



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis del transporte del ácido-3-indol acético
durante la embriogénesis somática en *Coffea
canephora***

Tesis que presenta

Ruth Esperanza Márquez López

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2016

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Ruth Esperanza Márquez López titulado Análisis del transporte del ácido-3-indol acético durante la embriogénesis somática en *Coffea canephora* fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en la línea Morfogénesis y Regulación génica, en el laboratorio N°24 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 01 de agosto del 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

Ruth Esperanza Márquez López

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y forma parte del proyecto titulado Determinación de la función de la interacción entre auxinas y citocininas en la inducción de la embriogénesis somática bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y con financiamiento del CONACyT, número 257436.

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a mi director de tesis, el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por haber depositado su confianza en mí y dejarme ser miembro de su grupo de investigación, por lo consejos que me ha brindado y todos los conocimientos adquiridos durante este tiempo que tuve la oportunidad de trabajar en su laboratorio.

Agradezco a la M. en C. Rosa María Galáz Ávalos por su apoyo técnico y haberme enseñado parte importante del trabajo del laboratorio.

Quiero agradecer a los miembros de mi comité tutorial el Dr. Enrique Castaño de la Serna, Dr. Stefan De Folter y Dr. Felipe Vásquez Flota por sus aportes y sugerencias que contribuyeron al desarrollo de esta tesis.

Agradezco a la M. en C. Ángela Kú González por su apoyo técnico en el manejo del microscopio confocal.

Agradezco al Dr. Geovanny Nic Can por haber compartido su experiencia y enseñarme técnicas desarrolladas durante el presente trabajo.

Agradezco a mis amigos y compañeros del laboratorio 24, por su compañía y amistad, haciendo más amena mi estancia en el laboratorio.

Agradezco al CONACYT por la beca (N°496176) otorgada durante la realización de esta tesis, así también por el financiamiento otorgado para este proyecto (N° 257436).

A todas las personas que de uno u otro modo colaboraron con la realización de este trabajo muchas gracias.

DEDICATORIAS

La presente tesis está dedicada a ti mi Dios que me diste la oportunidad de vivir, por guiarme y regalarme una familia maravillosa.

Con mucho cariño y amor a mi familia, de la cual me siento muy orgullosa, ya que gracias a su esfuerzo y dedicación hemos podido salir adelante a pesar de las dificultades que la vida nos ha impuesto.

A mis padres Irma y Daniel por haberme dado la mejor educación tanto académica, como de la vida, haciendo de mí la persona que soy, porque a pesar de la distancia, siempre me han brindado su apoyo y consejos para ser de mí una mejor persona, por cada uno de los sacrificios que hicieron por mí. Espero seguir cosechando logros los cuales siempre estarán dedicados a ustedes, los admiro y quiero mucho.

A mi hermana Paola por ser mi amiga y compartir momentos inolvidables, por su apoyo y toda la alegría que me ha brindado.

A mis abuelos Martha (QEPD), Félix, (QEPD) Esperanza (QEPD) y Florencio, porque después de mis padres fueron las personas que más se preocupaban por mí y formaron parte importante de mi niñez, brindándome siempre su cariño y consejos.

A mí esposo Caleb Juárez Reyes, por el gran ser humano que es, por todo su amor, por ser mi mejor amigo, compañero de vida y en ocasiones de laboratorio. Por su incondicional apoyo en todo momento ¡Es un gran logro para ambos!

A mis suegros Agustina y Vicente, por su apoyo y cariño, por recibirme en su casa como a una hija. A mis cuñados Esaú, Jehú, Eli, Eunice, Jobet, Abner, Karen y Andrea. Me siento afortunada de ser parte de su familia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL.....	3
1.2 FACTORES QUE REGULAN LA HOMEOSTASIS DEL AIA.....	6
1.2.1 BIOSÍNTESIS	6
1.2.2 ALMACENAMIENTO Y DEGRADACIÓN.....	8
1.2.3 TRANSPORTE	10
1.2.3.1 TRANSPORTADORES PIN.....	11
1.2.3.2 TRANSPORTADORES ABCB	14
1.3 PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN.....	14
1.4 TRANSPORTE DE AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS	17
1.5 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA COMO MODELO DE ESTUDIO.....	19
1.6 AUXINAS EN EL PROCESO DE INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	22
1.7 INMUNOLOCALIZACIÓN DE AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	23
1.9 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO <i>COFFEA</i>	27
1.10 JUSTIFICACIÓN.....	29
1.11 OBJETIVO GENERAL	29
1.11.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
1.12 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	29
1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	29
CAPÍTULO II.....	31
ANÁLISIS DEL TRANSPORTE DEL ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO DURANTE LA	

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>C. CANEPHORA</i>	31
2.1 INTRODUCCIÓN	31
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	33
2.2.2.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	33
2.2.3 FIJACIÓN E INCLUSIÓN DE LA MUESTRA.....	34
2.2.4 TINCIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LOS ANÁLISIS HISTOLÓGICOS	35
2.2.5 INMUNOLOCALIZACIÓN DEL ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO	36
2.2.6 INMUNOLOCALIZACIÓN DEL TRANSPORTADOR PIN1	36
2.3 RESULTADOS	37
2.3.1 INDUCCIÓN Y DESARROLLO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>C. CANEPHORA</i>	37
2.3.2 INMUNOLOCALIZACIÓN DEL ÁCIDO 3-INDOL ACÉTICO DURANTE EL PERIODO DE PREACONDICIONAMIENTO EN EXPLANTES FOLIARES DE <i>C. CANEPHORA</i>	40
2.3.2 INMUNOLOCALIZACIÓN DEL ÁCIDO 3-INDOL ACÉTICO EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>C. CANEPHORA</i>	49
2.3.1 INMUNOLOCALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA PIN EN EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>C. CANEPHORA</i>	56
2.4 DISCUSIÓN.....	61
CAPÍTULO III.....	66
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	66
3.1 CONCLUSIONES	66
3.2. PERSPECTIVAS	66
ANEXOS.....	68

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Estructura de los reguladores del crecimiento vegetal.....	4
Figura 1.2 Auxinas naturales AIA = ácido-3-indol acético; AIB = ácido 3-indol-butírico; 4-Cl-AIA = ácido 4-cloroindol acético; AFA = ácido fenilacético.	5
Figura 1.3 Moléculas similares a las auxinas naturales.....	5
Figura 1.4 Esquema general de los factores involucrados en la homeostasis del AIA.....	6
Figura 1.5 Modelo de las rutas de biosíntesis del AIA dependientes e independientes de Trp.....	7
Figura 1.6 Principales formas de almacenamiento y degradación del AIA..	9
Figura 1.7 El porcentaje de la forma aniónica y protonada del AIA se da en función del pH en los rangos de pH apoplástico y citosólico.....	10
Figura 1.8 Proteínas que regulan el flujo de auxina intracelular y de célula-célula..	11
Figura 1.9 Procesos mediados por el transporte polar de auxina en <i>A. thaliana</i>	12
Figura 1.10 Estructura de las proteínas PIN.....	13
Figura 1.11 Funciones de las proteínas ABCB y PIN en el transporte de auxina..	14
Figura 1.12 Componentes clave en la percepción y señalización del AIA..	16
Figura 1.13 Localización de las proteínas PIN 1 y PIN 7 en los estadios de proembrión (2 células) y embrión globular de <i>A. thaliana</i>	17
Figura 1.14 Localización de Proteína verde fluorescente (GFP) en respuesta a auxina a través del promotor <i>DR5rev</i> en embriones cigóticos de <i>A. thaliana</i>	17
Figura 1.15 Transportadores y gradientes de auxina durante la embriogénesis cigótica..	19

Figura 1.16 Tipos de embriogénesis somática..	21
Figura 1.17 Inmunolocalización del AIA al inicio de la ES a partir de microesporas y embriones cigóticos inmaduros de <i>Q. suber</i>	24
Figura 1.18 Inmunolocalización de AIA durante etapas tempranas de embriogénesis a partir de microesporas de <i>B. napus</i>	25
Figura 1.19 Inmunolocalización de AIA y expresión de <i>PaPin1</i> en embriones somáticos de <i>P. abies</i>	26
Figura 1.20 Sistema de embriogénesis directa en <i>C. canephora</i>	28
Figura 1.21 Estrategia experimental para determinar la dinámica de la distribución de auxina durante la embriogénesis somática en <i>C. canephora</i>	30
Figura 2.1 Plántula de <i>C. canephora</i> en medio Murashige y Skoog.....	33
Figura 2.2 Explantes de <i>C. canephora</i> en medio de inducción Yasuda con 5 μ M de benciladenina.....	34
Figura 2.3 Inducción de la embriogénesis somática en explantes de <i>C. canephora</i>	38
Figura 2.4 Principales estadios de desarrollo de embriones somáticos de <i>C. canephora</i>	39
Figura 2.5 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de <i>C. canephora</i> durante el día -14 del periodo de pre-acondicionamiento..	42
Figura 2.6 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de <i>C. canephora</i> durante día -7 del periodo de pre-acondicionamiento.	43
Figura 2.7 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de <i>C. canephora</i> día -4 del periodo de pre-acondicionamiento.....	44
Figura 2.8 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de <i>C. canephora</i> día cero de la etapa de pre-acondicionamiento.....	45
Figura 2.9 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de <i>C. canephora</i> 7 días	

después de la inducción de la ES en un medio libre de auxina.....	46
Figura 2.10 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de <i>C. canephora</i> 14 días después de la inducción de la ES en un medio libre de auxina.....	47
Figura 2.11 Inmunolocalización de AIA en explantes foliares de <i>C. canephora</i> 21 días después de la inducción de la ES en un medio libre de auxina.....	48
Figura 2.12 Inmunolocalización del AIA en embriones pre-globulares de <i>C. canephora</i> ..	51
Figura 2.13 Localización del AIA en embrión somático de <i>C. canephora</i> en estadio globular tardío..	52
Figura 2.14 Localización del AIA y DAPI en embrión somático estadio corazón de <i>C. canephora</i>	53
Figura 2.15 Localización del AIA y DAPI en embrión somático estadio transición corazón-cotiledonar de <i>C. canephora</i> ..	54
Figura 2.16 Localización del AIA y BC que tiñe la pared celular en embrión somático estadio cotiledonar de <i>C. canephora</i>	55
Figura 2.17 Localización del transportador PIN1 en pro-embriones de <i>C. canephora</i>	57
Figura 2.18 Localización del transportador PIN 1 en embrión somático en el estadio globular de <i>C. canephora</i> ..	58
Figura 2.19 Localización del transportador PIN 1 en un embrión somático en el estadio de corazón.....	59
Figura 2.20 Localización del transportador PIN 1 en embriones somáticos en el estadio cotiledonar..	60

ABREVIATURAS

2,4 D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
AIA	Ácido indol-3-acético
AIA-Ala	Ácido indol-3-acético-alanina
AIA-Asp	Ácido indol-3-acético-ácido aspártico
AIA-Glu	Ácido indol-3-acético-ácido glutámico
AIA-Leu	Ácido indol-3-acético-leucina
4-Cl-AIA	Ácido 4-cloroindol acético
AFA	Ácido fenilacético
ARF	Factores de transcripción de respuesta a auxina
ABP	Proteínas de unión a auxina
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIP	Ácido indol-3-pirúvico
AJ	Ácido jasmónico
ANA	Ácido naftalén acético
ARN	Ácido ribonucleico
BBM	Baby boom
BA	Benciladenina
BSA	Albúmina sérica bovina
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
EC	Embriogénesis cigótica
ES	Embriogénesis somática
ESD	Embriogénesis somática directa
ESI	Embriogénesis somática indirecta
GH3	Gretchen Hagen-3
IAOx	Indol-3-acetaldoxima
IGP	Indol-3-glicerol fosfato
IAM	Indol-3-acetamida
INS	Indolsintasa
KIN	Cinetina
LEC	Leafy Cotyledons
MS	Murashige y Skoog
MP	Membrana plasmática
NPA	Ácido naftilftalámico
OsDA	2-oxoglutarato dioxigenasa
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
RE	Retículo endoplásmico
SERK	Receptor cinasa de embriogénesis somática
OxIAA	Oxindol-3-acético
PILS	PIN-LIKES
TAM	Triptamina
TAA1	Triptofano aminotransferasa

TIBA	Ácido 2,3,5-triyodobenzoico
Trp	Triptofano
WUS	WUSCHEL
YUCAA	Flavin monooxigenasa

RESUMEN

A partir de su descubrimiento, la embriogénesis somática (ES) se ha convertido en un importante modelo de estudio en diversas especies de importancia agroeconómica, no solo como alternativa para su mejoramiento genético, sino también como modelo experimental para el conocimiento de los mecanismos bioquímicos y moleculares necesarios para la transformación de una célula en un embrión somático. Debido a su fácil manipulación, se han estudiado diversos factores que intervienen en este proceso, siendo las auxinas los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) más estudiados. Se conoce que su biosíntesis y transporte son vitales para la formación del eje embrionario. Estudios realizados durante la embriogénesis cigótica (EC), en mutantes en *Arabidopsis thaliana*, han brindado información sobre los patrones del transporte de auxina y su regulación por la posición de las proteínas PIN, transportadores de salida de auxina desde las células. Si bien ya se cuenta con un amplio conocimiento sobre la distribución de auxina en el embrión cigótico, prácticamente no se conoce nada sobre este fenómeno durante la formación de los embriones somáticos. En el proyecto reportado en esta tesis se aportan datos y evidencia sobre la localización y transporte del ácido-3-indol acético durante la ES de *Coffea canephora*.

ABSTRACT

Since its discovery, somatic embryogenesis has become an important model to study various crops of agro-economic importance, not only as an alternative for its improvement, but also as an experimental model for understanding the biochemical and molecular mechanisms required for the transformation from one cell to a somatic embryo. Due to its easy manipulation, it is possible to study different factors involved in this process. The auxins are the most studied plant growth regulators and it is known that its biosynthesis and transport are vital for proper zygotic embryo formation. Studies carried out during zygotic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* mutants, showed that auxin transport and its regulation by PIN transporters, are central for the development of these embryos. The aim of this work is to contribute to the knowledge of the role of the localization of auxins and its transport during the somatic embryogenesis of *Coffea canephora*.

