nomoto, K. Matsumoto, and Y. Machida (1993) NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11 and Byr2 protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 4745-4752.

Canagarajah B.J., A. Khokhlatchev, M.H. Cobb and and E.J. Goldsmith (1997) Activation mechanism of the MAP Kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* **90**: 859–869.

Bögre L., O. Calderini, P. Binarova, M. Matauch, S. Hill, S. Kiegerl, C. Jonak, C. Pollaschek, P. Barker, N.S. Huskisson, H. Hirt, and E. Heberle-Bors (1999) A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* **11**: 101-114.

Calderini O., L. Borgel, O. Vicente, P. Binarova, E. Heberle-Bors, and C. Wilson (1998) A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* **111**: 3091-3100.

Chang C., S.F. Kwok, A.B. Bleecker and E.M. Meyerowitz (1993) Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of products to two-component regulators. *Science* **262**: 539-544.

Chung W., H. Pedersen and C.-K. Chin (1992) Enhanced somatic embryo production by conditioned media in cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Biotechnol. Lett.* **14**: 837-840.

Ferrell J.E. Jr. and R.R. Bhatt (1997) Mechanistic Studies of the Dual Phosphorylation of Mitogen-activated Protein Kinase. *J. Biol. Chem.* **272**: 19008–19016.

Huttly A. K. and A. L. Phillips (1995) Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cell of two kinases that show homology to MAP kinases and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* **27**: 1043-1052.

Jonak C., S. Kiegerl, W. Ligterink, P.J. Baker, N.S. Huskisson and H. Hirt (1996) Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **93**: 11274-11279.

Lee J., D.F. Klessig and T. Nürnberger (2001) A harpin binding site in tobacco plasma membranes mediates activation of the pathogenesis-related gene HIN1 independent of extracellular calcium but dependent on mitogen-activated protein kinase activity. *Plant Cell* **13**: 1079–1093.

Kieber J.J., M. Rothenberg, G. Roman, K.A. Feldmann and J.R. Ecker (1993) CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis thaliana*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* **72**: 427-441.

Knetsch L.W.M., M. Wang, E. Snaar-Jagalska and S. Heimovaara-Dijkstra (1996) Abscisic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in Barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* **8**: 1061-1067.

Marcote M.J. and J. Carbonell (2000) Transient expression of a pea MAP kinase gene induced by gibberellic acid and 6-benzyladenine in unpollinated pea ovarios. *Plant Mol. Biol.* **44**: 177–186.

Mizoguchi T., Y. Gotoh, E. Nishida, N. Yamaguchi-Shinozaki, T. Iwasaki, H. Kamada, and K. Shinozaki (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cell. *Plant J.* **5**: 111-122.

Mizoguchi T., K. Ichimura and K. Shinozaki (1997) Environmental stress response in plants: the role of mitogen-activated protein kinases, *Trends Biotechnol.* **15**: 15–19.

Quiroz-Figueroa F.R., C.F.J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera and V.M. Loyola-Vargas (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* **20**: 1141–1149.

Schmidt E.D.L., F. Guzzo, M.A.J. Toonen and S.C. de Vries (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell competent to form embryos. *Develop.* **124**: 2049-2062.

Seo S., M. Okamoto, H. Seto, K. Ishizuka, H. Sano and Y. Ohashi (1995) Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathway. *Science* **270**: 213-216.

Stratmann J.W. and C.A. Ryan (1997) Myelin basic protein-kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 11085-11089.

Testerink Christa, Marco Vennika, Jan W. Kijneb, Mei Wanga, Sjoukje Heimovaara-Dijkstra (2000) Inactivation of a MAPK-like protein kinase and activation of a MBP kinase in germinating barley embryos. *FEBS Letters* **484**: 55-59.

Thomas C., D. Meyer, C. Himber and A. Steinmetz (2004) Spatial expression of a sunflower SERK gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiol. Biochem.* **42**: 35-42.

Whitehurst A.W., J.L. Wilsbacher, Y. You, K. Luby-Phelps, M.S. Moore and M.H. Cobb (2002) ERK2 enters the nucleus by a carrier independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 7496–7501.