INTRODUCCIÓN

Las células vegetales, a diferencia de las células animales, son totipotentes y bajo ciertas condiciones generan nuevos tejidos o incluso organismos completos. Uno de los procesos más estudiados es la embriogénesis somática (ES), la cual se ha convertido en una poderosa herramienta, para la regeneración *in vitro* de especies de importancia económica; sin embargo, a pesar de sus múltiples aplicaciones, los mecanismos genéticos, moleculares y bioquímicos involucrados en este proceso aún no se conocen. Una de las estrategias comunes para inducir la ES *in vitro*, en diversas especies, es el uso de diferentes combinaciones y concentraciones de reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Los RCV más utilizados para inducir la ES son las auxinas. Éstos son compuestos de baja masa molecular, que participan en diversos procesos fisiológicos, en particular los relacionados con la división, expansión y diferenciación celular (Takatsuka y Umeda, 2014; Braun et al., 2008). Si bien en varios modelos se requiere la presencia de una auxina exógena durante el periodo de inducción de la ES, diversos estudios han mostrado que el uso de inhibidores de su biosíntesis y transporte alteran el proceso embriogénico, provocando malformaciones en los embriones somáticos (Hakman et al., 2009; Choi et al., 2001), lo que sugiere que la auxina endógena también tiene un papel central en el proceso.

Para estudiar la distribución de auxina en diversos procesos fisiológicos, se han utilizado diversas técnicas: una de ellas es la cuantificación directa del ácido indol-3-acético (AIA), la cual proporciona información valiosa sobre la concentración de auxina endógena; sin embargo, no aporta información sobre la distribución de auxina en los tejidos. Para ello se han utilizado dos estrategias: inmunolocalización mediante anticuerpos anti-AIA, que nos indica los sitios de acumulación de auxina y la observación de la expresión genética mediante un promotor sintético denominado *DR-5*, que muestra los sitios de su señalización (Ulmasov et al., 1997), sin embargo, tiene el inconveniente de que únicamente detecta los sitios de máxima señalización, por lo que existen procesos fisiológicos en los que no se detecta la actividad de este promotor (Petersson et al., 2009; Grieneisen et al., 2007; Scarpella et al., 2006). Debido a ello, las técnicas inmunohistoquímicas, con los testigos apropiados, resultan ser una buena opción para los estudios de distribución del AIA.

Para que la auxina actúe, se quiere que se encuentre en el lugar preciso, en el momento

adecuado, para ello es necesario de un sistema transporte. Las auxinas cuentan con dos sistemas: uno a distancias largas a través del sistema vascular (floema) y otro a distancias cortas regulado por transportadores transmembranales llamados PIN (Friml y Palme, 2002). La mayor parte del conocimiento sobre el transporte de auxinas durante la embriogénesis, se ha obtenido a través de la cigótica (EC) en *Arabidopsis thaliana*. Se conoce que durante la formación del eje embrionario y de la simetría bilateral el flujo de auxina es mediado por los transportadores PIN1, PIN4 y PIN7 (Friml y Palme, 2002; Okada et al., 1991).

En café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mundo, debido a ello se han realizado diversos protocolos para la inducción de ES para su propagación, en la mayoría es frecuente el uso de citocininas como BA y KIN (Yasuda et al., 1985; Dublin, 1981). El sistema de ES desarrollado en nuestro laboratorio consiste de dos fases: la primera de ellas requiere del ácido naftalén acético (ANA) y de cinetina (KIN); en la segunda fase solo es necesaria la presencia de benciladenina (BA) (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). Debido a que durante el periodo de inducción no se requiere de una auxina exógena, es un buen modelo para estudiar la dinámica de la auxina endógena y determinar su papel durante la ES. Estudios de cuantificación previos han mostrado que durante la etapa de pre-condicionamiento, el AIA y algunos de sus conjugados incrementan progresivamente, presentando una mayor acumulación el día en que los explantes son transferidos al medio de inducción (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). El análisis de la expresión de genes que codifican a enzimas de la biosíntesis del AIA, mostraron que existe una mayor expresión de estos genes durante la pre-incubación, sin embargo, en los días posteriores a la inducción, tanto el AIA como sus conjugados disminuyen (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Por otra parte el uso de inhibidores de su transporte, como el ácido triyodobenzoico (TIBA) provoca malformaciones en los embriones somáticos obtenidos (Pérez Hernández, 2013).

En estudios realizados anteriormente se ha comprobado la su biosíntesis *de novo*, conjugación y transporte de auxina son cruciales para la inducción de embriones somáticos en *C. canephora* (Ayil-Gutiérrez et al., 2013; Pérez Hernández, 2013). En los últimos años nuestro laboratorio se ha centrado en estudiar cómo influyen los mecanismos de regulación en la homeostasis del AIA. El presente proyecto tiene como objetivo aportar conocimiento sobre la distribución del AIA y la localización del transportador PIN1, mediante técnicas inmunohistoquímicas y su análisis por microscopia confocal durante la ES en *C. canephora*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Las plantas tienen un estilo de vida sésil, por lo que tienen que adaptarse al medio ambiente que las rodea para sobrevivir. Su crecimiento, desarrollo y defensa son controlados por pequeños compuestos de señalización llamados RCV, los cuales modulan la división, diferenciación y elongación celular (Rockwell et al., 2006).

Las auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico y etileno fueron los primeros grupos de RCV identificados durante la primera mitad del siglo XX, actualmente existen once grupos de compuestos que han sido reconocidos como RCV (Fig.1.1), entre los que se encuentran: los brasinoesteroides, los jasmonatos, el ácido salicílico, el óxido nítrico, las poliaminas y las estringolactonas por mencionar algunos (Santner et al., 2009). Entre estos, las auxinas son las más estudiadas, puesto que diversos estudios bioquímicos y genéticos han evidenciado que participan en prácticamente todos los procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas (Möller y Weijers, 2009; Dubrovsky et al., 2008; Parker, 1991), lo que las ha convertido en un tema muy interesante en la biología.

La auxina natural más abundante es el AIA, un ácido orgánico débil que se caracteriza por poseer un anillo indol con una cadena lateral formada por un grupo carboxilo (Ljung, 2013); fue identificado mediante un bioensayo *in vitro*, que permitió que este compuesto estimulará el crecimiento de coleoptilos de avena con este compuesto estimularon el crecimiento de coleoptilos de avena (Went y Thiman, 1937). Posteriormente, fueron identificados otros dos compuestos con actividad auxínica: el ácido 4-cloroindol acético (4-Cl-AIA) y el ácido fenilacético (AFA), aunque ambos se encuentran en porcentajes menores (Ljung, 2013). El ácido indol-3-butírico (AIB) también ha sido clasificado como auxina (Fig. 1.2), debido a que es activo en varios bioensayos con raíces de *A. thaliana*, inhibiendo su elongación e incrementando la formación de raíces laterales (Zolman et al., 2000), estudios bioquímicos indican que AIB es convertido a AIA mediante β -oxidación (Bartel et al., 2001).

Después del descubrimiento del AIA se sintetizaron otras moléculas, análogas químicamente, con funciones biológicas y estructurales similares como: el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalén acético (ANA) (Fig. 1.3), los cuales se han utilizado para determinar cómo las plantas responden a diferentes tratamientos con auxina exógena, debido a que son estos compuestos más estables que el AIA y algunos se metabolizan más lentamente (Ljung, 2013).

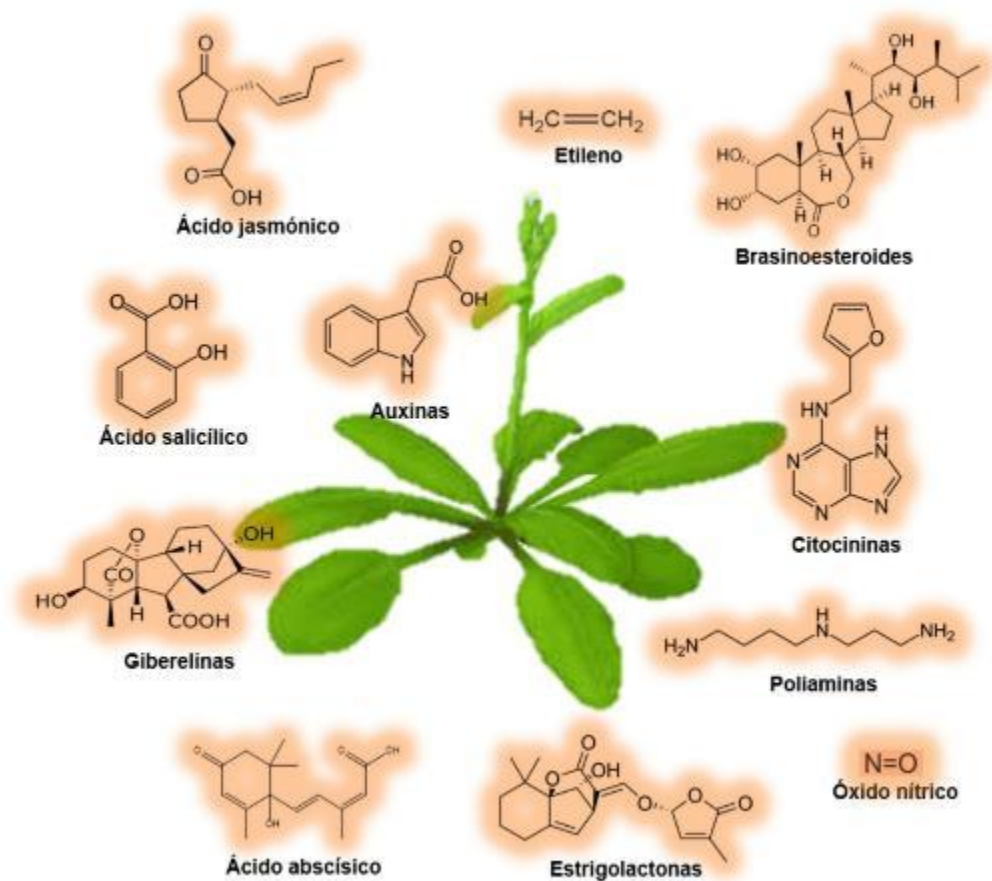


Figura 1.1 Estructura de los reguladores del crecimiento vegetal. Modificado de Santner et al., (Santner et al., 2009).

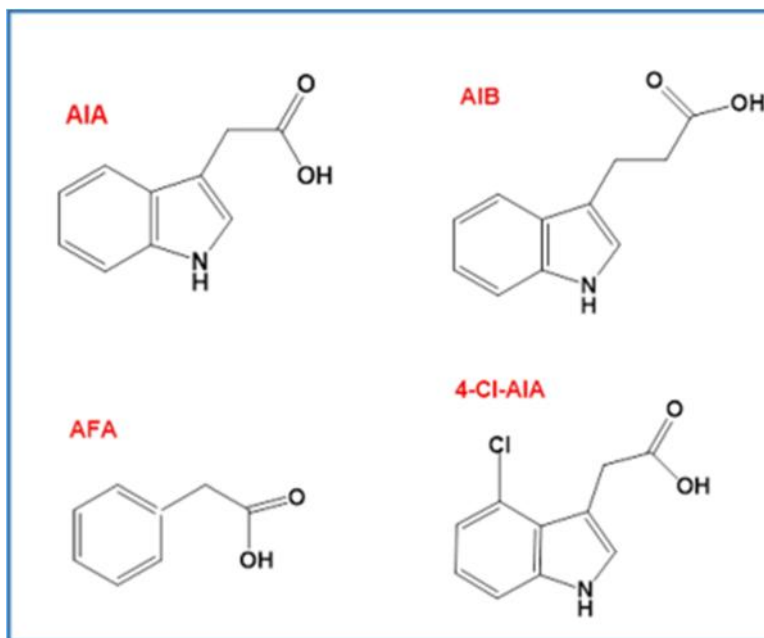


Figura 1.2 Auxinas naturales AIA = ácido-3-indol acético; AIB = ácido 3-indol-butírico; 4-Cl-AIA = ácido 4-cloroindol acético; AFA = ácido fenilacético.

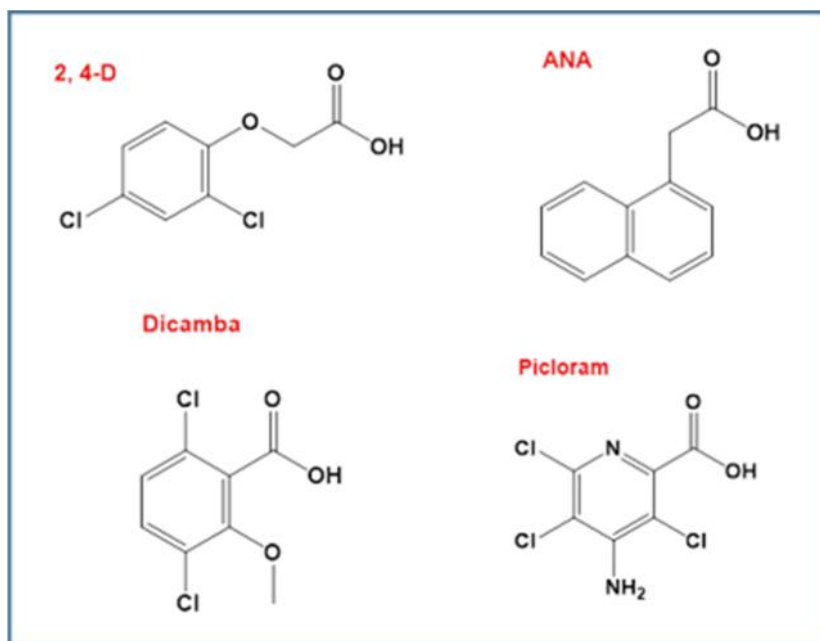


Figura 1.3 Moléculas similares a las auxinas naturales. 2, 4-D = ácido 2,4-diclorofenoxiacético; ANA = ácido naftalén acético; dicamba = ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico; picloram = ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

1.2 FACTORES QUE REGULAN LA HOMEOSTASIS DEL AIA

Los procesos fisiológicos regulados por el AIA dependen de su acumulación espacio temporal en los diferentes tejidos de una planta, su dinámica es regulada por la interacción de varios factores como su biosíntesis, catabolismo, conjugación y transporte (Fig. 1.4), los cuales son cruciales para ejercer sus múltiples funciones en respuesta a señales endógenas y ambientales.

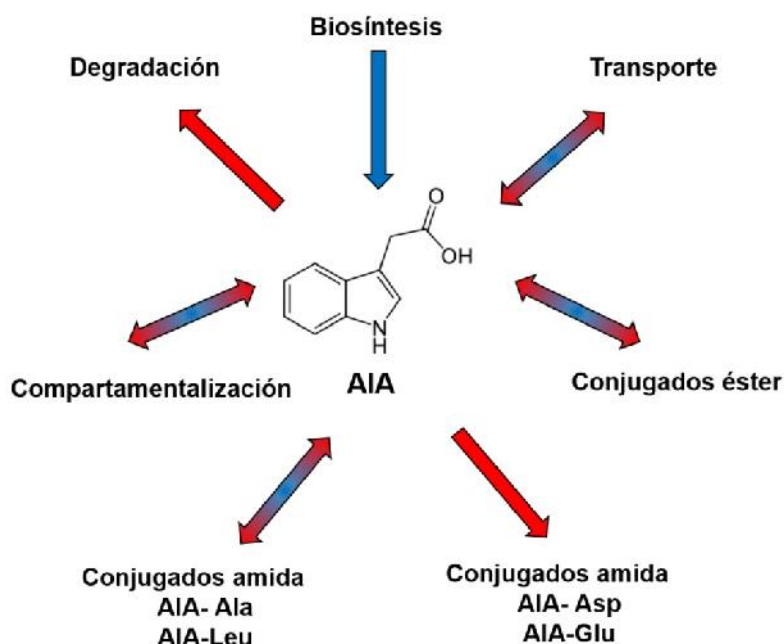


Figura 1.4 Esquema general de los factores involucrados en la homeostasis del AIA. Las flechas azules simbolizan reacciones que conducen a un aumento de AIA libre, las flechas rojas conducen a una disminución. Modificado de (Ludwig-Müller (Ludwig-Müller, 2011).

1.2.1 Biosíntesis

Aunque se sabe que el AIA tiene funciones vitales en las plantas, su biosíntesis aún no ha sido elucidada completamente. Esto se debe sobre todo a la existencia de múltiples vías de biosíntesis y al funcionamiento redundante de algunas de las enzimas involucradas en su biosíntesis (Zhao, 2010). Hasta el momento se han identificado cinco rutas de biosíntesis para el AIA. Estudios bioquímicos y genéticos han determinado que cuatro de ellas tienen como precursor al aminoácido triptófano (Trp), el cual se sintetiza a partir del indol-3-glicerol fosfato (IGP) en el cloroplasto (Radwanski y Last, 1995). Las rutas son nombradas de

acuerdo al primer intermediario formado: indol-3-acetaldoxima (IAOx), ácido indol-3-pirúvico (AIP), indol-3-acetamida (IAM) y triptamina (TAM) (Fig. 1.5). Debido a su gran complejidad no todas las enzimas de estas rutas han sido caracterizadas. Actualmente la ruta más detallada es la del AIP debido a que consta únicamente de dos pasos, mediados por las enzimas triptofano aminotransferasa (TAA1) y YUCCA (Stepanova et al., 2011; Stepanova et al., 2008).

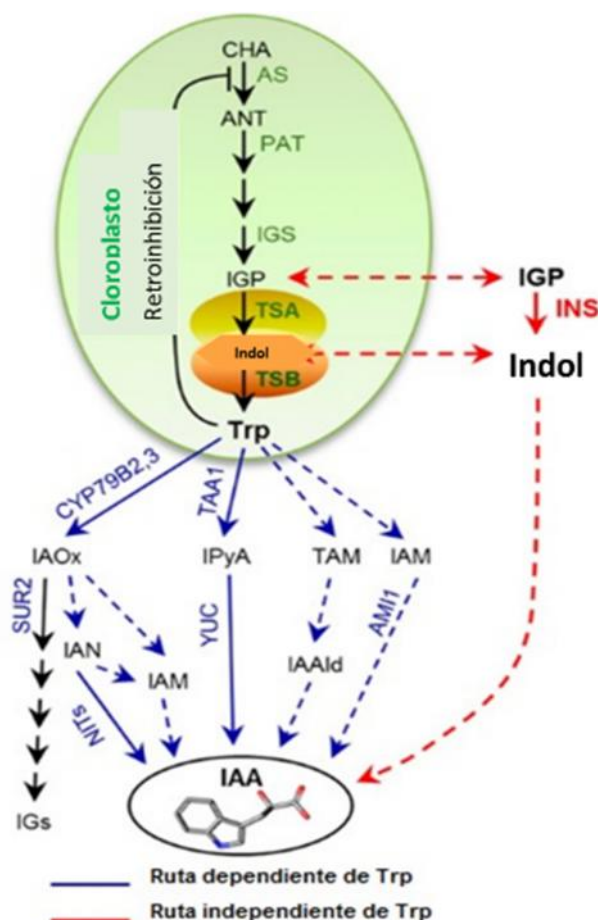


Figura 1.5 Modelo de las rutas de biosíntesis del AIA dependientes e independientes de Trp. Las flechas continuas hacen referencia a las vías cuyas enzimas han sido identificadas y las flechas discontinuas a las no identificadas. ANT, antranilato; AS, antranilato sintasa; CHA, ácido corísmico; IAAld, indol-3-acetaldehído; IAM, indol-3-acetamida; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IGP, indol-3-glicerol fosfato; IGs, glucosinatos de indol; IGS, indol-3-glicerol fosfato sintasa; IPyA, ácido indol-3-pirúvico; PAT, fosforribosilantranilato transferasa; TAA1, triptofano aminotransferasa Arabidopsis1; TAM, triptamina; TSA, triptofano sinteta α , TSB, triptofano sinteta β , YUC, YUCCA. Modificado de Wang et al. (Wang et al., 2015).

Si bien en un principio se pensó que las rutas dependientes de Trp eran predominantes, estudios de la tasa de formación del AIA y sus precursores, evidenciaron que la velocidad de formación a partir de estas vías era baja, por lo que posiblemente no cumplían con toda la demanda, esto sugirió la participación de otra vía que pudiera complementar estos requerimientos (Baldi et al., 1991). Análisis realizados con mutantes de *A. thaliana* y maíz, incapaces de sintetizar Trp, sirvieron de base para reforzar la hipótesis de la existencia de una vía de síntesis de AIA independiente de este aminoácido, ya que al ser suplementadas con Trp marcado isotópicamente, la cantidad de AIA marcado fue baja, reforzando la participación de una vía alterna de biosíntesis *de novo* (Normanly et al., 1993; Wright et al., 1991).

Mutantes deficientes en los pasos anteriores a la formación de IGP mostraron niveles bajos de Trp y AIA (Ouyang et al., 2000). Sin embargo, mutantes con defectos en las subunidades α y β de la enzima triptofano sintasa, tuvieron niveles altos de AIA en comparación con el tipo silvestre, aun cuando los niveles de Trp fueron bajos (Last et al., 1991), esto mostró que la ruta independiente de Trp se podría ramificar a partir de IGP o indol. Análisis de la enzima indol sintasa (INS) evidenciaron su posible participación en esta vía, ya que cataliza la conversión de IGP a indol (Ouyang et al., 2000), estudios recientes mostraron que INS es un componente clave de esta ruta y se localiza en el citosol, además de ser crucial para la formación del eje embrionario durante la embriogénesis cigótica en *A. thaliana* (Wang et al., 2015).

1.2.2 Almacenamiento y degradación

La degradación del AIA comienza con la descarboxilación de la cadena lateral o la oxidación del anillo indol (Gao y Zhao, 2014), aún se tiene poco conocimiento acerca de este mecanismo. El ácido oxindol-3-acético (OxIAA) es el principal producto catabólico del AIA en raíces de *A. thaliana* (Pencik et al., 2013), además se espera que esta reacción sea catalizada por la 2-oxoglutarato dioxigenasa dependiente de Fe (II) (2OGFe (II)) dioxygenase (Zhao et al., 2013).

Si bien se ha evidenciado que la forma libre del AIA es biológicamente activa, éste puede unirse a otros compuestos formando conjugados, los cuales ayudan a regular su homeostasis, representado formas de inactivación y reactivación dependiendo del

compuesto con el que se asocian (Fig. 1.6). Los conjugados pueden ser ésteres los cuales se forman con glucosa o mio-inositol y conjugados amida formados con los aminoácidos aspártico (Asp), glutámico (Glu), alanina (Ala), leucina (Leu) y varios más, estas reacciones son catalizadas por las enzimas AIA-amido sintetetasas pertenecientes a la familia de las proteínas GH3. *A. thaliana* cuenta con 19 miembros en esta familia, de los cuales siete catalizan la síntesis de estos conjugados (Staswick et al., 2005). Por ejemplo los conjugados AIA-Ala y AIA-Leu pueden contribuir a la acumulación de AIA libre mediante la acción de AIA-amido hidrolasas pertenecientes a la familia de genes *ILR1* (Rampey et al., 2004; LeClere et al., 2002) representado otra forma de almacenamiento, en contraste con los conjugados AIA-Asp y AIA-Glu cuya hidrólisis no es posible y representan una segunda ruta de su catabolismo (Östin et al., 1998). Debido a que el AIB puede ser convertido a AIA, ha sido clasificado como una forma de almacenamiento.

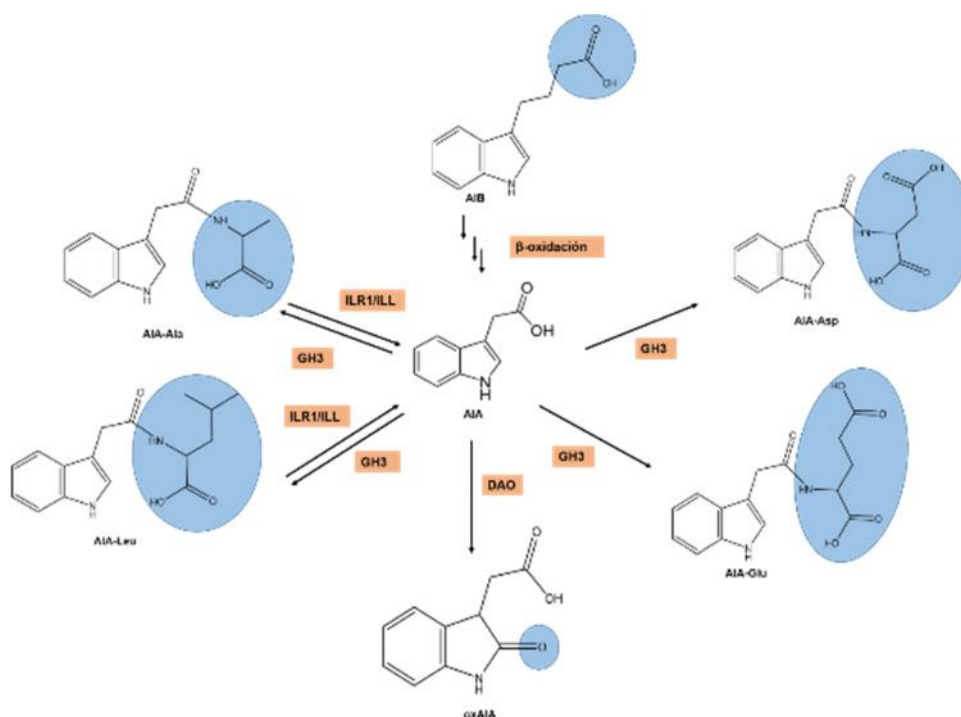


Figura 1.6 Principales formas de almacenamiento y degradación del AIA. El AIA es sometido a catabolismo de forma irreversible mediante el ácido oxindol-3-acético (OxIAA). El AIA se puede conjugar con diversos compuestos. La conjugación con los ácidos aspártico (Asp) y glutámico (Glu) son irreversibles, por lo que constituyen una segunda vía de su catabolismo. Los conjugados con alanina (Ala) y leucina (Leu) son reversibles y son considerados formas de almacenamiento, al igual que la conversión reversible del ácido indol-3-butírico (AIB). Los nombres de la familia de genes involucrados en cada vía son representados en rectángulos. La parte azul en cada estructura indica la parte que difiere del AIA.

1.2.3 Transporte

El AIA se distribuye de dos maneras en las plantas: una a distancias largas, desde los tejidos de biosíntesis, generalmente los meristemos, a otros tejidos mediante el sistema vascular (floema) y otra a distancias cortas entre células adyacentes (Zazimalová et al., 2010). Para explicar el mecanismo de su transporte, se sugirió un modelo quimiósmotico (Rubery y Sheldrake, 1974), que propone que aproximadamente 15% del AIA ($pK \sim 4.5$) se encuentra en su forma protonada en un medio ligeramente ácido ($pH = 5.5$) como el apoplasto (Fig. 1.7) y debido a la naturaleza hidrofóbica de su grupo indol este es fácilmente permeable en el plasmalema, por lo que su transporte de entrada a la célula se da de forma pasiva, sin embargo, al llegar al citosol ($pH = 7$) sufre una desprotonación dando como resultado una molécula cargada, que requiere de la actividad de transportadores específicos para su salida (Ruiz Rosquete et al., 2012). Además del flujo de entrada de auxina en forma pasiva, existen otros transportadores de entrada llamados AUX1/LAX, los cuales se activan cuando se necesita un flujo rápido y abundante de auxina (Péret et al., 2012).

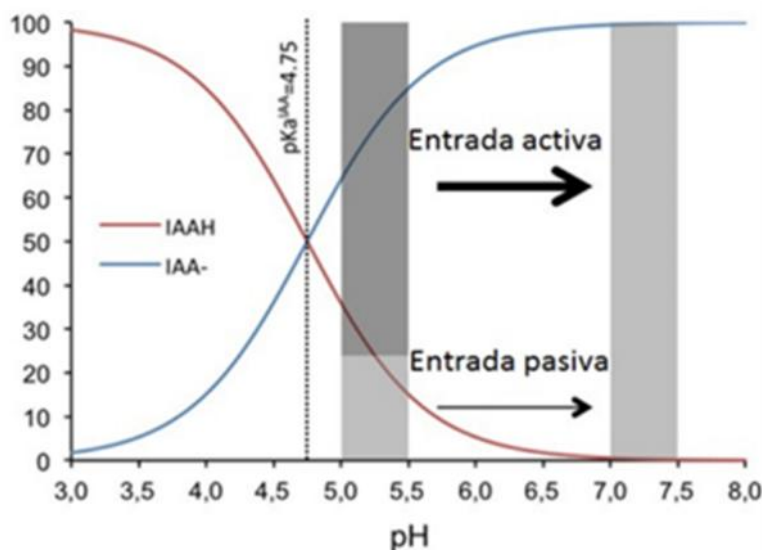


Figura 1.7 El porcentaje de la forma aniónica y protonada del AIA se da en función del pH en los rangos de pH apoplástico y citosólico (Péret et al., 2012).