Wilson C., V. Voronig, A. Touraer, O. Vicente and E. Heberle-Bors (1997) A developmentally regulated MAP Kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* **9**: 2093-2100.

Zhang S. and D.F. Klessig (1997) Salicylic acid activates a 48-kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* **9**: 809-824.

CAPÍTULO 4

Discusión general

La ES es el proceso biológico mediante el cual una célula somática se diferencia para iniciar un desarrollo embrionario, generando potencialmente una planta nueva con la misma composición genética de la planta “madre”; es decir, genera una clona de ella (Feher *et al.*, 2003). En este proceso no está involucrada la fusión de gametos, ni siquiera la participación de ellos (Sharp *et al.*, 1980; Williams & Maheswaran, 1986).

La ES comparte muchas características con la embriogénesis cigótica y por ello se ha utilizado para estudiar y entender los mecanismos que regulan tanto el inicio como el desarrollo de la embriogénesis cigótica (Zimmerman, 1993). Así, se ha encontrado que sólo un grupo particular de células presentes en un tejido o en un explante pueden desarrollar la ES, es decir, tienen potencial embriogénico (Schmidt *et al.*, 1997). Se ha encontrado también que el inicio de la ES requiere de la presencia de un factor externo, el cual ha sido caracterizado como un elemento de estrés ambiental, nutricional o regulatorio que causa una acumulación intracelular de auxinas (Pasternak *et al.*, 2002).

Se sabe que la célula embriogénica requiere de la presencia de una célula nodriza de la cual son generadas una serie de señales que en muchos casos han sido identificadas como arabinogalacto proteínas (Toonen *et al.*, 1997). Estas proteínas pueden ser degradadas por enzimas hidrolíticas como las quitinasas (Passarinho *et al.*, 2001),

generando polisacáridos complejos y proteínas modificadas que pueden ser reconocidas por las células embriogénicas. Se ha descrito también la dependencia que tiene el proceso embriogénico de estos productos génicos y de los compuestos que generan.

Por otro lado, se ha descubierto que en las células embriogénicas ocurre una serie de cambios anatómicos, como la aparición de un citoplasma denso, un incremento en el número de vacuolas pequeñas, una expresión más alta de receptores de calcio en la membrana citosólica y en general un flujo de iones más acelerado. También se ha demostrado que en muchos sistemas existe la inducción de una cinasa que parece ser un receptor celular, específico de la embriogénesis, cuyo gen se ha nombrado SERK por sus siglas en inglés (Somatic Embriogénesis Receptor-like Kinase). A diferencia de otras moléculas que se expresan en estadios tempranos del proceso embriogénico como las quitinasas o las arabinogalacto proteínas, el gen SERK parece ser específico del proceso embriogénico (Schmidt *et al.*, 1997); no obstante que en diferentes especies los genes SERK están agrupados en familias relacionadas (de Oliveira *et al.*, 2005), es probable que el que se expresa en la ES efectivamente sea específico de este proceso. Es por ello que en la actualidad el gen SERK es considerado como el marcador de ES más estricto que se conoce.

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han dedicado para conocer los mecanismos que regulan el establecimiento de la ES, no se conoce cuál es la señal embriogénica ni dónde se genera, tampoco se sabe cuáles son los mecanismos de transducción de señales que

conducen al establecimiento de la diferenciación en las células con potencial embriogénico, por ello, en este trabajo nos propusimos investigar cuáles son los niveles de activación de las MAPK durante la ES de *C. canephora*, para poder decidir si estas enzimas pueden ser consideradas como los candidatos responsables de la transducción de las señales embriogénicas.

En este trabajo se generaron las sondas moleculares que permitieron investigar cuándo ocurre la transición embriogénica en el modelo de estudio, mediante el análisis de la expresión del gen SERK de café. De esta manera, al analizar los niveles de expresión de los genes de MAPK y los niveles de activación de sus productos génicos pudimos comparar si los cambios respectivos ocurrían antes, después o durante la transición entre el estadio somático y el estadio embriogénico de las células en los explantes.