Este modelo quimiósmotico acentuó la importancia de la localización asimétrica de los transportadores de salida, lo cual proporciona una dirección del flujo de auxina en las células. Existen dos familias de proteínas en el plasmalema que se encuentran involucradas en el transporte de salida de la auxina: los transportadores PIN y los ABCB (Fig. 1.8), aunque

diferentes procesos, tales como el desarrollo del embrión, la organogénesis, y diferentes tipos de tropismos entre otros (Benková et al., 2003; Friml et al., 2003; Bruinsma y Hasegawa, 1990) (Fig. 1.9).

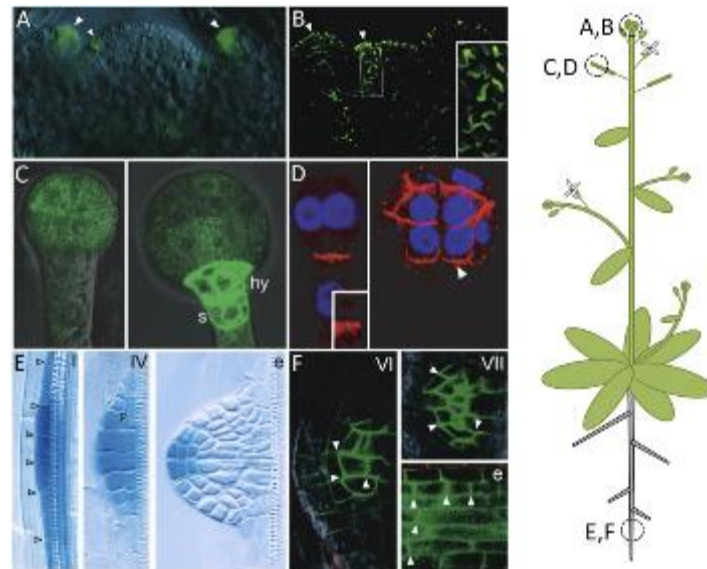


Figura 1.9 Procesos mediados por el transporte polar de auxina en *A. thaliana*. (A, B) Organogénesis. (C, D) embriogénesis. (E, F) Formación de raíces laterales (Adamowski y Friml, 2015)

De acuerdo con sus secuencias de aminoácidos los transportadores PIN son proteínas integrales del plasmalema, que cuentan con dos dominios hidrofóbicos de aproximadamente cinco hélices transmembranales cada uno, separados por un dominio hidrofílico central citosólico, la estructura de los dominios hidrofóbicos es conservada, por el contrario el dominio hidrofílico es más divergente, sin embargo, los miembros del mismo grupo tienen secuencias muy similares (Krecek et al., 2009). Aunque las proteínas PIN tienen la característica de ser transmembranales pueden ser reacomodadas en respuesta a estímulos externos a otros sitios de la célula mediante un mecanismo cíclico entre la membrana plasmática y los endosomas que involucra su fosforilación (Geldner et al., 2001).

En *A.thaliana* la familia PIN está formada por ocho miembros, los cuales se dividen en dos subfamilias de acuerdo al tamaño del dominio central hidrofílico. La subfamilia que cuenta con dominio hidrofílico amplio son aquellas que se localizan en la membrana plasmática (PIN 1-4 y 7), el segundo grupo cuenta con un dominio más estrecho (PIN 5 y 8) y se localizan en el lumen del retículo endoplásmico (RE) controlando la disponibilidad y distribución intracelular de auxina (Mravec et al., 2009) (Fig. 1.10).

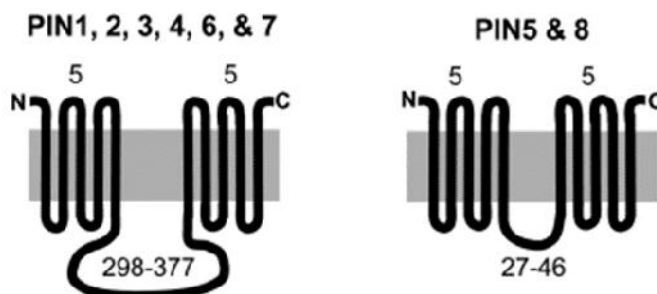


Figura 1.10 Estructura de las proteínas PIN. Los transportadores PIN's se caracterizan por poseer distinto tamaño del dominio hidrofílico central (Habets y Offringa, 2014).

Recientemente se han identificado proteínas homólogas y con una topología similar a las proteínas PIN llamadas PILS ubicadas también en el RE sin embargo, su funcionamiento no es claro todavía, aunque se piensa que tienen una función reguladora en el metabolismo de las auxinas puesto que afectan las relaciones de AIA libre y conjugado (Barbez et al., 2012); sin embargo, a pesar de tener una estructura predicha y posiblemente función similares, los análisis filogenéticos permiten concluir que estas proteínas parecen ser más antiguas que los transportadores PIN (Feraru et al., 2012).

Si bien el conocimiento que se tiene de estas proteínas ha sido gracias a estudios realizados con mutantes de *A. thaliana*, sabemos que no todas las especies pueden ser manipuladas genéticamente. La disponibilidad de compuestos que alteran el transporte del AIA ha sido de gran ayuda para la obtención de nueva información en este campo. La identificación y caracterización funcional de estas proteínas ha sido facilitado, en gran medida, por el uso de inhibidores del transporte tales como el ácido *N*-naftiltalámico (NPA) y el TIBA (Scanlon, 2003; Mattsson et al., 1999).

1.2.3.2 Transportadores ABCB

Los transportadores ABC son una gran familia de proteínas transmembranales que están asociadas con el movimiento de un gran número de pequeñas moléculas y nutrientes; en las plantas están involucradas en el transporte de RCV, lípidos, metales, metabolitos secundarios, xenobióticos, además de participar en las interacciones planta patógeno y en la modulación de canales iónicos (Cho et al., 2014; Lee y Cho, 2014; Lee et al., 2008).

Las proteínas ABCB, a diferencia de los transportadores PIN, se localizan en la membrana plasmática (MP) de una manera no polar, debido a que se anclan de forma estable y su distribución no cambia por estímulos, ni externos ni internos, sin embargo, sirven como transportadores basales para la regulación de la homeostasis intracelular del AIA (Fig. 1.11). Estudios realizados en plantas con la pérdida de la función de los genes que codifican para estas proteínas mostraron que el contenido de AIA libre y el transporte de polar fueron severamente reducidos (Geisler et al., 2005; Noh et al., 2001).

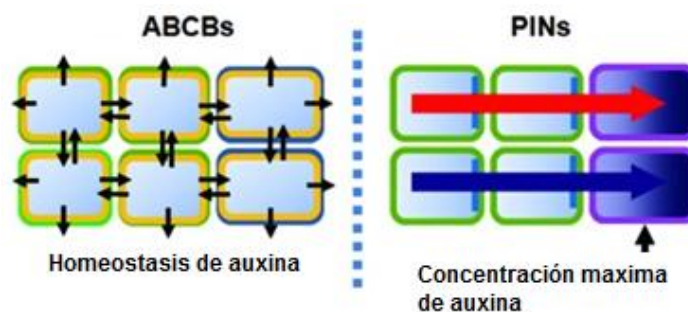


Figura 1.11 Funciones de las proteínas ABCB y PIN en el transporte de auxina. Los transportadores ABCB se localizan de forma estable y simétrica en la MP, funcionan como transportadores basales y regulan su homeostasis. Por el contrario, los transportadores PIN se encuentran de forma asimétrica y tienen una distribución dinámica en respuesta a señales ambientales, mediando el transporte polar de auxina para formar gradientes (Cho y Cho, 2012).

1.3 PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN

El nivel espacial del AIA es modulado por la síntesis *de novo*, la conversión reversible de los conjugados, el catabolismo y su transporte, sin embargo, el AIA endógeno debe ser reconocido por las plantas por medio de receptores y promover cascadas de señalización para desencadenar una respuesta biológica. Este compuesto puede modular respuestas dependientes de la transcripción o independientes de ella.

En el proceso de regulación transcripcional, a bajas concentraciones de AIA, las proteínas Aux/AIA junto con el co-represor TOPLESS (TPL) (Szemenyei et al., 2008) pueden unirse y reprimir a los factores de transcripción responsivos a auxina (ARF), los cuales regulan la expresión de genes de respuesta a auxina, bloqueando la activación de su transcripción (Fig. 1.12). Por el contrario, el AIA a altas concentraciones se une a las proteínas TIR1/ABP promoviendo su interacción con las proteínas Aux/AIA, las cuales sufren un proceso de poliubiquitinación por el complejo ubiquitina ligasa (SFC) formado por las proteínas ASK1, COL1 RBX, lo que causa su degradación por el proteosoma 26S (Ramos et al., 2001; Deshaies, 1999).

La maquinaria de señalización de las auxinas que no está involucrada en la regulación transcripcional aún no ha sido caracterizada, ya que los componentes de señalización y los eventos fisiológicos participantes en estas respuestas rápidas aún no han sido determinados. Sin embargo, la proteína ABP1 es uno de los receptores candidatos, cuya función principal se especula es la elongación celular, debido a que activa el potencial de membrana y los canales iónicos involucrados en los cambios estructurales de la pared celular y el citoesqueleto, lo que produce un alargamiento en la célula (Shi y Yang, 2011; Robert et al., 2010). Esta proteína ha sido identificada en varias especies de plantas incluyendo *A. thaliana* (Venis et al., 1996) y maíz (Hertel et al., 1972), aunque se localiza principalmente en el RE, es secretada en el espacio extracelular y se cree que actúa ahí como un receptor, puesto que se ha estudiado su afinidad con AIA a diferentes pHs y se encontró que la afinidad más alta se da en un pH ligeramente ácido (~ 5.5) parecido al del apoplasto (Feldwisch et al., 1992).

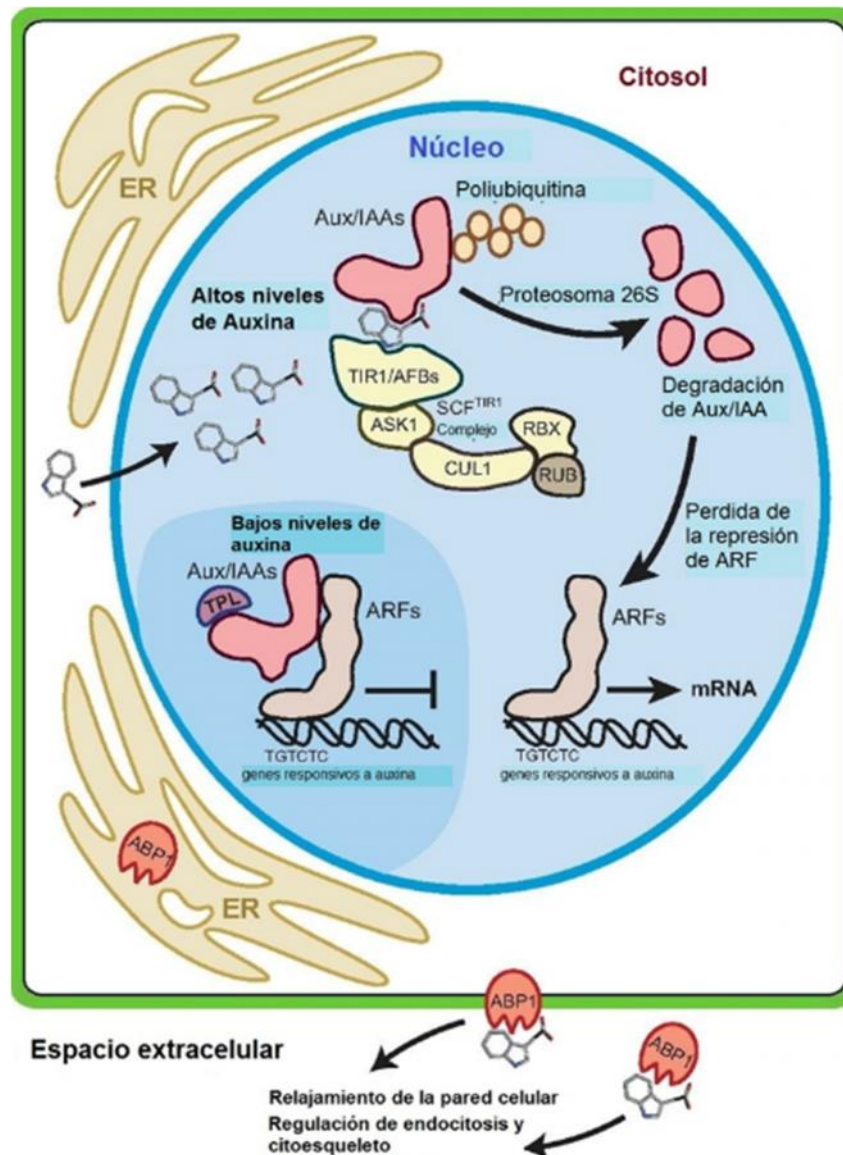


Figura 1.12 Componentes clave en la percepción y señalización del AIA. La auxina puede regular respuestas transcripcionales e independientes de la transcripción. En el núcleo el AIA se une a las proteínas TIR/AFB y Aux/IAA, las cuales funcionan como co-receptores. Cuando los niveles de AIA son bajos las proteínas Aux/IAA forman heterodímeros con los factores de transcripción ARF, reprimiendo la transcripción de genes responsivos de auxina. Sin embargo, cuando los niveles de AIA son altos, la unión de AIA con sus co-receptores, causan que las proteínas Aux/IAA sean degradadas por el proteosoma 26S, lo cual provoca que esta proteína ya no se una con los ARF provocando la expresión de genes responsivos a auxina. En una respuesta independiente de la transcripción la proteína ABP que se encuentra en el RE, o la MP o el cloroplasto, se cree que también funciona como un receptor de auxina, en los procesos de regulación de endocitosis, pared celular, y citoesqueleto los cuales conducen a la expansión celular (Ljung, 2013).

1.4 TRANSPORTE DE AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS

Como se mencionó anteriormente el AIA se distribuye de manera asimétrica en las células durante las diferentes etapas de crecimiento y desarrollo en las plantas, estos gradientes están determinados principalmente por la localización subcelular asimétrica de las proteínas PIN; estos gradientes regulan varios procesos incluyendo la embriogénesis, la organogénesis, la diferenciación de tejido vascular, el mantenimiento del meristemo radical y diferentes tipos de tropismos (Vieten et al., 2007; Wisniewska et al., 2006; Friml y Palme, 2002).

Se ha demostrado que los gradientes de auxina son muy importantes durante la embriogénesis durante el establecimiento del eje embrionario (Benková et al., 2003) debido a que después de la primera división transversal asimétrica del cigoto, el flujo de auxina se dirige hacia la célula apical (Fig. 1.14) a través de los transportadores PIN7 ubicados en la parte superior de las membranas apicales de las células del suspensor (Fig. 1.13). Este gradiente se mantiene hasta el estadio de 32 células, cuando PIN7 invierte su posición en la parte basal (Su y Zhang, 2009). Por otra parte *Pin1* se expresa de manera homogénea hasta el estadio de 16 células. Sin embargo, en el estadio de 32-celulas se localiza en la parte basal de las células que formarán el tejido provascular, transportando auxina hasta la hipófisis. Mediante divisiones celulares sucesivas se forma un embrión globular el cual contará con los tres tejidos fundamentales diferenciados, el protodermo, el procambio y meristemo apical, los que darán origen a todos los tejidos de la planta. En el siguiente estadio, llamado corazón, comienza la etapa de maduración que se caracteriza por la expansión y elongación celular, en esta etapa PIN1 se localiza mayormente en los meristemos apicales que darán origen a los cotiledones aumentando la concentración de auxina en estos sitios (Fig. 1.15).

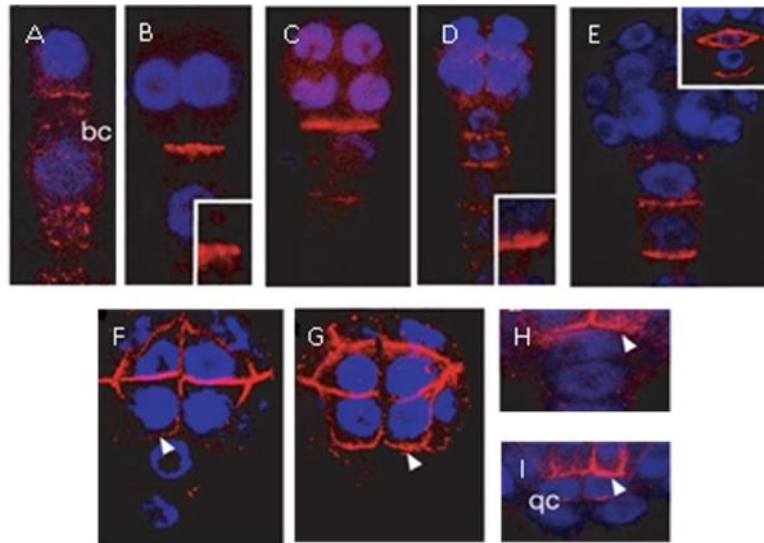


Figura 1.13 Localización de las proteínas PIN 1 y PIN 7 en los estadios de proembrión (2 células) y embrión globular de *A. thaliana*. (A-E) Localización de la proteína PIN7. (A) La proteína PIN 7 se localiza en la membrana apical de la célula basal. (B) Estadio de 8 células. (C) Estadio de 16/32 células. (D, E) Embrión globular. (F-I) Localización de la proteína PIN 1. (F) Estadio de 16 células. (G) Estadio de 32 células. (H, I) Ubicación en el centro quiescente en el estadio de corazón (Friml et al., 2003) en estos sitios (Friml et al., 2003) (Fig. 1.15).

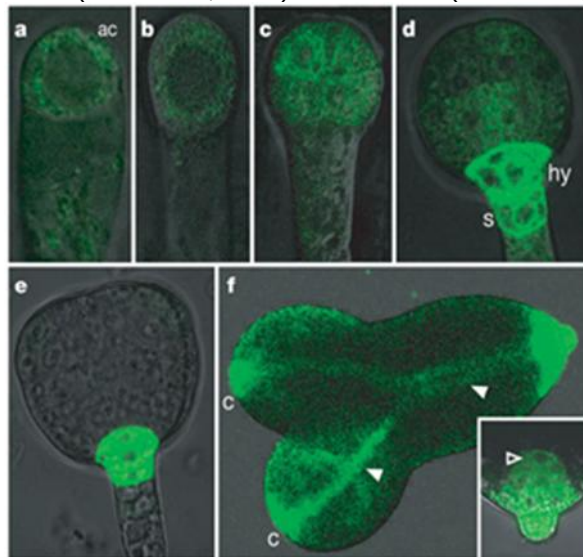


Figura 1.14 Localización de Proteína verde fluorescente (GFP) en respuesta a auxina a través del promotor *DR5rev* en embriones cigóticos de *A. thaliana*. (a y b). Después de la división del cigoto hay una mayor presencia en la célula apical (ac). c) Estadio de 8 células. (d) *DR5rev::GFP* cambia de posición en el estadio globular concentrándose en la célula de la hipófisis en la parte superior del suspensor. (e) Embrión en estadio triangular. (f) En el estadio torpedo existe una mayor señal en los cotiledones (c) y en las células provasculares (flechas) (Friml et al., 2003).

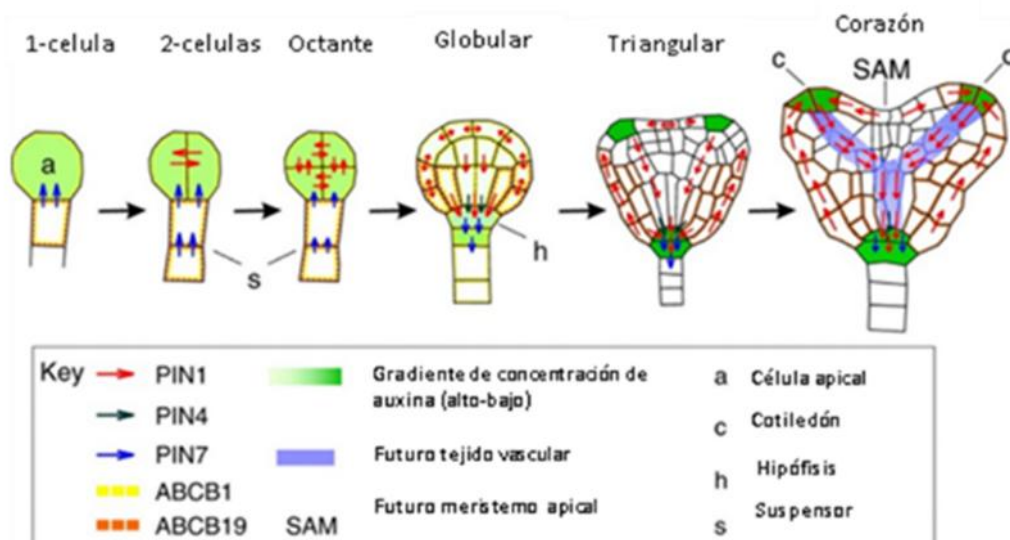


Figura 1.15 Transportadores y gradientes de auxina durante la embriogénesis cigótica. Descripción esquemática de la distribución de auxina y la localización de transportadores durante el desarrollo embriogénico. Modificado a partir de Petrássek (Petrássek y Friml, 2009).

1.5 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA COMO MODELO DE ESTUDIO

La manera más común de reproducción en plantas superiores se da de manera sexual mediante la fertilización de sus gametos, este proceso ocurre dentro del pistilo y da como resultado un célula diploide (cigoto) con lo que da inicio el proceso de EC (Goldberg et al., 1994), sin embargo, existe otra forma de reproducción asexual llamada ES, la cual se da de forma natural en plantas del género *Kalanchoe* (Crassulaceae) mediante la formación de plantas en los márgenes de sus hojas (Garces et al., 2007), aunque este proceso también se puede llevar a cabo mediante el cultivo de células *in vitro*. El primer sistema de ES se realizó en *Oenanth aquatica* en 1957 en el laboratorio del Dr. Harry Waris (Krikorian y Simola, 1999; Waris, 1959; Miettinen y Waris, 1958). Prácticamente al mismo tiempo, otros dos grupos de forma independiente y usando suspensiones celulares de zanahoria descubrieron el proceso de ES (Reinert, 1959; Steward et al., 1958). A partir de este descubrimiento se desarrollaron diversos estudios sobre la determinación de los nutrientes y condiciones *in vitro* necesarias para la conversión de células somáticas a embriones somáticos en diversas especies de importancia agroeconómica (Gaj, 2004).

Debido a su fácil manipulación y características morfológicas comunes con la EC (Debergh y Zimmerman, 1993), en un principio se pensó que la ES, podría ser útil para el estudio de los mecanismos moleculares bioquímicos que ocurren durante inicios de la embriogénesis. Hoy sabemos que además de las diferencias obvias, como la carencia de endospermo, son procesos distintos ya que en la ES ocurre un proceso de reprogramación del patrón de expresión de genes específicos (Karami et al., 2009; Pasternak et al., 2002).

La ES además de ser reconocida como un medio para la regeneración de una gran variedad de plantas de importancia agroeconómica, nos provee un modelo para comprender la expresión y regulación de los genes involucrados en los primeros estadios de formación de un embrión (Fehér et al., 2003). Existen modelos para entender este comportamiento y conocer cómo las células somáticas adquieren esta totipotencialidad para convertirse en embriones, además de conocer los eventos bioquímicos y moleculares que surgen durante su maduración. Así, la ES se ha convertido en un importante sistema modelo para el estudio de la desdiferenciación y re-diferenciación de las células y actualmente es utilizada ampliamente como un sistema experimental (Ikeda-Iwai et al., 2003).

Existen dos formas diferentes de inducción de ES: la embriogénesis somática directa (ESD) y la embriogénesis somática indirecta (ESI) (Fig. 1.16). En la ESD las células proembriogénicas cuentan con el programa genético para la realización de la embriogénesis y solo requiere de condiciones que la favorezcan. En cambio en la ESI en cambio, las células tienen que ser reprogramadas genéticamente para su desdiferenciación mediante la formación de callo y adquirir su estado competente, aun así, en ambas formas el origen puede ser tanto unicelular como pluricelular, no olvidando que la naturaleza y el estadio fisiológico del explante, así como la concentración de RCV influyen en cada uno de las formas de inducción (Quiroz-Figueroa et al., 2006b).

Debido a que la ES a partir de callo de zanahoria (*Daucus carota*) fue el primer protocolo establecido, este sistema ha sido usado como modelo para su estudio por su fácil reproducibilidad y generación de grandes cantidades de embriones, sin embargo, el poco conocimiento sobre la estructura y funcionamiento de su genoma representó un obstáculo en el estudio de los procesos bioquímicos y genéticos involucrados durante la ES en esta especie (Gaj et al., 2005), hasta recientemente que se secuenció su genoma (Iorizzo et al., 2016).

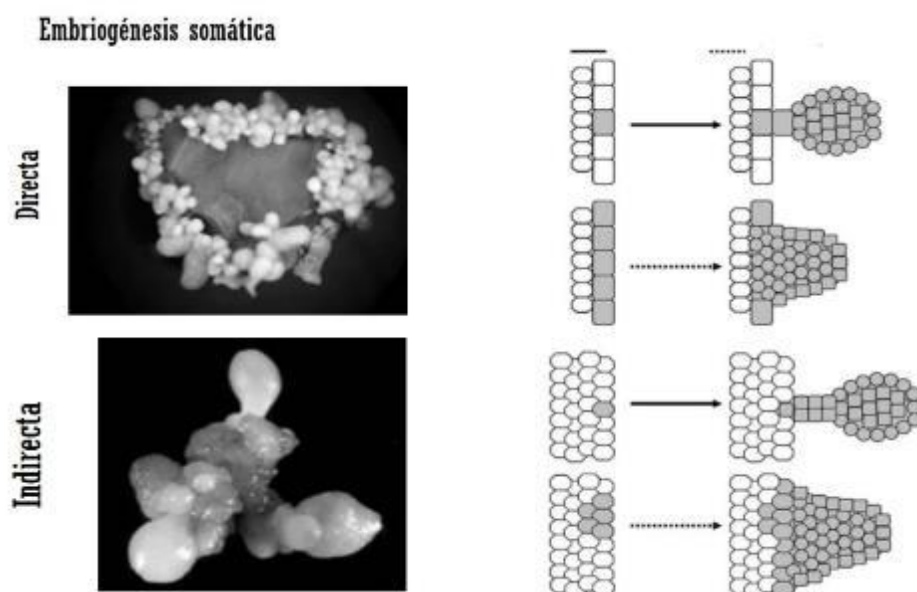


Figura 1.16 Tipos de embriogénesis somática. Embriogénesis somática directa (ESD) y embriogénesis somática indirecta (ESI) (Quiroz-Figueroa et al., 2006b).

En busca de otro modelo para el estudio de la ES, *A.thaliana* fue el siguiente objetivo, debido a que la secuencia de su genoma ya está publicada. Debido a ello en los últimos años se ha tratado de perfeccionar un protocolo de inducción de ES a partir de embriones cigóticos inmaduros, por lo que en diferentes estudios se ha identificado y localizado genes necesarios para la inducción y regulación de la ES, lo cual implica una sucesión de eventos causados por señales internas y estímulos externos (Gaj, 2001; Mordhorst et al., 1998; Luo y Koop, 1997; Wu et al., 1992), la respuesta a estos factores desencadena cascadas de señalización que dan lugar a la expresión de genes específicos (Fehér et al., 2003; Chugh y Khurana, 2002), sin embargo, la poca reproducibilidad de estos protocolos ha frenado las investigaciones en esta especie.

La primera familia de genes identificados por jugar un papel crucial durante la embriogénesis de *A. thaliana*, fueron los *LEAFY COTYLEDON (LEC)*, mediante un estudio de mutantes con defectos en su maduración, debido a que los embriones germinan después de pasar por el estadio torpedo (Lotan et al., 1998) y sus cotiledones poseen tricomas, que es normalmente una característica de las hojas (West et al., 1994), sin embargo, al realizarse estudios de ES en las mutantes *LEC 1* y *LEC 2*, se observó que su respuesta embriogénica fue mucho menor, a diferencia de los cultivos de tipo silvestre, con estos resultados se evidenció que además de regular diversos aspectos de la EC, los genes *LEC*

podrían ser indispensables para la inducción de la ES y controlar varios procesos que conducen los primeros acontecimientos para que una célula somática cambie su programa genético y se convierta en una célula embriogénica (Gaj et al., 2005; Lotan et al., 1998).