En nuestro modelo de estudio los explantes de hoja de plántulas acondicionadas de *C. canephora* son colocados en un medio de inducción embriogénica (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). Aunque las poblaciones celulares son asincrónicas, pudimos observar que las primeras estructuras embriogénicas aparecen entre los 10 y los 15 DIC. Esto significa que las células con potencial embriogénico deberían diferenciarse antes de estos períodos. Para estadios entre los 20 y los 25 DIC comienzan a desarrollarse estructuras tipo torpedo, las cuales ya son mayoritarias entre los 25 y los 30 DIC.

Cuando analizamos la expresión de SERK, vimos que ya desde los 5 DIC puede comenzar a acumularse y el hecho de que para los 10 DIC

ya se tenga el nivel más alto de expresión (el mismo que al parecer se mantiene hasta los 20 DIC) significa que efectivamente las células competentes se diferencian alrededor de los 5 días, para posteriormente desarrollarse y generar embriones preglobulares a partir de los 10 DIC.

Cuando revisamos los niveles de expresión de las MAPK totales, vimos que la cantidad de transcritos a lo largo de los primeros 30 días en cultivo (DIC) no presentó variación. Tomándolo como ejemplo, considerando que en otros sistemas las MAPK no presentan una regulación importante en el nivel transcripcional (Mizoguchi *et al.*, 1994) y admitiendo que se requiere del análisis de las clonas individuales, significaría que en el modelo de ES de café no existe una regulación transcripcional de los genes de MAPK, al menos en los tiempos estudiados. Pero cuando medimos los niveles de activación de las MAPK totales, descubrimos que para algunas de ellas sí existe una modificación en su activación que se manifiesta entre los 5 y los 15 DIC.

Estos resultados permiten corroborar nuestra hipótesis de que si las MAPK están involucradas en la transducción de la señal embriogénica en café, deberían activarse en tiempos coincidentes con la transición embriogénica, como sucedió efectivamente.

Sin embargo, debemos ser muy cautelosos pues con estos resultados no podemos afirmar que las MAPK sean las responsables del establecimiento del proceso, lo que sí podemos decir es que al cumplirse la hipótesis, podemos ahora postularlas como fuertes candidatos para participar en la intermediación entre la percepción de la

señal embriogénica y la alteración de la expresión génica que conduce al establecimiento de la ES en *C. canephora*, lo que no hubiésemos podido hacer en el caso de que la hipótesis no hubiera sido comprobada.

BIBLIOGRAFÍA

De Oliveira Santos M., E. Romano, K.S. Clemente-Yotoko, M.L. Penha-Tinoco, B.B. Andrade-Dias and F.J. Lima-Aragão (2005) Characterisation of the cacao somatic embryogenesis receptor-like kinase (SERK) gene expressed during somatic embryogenesis. *Plant Sci.* **168**: 723-729.

Feher A., T.P. Pasternak and D. Dudits (2003) Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tiss. Org. Cul.* **74**: 201–228.

Mizoguchi T., Y. Gotoh, E. Nishida, N. Yamaguchi-Shinozaki, T. Iwasaki, H. Kamada and K. Shinozaki (1994) Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* **5**: 111-122.

Passarinho. Paul A , Arjon J. Van Hengel , Paul F. Fransz , Sacco C. de Vries (2001) Expression pattern of the *Arabidopsis thaliana* AtEP3/AtchitIV endochitinase gene. *Planta.* **212**: 556 – 567.

Pasternak T., E. Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potters, H. Asard , H. Van Onckelen, D. Dudits and A. Feher (2002) The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* **129**: 1807–1819.

Quiroz-Figueroa, F.R., Monforte-González, M., Galaz-Avalos, R.M. and Loyola-Vargas, V.M. (2006) Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In: *Plant cell culture protocols*. (Loyola-Vargas, V.M. and Vázquez-Flota, F.A., eds.), pp. 111-117. Totowa, New Jersey: Humana Press.