Otros de los genes estudiados en este proceso es *BABY BOOM (BBM)*, miembro de la familia AP2/ERF, los cuales juegan un papel importante en la embriogénesis ya que se expresan preferencialmente durante el desarrollo de embriones a partir de microesporas de *Brasica napus* (Passarinho et al., 2008) y su sobreexpresión causa la formación de embriones somáticos en los márgenes de la hojas en *A. thaliana* (Boutilier et al., 2002).

Además de los genes mencionados anteriormente se han encontrado otros como los *WUSCHEL (WUS)* y *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK)* los cuales se cree tienen un papel fundamental en este proceso, sin embargo, la ES es un proceso muy complejo, por lo tanto el mecanismo que controla la señal para convertir a una célula en totipotente es una red de interacción altamente regulada de estos genes y muchos otros, por lo que no se debe apostar como primordiales a un solo grupo de genes (Elhiti et al., 2013).

1.6 AUXINAS EN EL PROCESO DE INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En un principio las investigaciones se centraron en estudiar los diferentes estímulos que provocaban la ES, entre ellos los RCV, compuestos utilizados actualmente en diferentes dosis y combinaciones para la inducción y progresión de la ES. Debido a que las auxinas están relacionadas con la división y diferenciación celular (Zuo et al., 2002; Pasternak et al., 2002), han sido utilizadas en los medios de cultivo *in vitro* como estrategia para la inducción de ES en diversas especies. Muchos sistemas de ES *in vitro* se basan en el uso del ácido 2,4-D un análogo sintético de auxina como un inductor, sin embargo, también son utilizados muchos otros análogos.

Las siguientes investigaciones se enfocaron en analizar la interacción de las auxinas exógenas y endógenas, debido a que las células producían grandes cantidades de AIA en presencia de 2,4-D en varios modelos de estudio (Pasternak et al., 2002), evidenciando que las auxinas endógenas también participan activamente durante este proceso; otra prueba más de ello fue la disminución de la capacidad embriogénica cuando las células fueron cultivadas prolongadamente con 2,4-D, coincidiendo con una reducción de los niveles de

auxina endógena (Jiménez y Bangerth, 2001; Rajasekaran et al., 1987), aunado a que después de la etapa de inducción es necesario que los niveles endógenos de auxina disminuyan, por ello el 2,4-D tienen que ser retirado, ya que el cultivo progresivo en un medio que tiene este RCV no permite una reducción de los niveles de auxina, causando malformaciones en los embriones esto es necesario para que el transporte y la distribución de auxina sean los apropiados (Schiavone y Cooke, 1987).

Diversos estudios en los que se han utilizado inhibidores de la biosíntesis y transporte de auxina, han evidenciado el papel crucial que tienen estos RCV durante la ES, debido a que su presencia provoca que el proceso embriogénico sea fuertemente inhibido (Choi et al., 2001; Choi et al., 1997b; Schiavone y Cooke, 1987), así como malformaciones en los embriones (Schiavone y Cooke, 1987). Es por ello que los mecanismos que regulan la homeostasis intracelular de las auxinas han sido el blanco de varias investigaciones.

1.7 INMUNOLocalIZACIÓN DE AUXINA DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Se sabe que las auxinas son un factor importante en la EC y que su transporte mediado por la localización polar de las proteínas PIN es de vital importancia para el patrón de formación del embrión (Friml et al., 2003). Para el estudio de la distribución de auxina durante la ES se han utilizado varias estrategias, entre ellas la cuantificación directa del AIA en los tejidos embriogénicos, sin embargo, estos resultados tienen sus limitaciones debido a que nos informa la cantidad de auxina, pero no los sitios de acumulación; otras de las herramientas más modernas es el uso de promotores sintéticos sensibles a auxina como el *DR5*, que nos muestra los sitios de respuesta transcripcional a auxina, dándonos de forma indirecta su patrón de distribución, sin embargo, aunque puede ser observado en varios procesos fisiológicos dependientes de auxina (Ulmasov et al., 1997), en muchos otros no (Scarpella et al., 2006), este problema se ha tratado de remediar utilizando otros promotores más sensibles como *DR5v2* y *DII-Venus* (Liao et al., 2015). Otra de las herramientas más utilizadas es la inmunolocalización a través de anticuerpos anti-AIA, el cual nos muestra los sitios de acumulación de este compuesto.

Estudios sobre la localización de las auxinas en embriones obtenidos a partir de microesporas y embriones cigóticos inmaduros de *Quercus suber*, muestran que después de la inducción, la acumulación de AIA es baja (Fig. 1.17 A, D) sin embargo, se presenta un incremento diferencial de auxina endógena en el citoplasma de las células formadoras de embriones multicelulares tempranos (Fig. 1.17 B, E). Por otra parte, las células superiores (flecha) de la masa proembriogénica (Fig. 1.17 C, F) muestran señal de AIA mientras que las células inferiores no. Estos resultados muestran que existe una dinámica espacio-temporal en la distribución de auxina en las etapas tempranas de la embriogénesis, evidenciando la posible participación de su transporte, durante la reprogramación de las células al estado embriogénico (Rodríguez-Sanz et al., 2014).

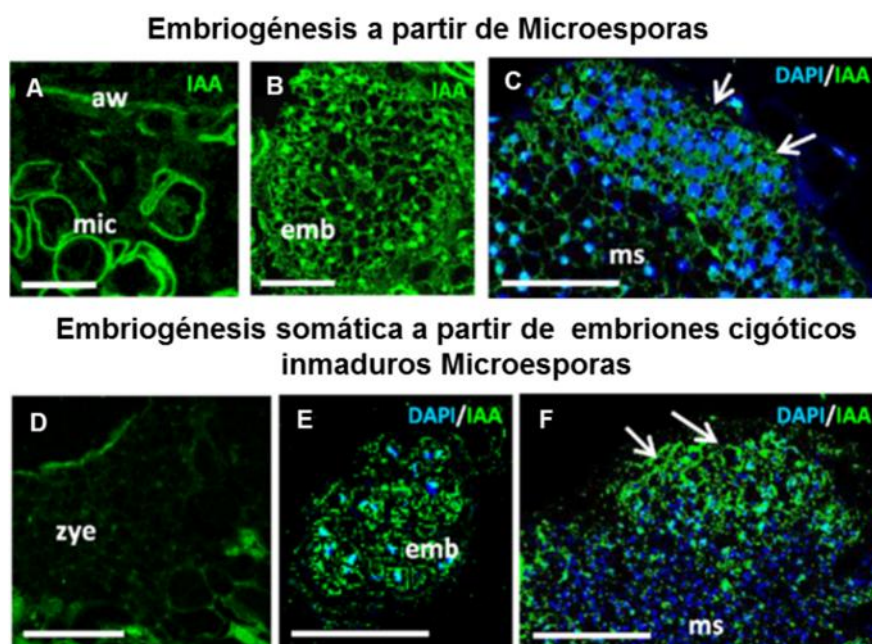


Figura 1.17 Inmunolocalización del AIA al inicio de la ES a partir de microesporas y embriones cigóticos inmaduros de *Q. suber*. (A, B, C) Inmunolocalización de AIA en embriogénesis de microesporas. (D, E, F) Inmunolocalización de AIA en ES a partir embriones cigóticos inmaduros, en algunas imágenes los núcleos están teñidos con DAPI (azul) (Rodríguez-Sanz et al., 2014).

Otro estudio de inmunolocalización de AIA se realizó durante la embriogénesis a partir de microesporas en *B. napus*; se determinó que durante las primeras divisiones en las células proembriogénicas la acumulación intracelular de AIA aumentó en su citoplasma y núcleo, en contraste con las microesporas antes de la inducción de ES (Fig. 1.18 A, B, C, D). En embriones estadio globular la distribución de AIA es uniforme, acumulándose principalmente en el citoplasma (Fig. 1.18 E). En contraste, en el estadio cotiledonar la

distribución del AIA fue diferencial ya que se ubicó principalmente en citoplasma de las células de los primordios de los cotiledones a diferencia del resto del embrión (Fig. 1.18 F, G), sugiriendo que esto es resultado de un transporte polar de auxina (Rodríguez-Sanz et al., 2015).

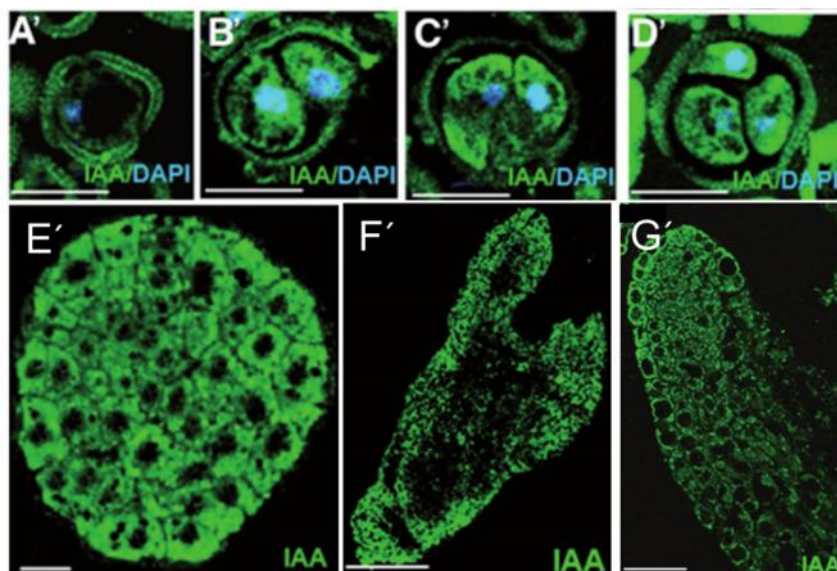


Figura 1.18 Inmunolocalización de AIA durante etapas tempranas de embriogénesis a partir de microesporas de *B. napus* (A) Microespora vacuolada antes de la etapa de inducción. (B, C) Embriones de dos células. (D) Embrión multicelular temprano. (E) Embrión globular. (F, G) Embrión cotiledonar (Rodríguez-Sanz et al., 2015).

En embriones somáticos de *Picea abies* se observa una mayor acumulación de auxina en las células de la protodermis (Fig. 1.19 A, B, C) al igual que el estadio cotiledonar, sin embargo en este estadio se presentó una menor acumulación de AIA (Hakman et al., 2009). Estudios de hibridación *in situ* de *PaPin1*, un gen homólogo del gen *Pin1* en esta especie, sugieren que, al igual que embriones cigóticos, las proteínas PIN también están involucradas en el flujo de auxina ya que su localización correlaciona con una mayor acumulación de auxina. Durante los primeros estadios de la ES la expresión de *PaPin1* fue mayor en las células del protodermo, al igual que la localización inmunohistoquímica de auxina, la cual tiene una mayor intensidad en dichas células tanto cortes longitudinales como transversales (Fig. 1.19 E, F), en embriones cotiledonares *PaPin1*, se expresó principalmente en las células del procambium vascular (Fig. 1.19 G), evidenciando su posible participación, en la distribución de auxina en las células de los primordios de los cotiledones (Palovaara et al., 2010). Por otra parte experimentos con NPA, un inhibidor del transporte de auxina, muestran malformaciones en los embriones, ya que provoca una

fusión de los cotiledones en el estadio precotiledonar (Hakman et al., 2009), lo que sugiere que, al igual que la EC, en la ES también existe un patrón de distribución diferencial de auxina que es vital para la formación correcta del embrión.

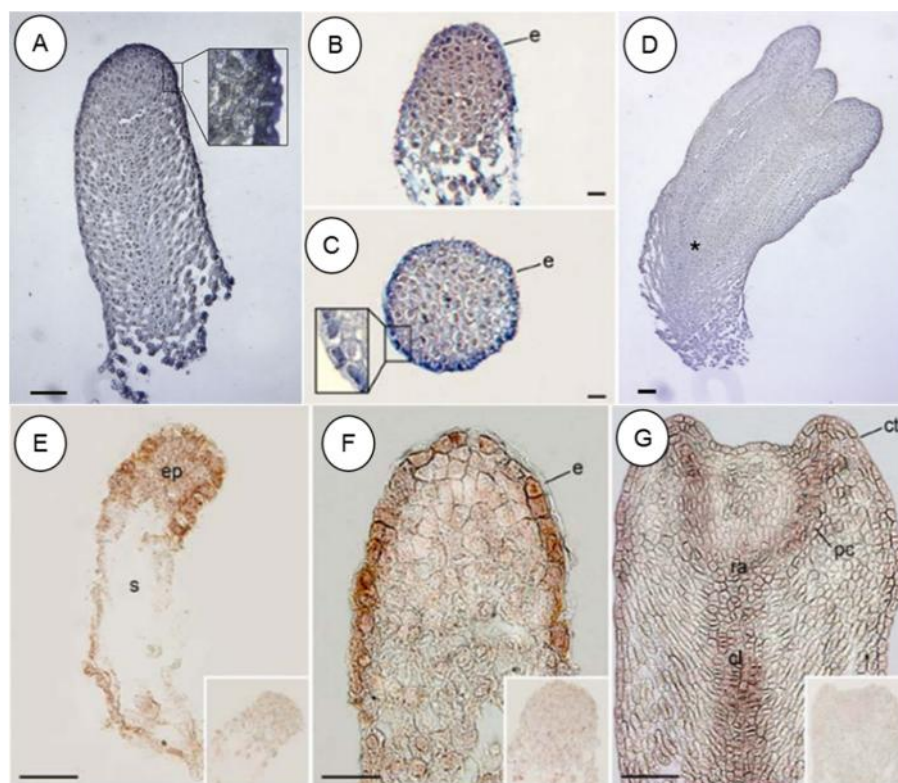


Figura 1.19 Inmunolocalización de AIA y expresión de *PaPin1* en embriones somáticos de *P. abies*. (A, B) Inmunolocalización de AIA en embrión somático en estadio precotiledonar. (C) Corte transversal. (D) Inmunolocalización de AIA en embrión somático estadio cotiledonar. (E) Expresión del gen *PaPin1* de un embrión temprano. La señal de hibridación de *PaPin1* esta principalmente en la protodermis. (G) Embrión cotiledonar, la señal de hibridación se presentó principalmente en la células del procambium vascular. Barras de escala 25 μ m, columnela (cl), cotiledones (ct), epidermis (e), procambium (pc), apice de la raíz (ra), suspensor (s), meristemo radicular (*) (Palovaara et al., 2010).

1.9 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *Coffea*

Dada la relevancia de la ES como una herramienta útil para la regeneración de múltiples especies y debido a que el café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mundo, en un principio los estudios realizados en estas especies se centraron en encontrar un protocolo eficiente para su propagación. El primer reporte se realizó en 1970 con la formación de callo a partir de internudos ortólogos de *C. canephora* (Staritsky, 1970), posteriormente se lograron desarrollar protocolos experimentales de ES en *C. arabica* a partir de explantes de hojas (Söndahl y Sharp, 1979; Söndahl y Sharp, 1977; Herman y Haas, 1975), después se diseñaron sistemas con el uso de citocininas como BA y KIN (Yasuda et al., 1985; Dublin, 1981), sin embargo, el prolongado tiempo de inducción, así como los problemas de contaminación estaban presentes en estos sistemas.

En nuestro laboratorio hemos creado un sistema embriogénico eficiente de *C. canephora*, logrando acortar los tiempos de inducción a cinco semanas así como aumentar el número de embriones por explantes a aproximadamente 250, este protocolo consta de dos fases, una llamada pre-condicionamiento en el que las plantas se cultivan en un medio con ANA y KIN durante 14 días, seguida de la etapa de inducción en la que se transfieren explantes foliares a un medio libre de auxina (Quiroz-Figueroa et al., 2006a) (Fig. 1.20). En los últimos años nos hemos enfocado en estudiar, los diversos factores que podrían estar modulando la señal que dispara que una o varias células somáticas se transformen en un embrión, entre ellos el efecto de los RCV. Hasta el momento los últimos estudios de cuantificación de auxinas endógenas, así como de sus conjugados, han revelado que la presencia de ANA y KIN, provocan un aumento importante en la auxina libre endógena así como de algunos de sus conjugados. Cuando los explantes son cultivados en el medio de inducción con BA, el AIA disminuye al igual que sus conjugados, evidenciando el dinamismo de su homeostasis, en la que posiblemente estén involucrados tanto su biosíntesis, conjugación, catabolismo como su transporte (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Debido a que durante la etapa de inducción no se requiere la presencia de auxina exógena, es un buen modelo para estudiar la dinámica de la auxina endógena y conocer la forma en que se modula el programa genético de las células que dan origen al embrión somático.

Aunque en un principio esta especie fue estudiada por su importancia económica, actualmente funciona como un modelo experimental para conocer los mecanismos bioquímicos involucrados en la transformación de una célula somática en un embrión somático. En estudios realizados anteriormente se ha comprobado que las auxinas juegan un papel muy importante en la inducción de la ES, ya que su biosíntesis *de novo*, su conjugación y transporte son cruciales para la inducción de embriones somáticos en *C. canephora* (Ayil-Gutiérrez et al., 2013; Pérez Hernández, 2013). Con los resultados obtenidos se ha avanzado en el conocimiento del papel de las auxinas en la ES, sin embargo, aún quedan muchas preguntas que resolver. El presente proyecto tiene como objetivo aportar conocimiento sobre la distribución del AIA y la localización del transportador PIN1, mediante técnicas inmunohistoquímicas.

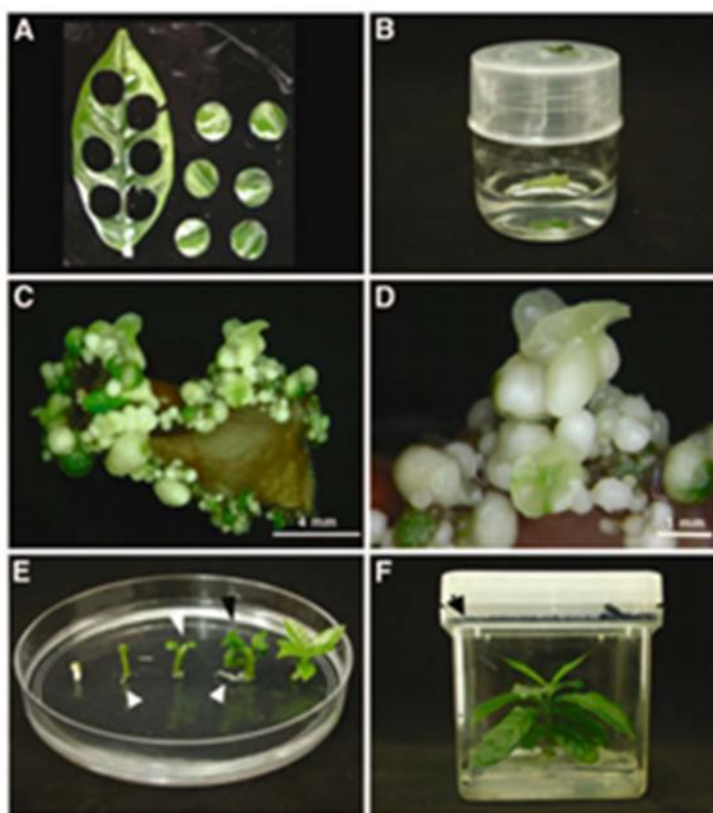


Figura 1.20 Sistema de embriogénesis directa en *C. canephora*. (A) Explantes de hojas evitando la nervadura central y los bordes. (B) Inducción de la embriogénesis somática directa. (C) Embriones somáticos obtenidos después de seis semanas de inducción. (D) Embrión cotiledonar. (E) Germinación del embrión, las flechas inferiores muestran el sistema radicular, las flechas superiores muestran el primer par de hojas. (F) Plantas de embriones somáticos después de cinco semanas (Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

1.10 JUSTIFICACIÓN

Además de la importancia económica del género *Coffea*, el sistema de ES desarrollado en nuestro laboratorio ha dado la pauta para utilizarse como un excelente modelo experimental para estudiar los mecanismos bioquímicos involucrados en la transformación de una célula somática en un embrión. En los estudios realizados anteriormente, se ha comprobado que las auxinas, juegan un papel muy importante en la inducción de la ES ya que su biosíntesis, su conjugación y transporte son críticos para la inducción de embriones somáticos en *C. canephora*. Por otro lado, estudios realizados durante la formación de embriones cigóticos de *A. thaliana* muestran que el flujo de auxina, mediado por los transportadores PIN1, son vitales para el patrón de formación y correcto desarrollo de los embriones, sin embargo, aún se desconoce su patrón de distribución durante la ES. Con los resultados obtenidos en este proyecto se pretende tener un mejor conocimiento de la dinámica del AIA y de los componentes de su sistema de transporte durante la inducción de la ES y la formación de los embriones somáticos.

1.11 OBJETIVO GENERAL

Determinar la dinámica de la distribución de auxina durante la embriogénesis somática en *C. canephora*.

1.11.1 Objetivos específicos

- 1.-Determinar la distribución del ácido-3-indol acético durante la ES en *C. canephora*.
- 2.-Determinar la localización del transportador PIN1 durante la ES en *C. canephora*.

1.12 PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- 1.- ¿Existe una distribución diferencial del AIA en los tejidos durante la ES en *C. canephora*?
- 2.- ¿Existe una distribución asimétrica PIN 1 durante la ES en *C. canephora*?

1.13 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo este estudio se siguió la estrategia mostrada en la Fig. 1.21, el proceso de ES se realizó como se reportó anteriormente (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). Las muestras para los análisis realizados en este estudio fueron tomadas durante el

preacondicionamiento, inducción y desarrollo de la ES, siguiendo la siguiente estrategia:

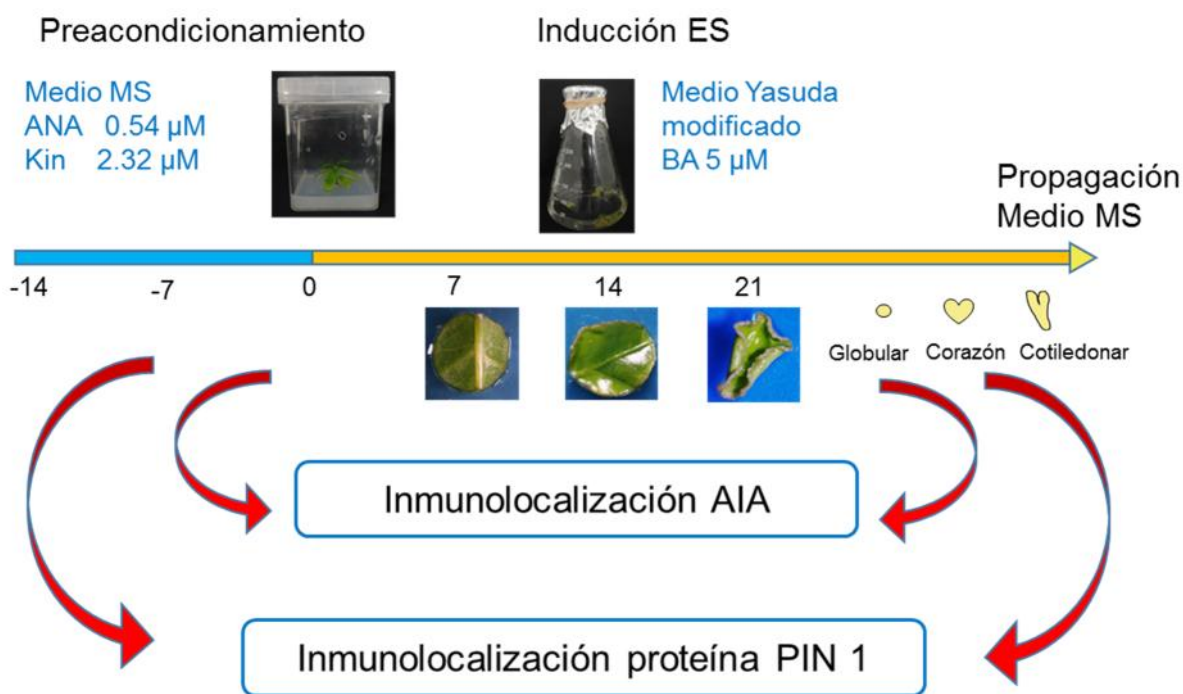


Figura 1.21 Estrategia experimental para determinar la dinámica de la distribución de auxina durante la embriogénesis somática en *C. canephora*. Los números indican los días en los cuales se tomaron las muestras para los análisis.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS DEL TRANSPORTE DEL ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *C. canephora*.

2.1 INTRODUCCIÓN

La ES no sólo se ha convertido en una herramienta biotecnológica valiosa para multiplicar especies de importancia agro-económica, sino también en un sistema experimental muy importante para la comprensión de los mecanismos bioquímicos y genéticos implicados en la conversión de una célula somática en un embrión.

Entre los diversos estímulos externos que inducen la ES, los más utilizados son los RCV, de estos compuestos los más estudiados son las auxinas, debido a que la mayoría de los sistemas embriogénicos dependen de la adición de al menos alguna auxina, ya sea antes o durante el proceso de inducción. Diversos estudios han demostrado que la auxina exógena, provoca un aumento de la auxina endógena y que el uso de inhibidores de su biosíntesis y su transporte alteran el proceso embriogénico causando deformidades en embriones (Hakman et al., 2009; Choi et al., 2001). Por lo que es probable que la auxina endógena juegue un papel clave durante la ES, sin embargo, la manera en cómo funciona este RCV no está claro. La auxina natural más abundante es el AIA, la cual participa en casi todos los procesos de desarrollo y crecimiento de las plantas (Möller y Weijers, 2009; Dubrovsky et al., 2008; Parker, 1991), lo que la ha convertido en un tema muy estudiado en la biología.

La distribución espacial del AIA es modulada por diferentes eventos, incluyendo su biosíntesis, la conversión reversible de sus conjugados, su catabolismo y por su transporte célula-célula, llamado transporte polar. Este transporte se basa en la naturaleza química del AIA, un ácido débil ($pK \sim 4.75$) que al encontrarse en el protoplasto ($pH = 5$) se encuentra mayormente protonado, permitiendo que se difunda fácilmente a través de la membrana. Sin embargo, al llegar al citosol ($pH = 7$) sufre una desprotonación, dando como resultado una molécula cargada que no pueden atravesar la membrana celular y que requiere de transportadores para su salida. La direccionalidad del flujo de auxina es dependiente de la localización de las proteínas PIN. El primer miembro de esta familia fue identificado en una mutante de *A. thaliana* que carecía de hojas y flores, mostrando un tallo en forma de alfiler

(Okada et al., 1991). Hoy en día se sabe que esta familia está compuesta por ocho miembros, de los cuales cuatro de ellos: PIN1, 3, 4, y 7 están activos durante la embriogénesis, proporcionando un sistema de regulación para la distribución de auxina (Friml et al., 2003). El uso de diversos fármacos que actúan sobre el transporte polar, como el NPA y el TIBA han mostrado aberraciones morfológicas en los embriones, como cotiledones fusionados y defectos en el meristemo apical, lo que sugiere que este mecanismo de transporte es crucial para su adecuado desarrollo (Hakman et al., 2009; Choi et al., 2001). Para analizar la concentración y distribución de auxina durante diversos procesos se han utilizado diversas técnicas: cuantificación directa del IAA, inmunolocalización utilizando anticuerpos anti-IAA y la observación de la actividad de promotores sintéticos: DR-5, *DR5v2*, y *DII-Venus*, que se han utilizado para visualizar la distribución espacial de su respuesta, dando indirectamente su patrón de distribución (Liao et al., 2015; Friml et al., 2003).

En nuestro laboratorio se ha generado un sistema embriogénico eficiente de *C. canephora*, que consta de dos fases, una llamada pre-condicionamiento en el que las plantas se cultivan en un medio con ANA y KIN durante 14 días, seguida de la etapa de inducción en la que se transfieren explantes foliares a un medio libre de auxina. Debido a que durante el periodo de inducción no se requiere la presencia de una auxina exógena, resulta ser un buen modelo para estudiar la dinámica de la auxina endógena y su participación durante la ES. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio sugieren que la adición de auxina exógena durante el preacondicionamiento promueve la biosíntesis de auxina y la formación de algunos de sus conjugados (Ayil-Gutiérrez, 2013). Durante los últimos años nuestro laboratorio se enfocado en estudiar los factores que influyen en la homeostasis del AIA durante este proceso, el presente trabajo se ha centrado en analizar su distribución y transporte mediante técnicas de inmunolocalización utilizando como herramienta la microscopía confocal.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Las plántulas de *C. canephora* se obtuvieron mediante el proceso de ES reportado anteriormente (Quiroz-Figueroa et al., 2006a); los embriones somáticos se cultivan en el medio de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) semisólido (MS: PhytoTechnology Laboratories, M524) suplementado con 29.6 μM de tiamina-HCl (Sigma T3902-25G), 550 μM mio-inositol (Sigma, I5125-500G), 0.15 μM cisteína (Sigma, C-8277), 87.64 mM sacarosa (Sigma, S539) y 0.25% (w/v) de gelrite (Sigma, G1910) ajustando el pH a 5.8 y esterilizado a 121 °C durante 15 minutos, las plántulas se mantienen en condiciones de fotoperiodo ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 16 h luz/8h oscuridad a 25 ± 2 °C subcultivándolas cada cuatro semanas (Fig. 2.1).