Schmidt E.D.L., F. Guzzo, M.A.J. Toonen and S.C. de Vries (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cell competent to form embryos. *Develop.* **124**: 2049-2062.

Sharp W.R., M.R. Sondhal, L.S. Caldas and G.B. Maraffa (1980) The physiological of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.* **2**: 268-310.

Toonen M.A.J., T. Hendriks, E.D.L. Schmidt, H.A. Verhoeven, A. van Kammen and S.C. de Vries (1994) Description of somatic-embryo forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta* **194**: 565–572.

Williams E.G. and G. Maheswaran (1986) Somatic Embryogenesis: Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cells as an Embryogenic Group. *Ann. Bot.* **57**: 443-462.

Zimmerman J.L. (1993) Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell* **5**: 1411-1423.

CAPÍTULO 5

Perspectivas

La comprobación experimental de que en extractos proteicos de explantes de *Coffea canephora*, algunas MAPK se activan en los mismos tiempos en los que se induce la expresión de un marcador molecular del inicio de la embriogénesis somática, permite proponer algunos experimentos para corroborar si efectivamente estas enzimas tienen un papel en la señalización que coincidentes con el establecimiento del proceso.

Primero, nuestras evidencias indican que alrededor de los 5 días en cultivo de inducción es cuando se inicia la expresión del gen SERK; sin embargo, en nuestro trabajo estudiamos períodos cada 5 días. Ahora pueden realizarse experimentos en los que se estudien períodos más cortos, por ejemplo de 1 día, para determinar con más exactitud cuándo se inicia la diferenciación en las células con potencial embriogénico.

Segundo, al trabajar con extractos proteicos del explante completo, diluimos las proteínas de las células embriogénicas; es probable que esta sea una de las razones por las que se detectan varias bandas mediante el uso de los anticuerpos anti-MAPK activadas. Para incrementar la especificidad de la determinación se puede realizar la determinación tanto de la expresión de SERK como de las MAPK en cortes histológicos mediante técnicas como la hibridación *in situ* o la PCR *in situ*.

Tercero, para demostrar que estas enzimas participan en la regulación de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*, la inhibición de su actividad o de la expresión de los genes deberá inhibir el establecimiento y/o el desarrollo del proceso; para ello, se pueden hacer dos tipos de experimentos:

Pueden inhibirse las actividades de las MAPK mediante el uso de inhibidores específicos adicionados en diferentes etapas del proceso y estudiar sus efectos sobre el establecimiento y el desarrollo del proceso.

Con la información obtenida en el presente trabajo, pueden hacerse experimentos para bloquear la expresión de los genes de MAPK y del gen SERK. Esto puede hacerse mediante RNA de interferencia o mediante la transformación temporal de los explantes de cafeto con ADN complementarios que codifiquen proteínas mutadas en la actividad catalítica, por ejemplo en la lisina esencial para la actividad de todas las proteínas cinasas.

Cuarto, con las secuencias de los fragmentos de ADN complementario, tanto del gen SERK como de los genes de MAPK se puede intentar la clonación de los correspondientes marcos de lectura completos, con lo que podría determinarse la existencia de motivos conservados dentro de los ORFs o de secuencias regulatorias en las secuencias 5' y 3' no traducibles.

Quinto, con las secuencias parciales de ADN complementario clonadas, se pueden identificar regiones antigénicas para la obtención de anticuerpos para evaluar la síntesis y la activación de las correspondientes enzimas a lo largo del proceso de ES. Lo mismo

puede intentarse con la secuencia completa de los ADN complementarios, pero además esto permitiría sintetizar la proteína *in vitro* y utilizarla en esquemas de inmunización para la generación de anticuerpos policlonales.

Finalmente, nuestro hallazgo de que es alrededor de los 5 días en cultivo de inducción cuando ocurre la regulación para que las células con potencial embriogénico puedan diferenciarse, permite planificar experimentos para determinar los eventos regulatorios que ocurren antes y después de que esas células han iniciado la diferenciación en un camino de no retorno.