Figura 2.1 Plántula de *C. canephora* en medio Murashige y Skoog.

2.2.2.1 Inducción de la embriogénesis somática

Las plántulas fueron incubadas por 14 días en medio MS semisólido suplementado con ANA 0.54 μM (Sigma, N-1145) y 2.32 μM de kinetina (Sigma, K0753) en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al término de la etapa de pre-condicionamiento se cortaron explantes de 0.25 cm^2 del segundo par de hojas verdaderas y se colocaron 5 explantes por matraz conteniendo medio líquido de Yasuda (Yasuda et al., 1985) suplementado con 5 μM de BA (PhytoTechnology Laboratories, B800) se mantienen en condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C a 55 rpm (Fig. 2.2). Las muestras para posteriores análisis se tomaron los días 7, 14 y 21 posteriores a la inducción.

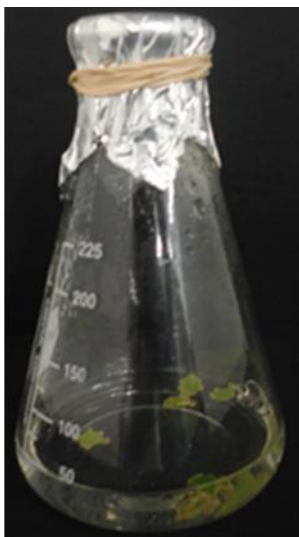


Figura 2.2 Explantes de *C. canephora* en medio de inducción Yasuda con 5 μ M de benciladenina.

2.2.3 Fijación e inclusión de la muestra

Los tejidos fueron prefijados en una solución al 3% (w/v) de EDAC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida] (Sigma, 25952-53-8) en amortiguador PBS [150 mM cloruro de sodio (J.T. Baker, 3624-01), 10 mM fosfato de sodio dibásico (Sigma, S3264), 2 mM fosfato de potasio monobásico (Sigma, P5655), pH 7.2 ajustado con NaOH 1N] durante 30 minutos. Enseguida los tejidos fueron fijados en la solución FAA [10% de formaldehído (Fischer BioReagents®, BP531), 5% de ácido acético (Sigma, 695092), 50% de etanol absoluto (Meyer®, 0390)] durante tres días a 4 °C, la solución se cambió cada 24 horas, aplicando vacío durante 15 min en cada cambio.

Para remover la solución FAA las muestras se lavaron en amortiguador PBS tres veces, posteriormente se realizó su deshidratación aplicando concentraciones crecientes de etanol, 30, 50, 70, 85% (dos veces por dos horas cada una), 96% y etanol absoluto (dos veces por media hora cada uno), en cada cambio las muestras fueron almacenadas a 4 °C aplicándoles vacío por 10 min. Después fueron incubadas durante 24 horas en butanol (J.T. Baker, 9054-03) a temperatura ambiente.

Para realizar el embebido de las muestras se les añadió butanol 100% con 10 hojuelas de Paraplast Plus® (Sigma, P3683) y fueron agitadas a 60 rpm durante toda la noche a

temperatura ambiente. A continuación fueron incubadas a 60 °C añadiéndoles de 10 a 15 hojuelas de parafina cada tres horas, tres veces, el butanol se sustituyó agregando parafina líquida cada 12 horas, tres veces; antes de realizar el embebido los moldes fueron calentados a 60 °C, la muestra fue colocada en el centro del molde con ayuda de unas pinzas previamente calentadas, enseguida fue cubierta con el casete de plástico (Fisher Scientific, 15182702) y se le añadió parafina líquida. Transcurridas 5 horas el casete se desmontó para posteriormente realizar cortes de 3-5 µm de espesor en el micrótopo (MICROM®, HM 325), los cortes fueron incubados en agua destilada a 42 °C para provocar la expansión del tejido y se colocaron en un portaobjetos tratado previamente con una solución al 0.01% (w/v) de poli-L-lisina (Sigma P8920), después fueron incubados a 37 °C durante 2 horas para remover el exceso de agua y almacenados a 4 °C para su posterior análisis.

2.2.4 Tinción de las muestras para los análisis histológicos

Para remover la parafina del tejido, los portaobjetos fueron incubados a 60 °C durante 30 min y desparafinados con xileno 100% (Sigma 534056) tres veces por 20 min y ultraclear (J.T. Baker, 3905) cuatro veces por 20 minutos. Posteriormente, el tejido se lavó con etanol absoluto y fue rehidratado en concentraciones decrecientes de etanol 96, 80, 70, 50 y 30% y por último agua destilada, durante cinco minutos cada uno.

Para el análisis histológico se realizó una doble tinción con una solución de ácido periódico y reactivo de Schiff's para teñir carbohidratos de la pared celular y naftol azul-negro para teñir proteínas. Las muestras fueron tratadas con una solución al 0.5% (w/v) de ácido periódico (Sigma, P7875) por 20 min, después se lavaron tres veces con agua destilada y fueron incubadas por 15 min en la oscuridad con el reactivo de Schiff [15.44 mM Fuchsin (Sigma, 569-61-9), 78.90 mM Na₂S₂O₅ (J.T. Baker, PI355601), 0.25% (w/v) de carbón activado (Sigma, 7440-44-0), 15% (v/v) HCl 1 N (J. T. Baker, 9535-03)], posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada y se incubaron por 5 min en una solución 16.22 mM de naftol azul-negro (Sigma, N3005), enseguida se lavaron tres veces con agua destilada, finalmente el tejido fue cubierto con 20 µl de medio de montaje y un cubreobjeto, sellando la unión con esmalte de uñas. Las muestras fueron observadas en un microscopio Axio Lab.A1 MAT HAL 50 (AXIOPLAN 490951-0002-000) y analizadas mediante el software Axiovision SE 64 Rel 4.8.

2.2.5 Inmunolocalización del ácido-3-indol acético

Las muestras fueron desparafinadas e hidratadas como se especificó anteriormente. Posteriormente los portaobjetos se calentaron en un horno de microondas durante 4 min a máxima potencia, añadiéndoles una cantidad suficiente de amortiguador de citrato [10 mM citrato de sodio dihidratado (Sigma, W302600) ajustado a pH 6 HCl 1 N y 0.05% Tween 20 (Sigma, P1379)]. Posteriormente se lavaron con amortiguador PBS tibio dos veces, después con amortiguador PBS a temperatura ambiente en tres ocasiones por 5 min, el exceso de amortiguador en el portaobjetos fue retirado con papel absorbente, posteriormente se añadieron 20 µl de 3% (w/v) de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, A2153) en PBS, los portaobjetos fueron incubados en una cámara húmeda (caja de Petri con papel filtro húmedo) por 30 min a 4 °C, después fueron lavados tres veces con amortiguador PBS durante 5 min, el exceso de PBS fue removido con papel absorbente, en seguida se añadieron 10 µl de anticuerpo primario anti-ácido-3-indol acético (Sigma, A0855) (dilución 1:100 en PBS con 1% BSA) y fueron incubados a 4 °C en una cámara húmeda por una noche, después fueron lavados con PBS durante 5 min por 3 veces, a continuación se agregaron 10 µl de anticuerpo secundario Alexa flúor 488 anti-cabra (Invitrogen A-11001), dilución 1:100 en PBS 1% BSA y se incubó en una cámara húmeda por 3 horas a 4 °C en la oscuridad. Las muestra fueron lavadas en PBS 3 veces por 10 min, el exceso de PBS fue removido con papel absorbente, finalmente el tejido fue cubierto con 20 µl de medio de montaje Vectashield® con DAPI (Vector laboratorios, H-1200) y un cubreobjeto sellando la unión con esmalte de uñas. Las muestras fueron almacenadas a 4 °C en oscuridad para su posterior análisis en el microscopio confocal (Olympus, FV100 SW) y el software (FV10 ASW 3.1).

Para uno de los testigos negativos las muestras se incubaron excluyendo de los pasos anteriores la incubación con el anticuerpo primario, en el otro caso se incubó por una noche el anticuerpo primario anti-ácido-3-indol acético (1:100) en una disolución 1 µM de AIA estándar a 4 °C. Posteriormente se añadieron 20 µl de esta mezcla a las muestras. Las muestras se procesaron como se explicó anteriormente.

2.2.6 Inmunolocalización del transportador PIN1

Para la Inmunolocalización de la proteína PIN1 las muestras se fijaron en solución FAA [10% de formaldehído (Fischer BioReagents®, BP531), 5% de ácido acético (Sigma,

695092)], se incluyeron, seccionaron y trataron como se describió previamente (Nic-Can et al., 2013). Las muestras se incubaron con el anticuerpo primario comercial anti-PIN1 (aP-20, Santa Cruz Biotechnology, ref sc-276163) (dilución 1:250 en PBS 1% BSA) en una cámara húmeda a 4 °C por una noche, posteriormente se lavaron tres veces por 10 min en amortiguador PBS, se incubaron por 3 horas a 4°C con el anticuerpo secundario anti- IgG de cabra conjugado con Alexa flúor 647 (Invitrogen A-21447) (dilución 1:200 en PBS 1% BSA) enseguida se lavaron tres veces por 10 minutos con PBS. Finalmente, el tejido se cubre con 20 µl de medio de montaje Vectashield® con DAPI (tiñe ADN) y un cubreobjeto, sellando la unión con esmalte de uñas. Para uno de los testigos negativos las muestras se incubaron excluyendo de los pasos anteriores la incubación con el anticuerpo primario, en el otro caso se incubó por una noche el anticuerpo primario anti-PIN1 (1:250) con 2 µl de péptido contra el que está dirigido a 4 °C. Posteriormente se añadieron 20 µl de esta mezcla a las muestras. Las muestras se procesaron como se explicó anteriormente.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Inducción y desarrollo de la embriogénesis somática en *C. canephora*

El proceso de inducción de ES se realizó como se reportó anteriormente (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). Las plántulas sembradas *in vitro* de *C. canephora* fueron cultivadas en un medio con una auxina ANA y una citocinina KIN por 14 días. A continuación se realizó el proceso de inducción en un medio libre de auxina (**ver materiales y métodos**). Después de 21 días en el medio de inducción aparecieron grupos de células embriogénicas en los bordes del explante (Figs. 2.3 C, Figs. 2.4 A y B). El análisis histológico mostró que los centros meristemáticos se originaron en las células de la región del mesófilo, las células meristemáticas fueron más pequeñas que las células vecinas y mostraron un citoplasma denso con un núcleo prominente (Fig. 2.4 C). A los 35 días se formaron embriones pre-globulares como resultado del crecimiento coordinado de un grupo de células, sin una conexión vascular aparente con el tejido madre (Figs. 2.4 D, E y F). A los 42 días los pro-embriones tuvieron una serie de divisiones desorganizadas formando embriones globulares, los cuales mostraron una protodermis bien definida (Figs. 2.4 G y I). Después del estadio globular se originaron las zonas de los primordios de los cotiledones indicando el inicio del estadio corazón (Fig. 2.4 H). Los embriones en estadio cotiledonar presentaron un procambium bien definido (Figs. 2.4 J y L). Los embriones somáticos mostraron simetría

bilateral y los meristemos apical y radicular fueron claramente visibles. En el día 56, el número de embriones fue de alrededor de 150 ± 20 (Fig. 2.3 G). Finalmente los embriones fueron cultivados en medio semisólido MS sin RCV para su germinación (Fig. 2.3 H).

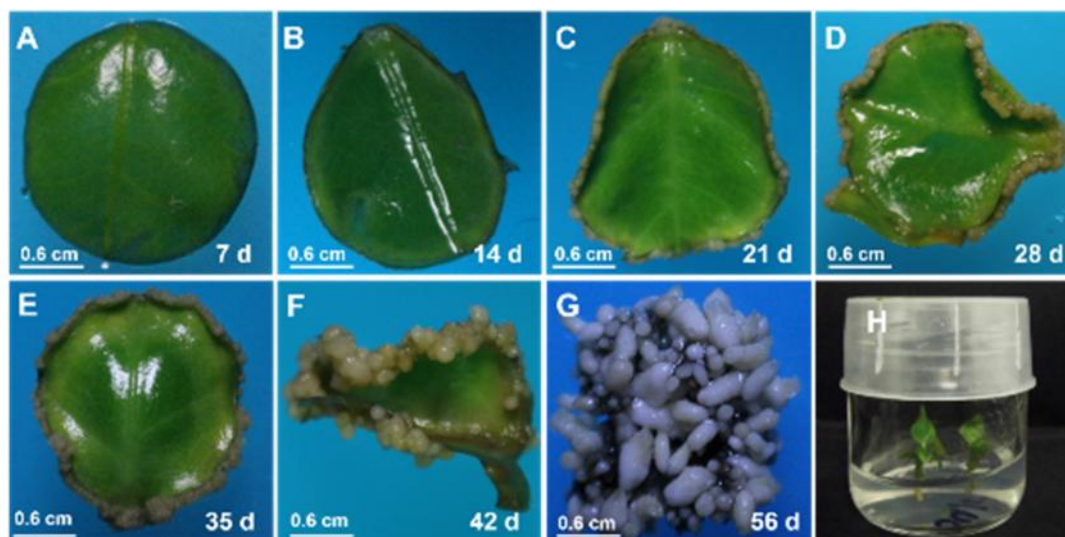


Figura 2.3 Inducción de la embriogénesis somática en explantes de *C. canephora*. Las plantas se cultivaron en medio con ANA y KIN durante 2 semanas antes de la inducción. Después del periodo de preacondicionamiento los explantes fueron cultivados en medio Yassuda líquido con BA en condiciones de oscuridad. (A, B) Explantes de 7 y 14 días después de la inducción (ddi). (C) Explantes de 21 ddi, se observa la aparición de masa proembriogénica (mp) en la periferia. (D, E) Explantes de 28 y 35 ddi, se forman las primeras estructuras embriogenicas. (F) Explantes de 42 ddi con embriones en estadio globular y corazón. (G) Explantes de 56 ddi, se observan mayormente embriones en estadios torpedo y cotiledonar (H) Plántulas de *C. canephora* cultivada en medio MS sin RCV.

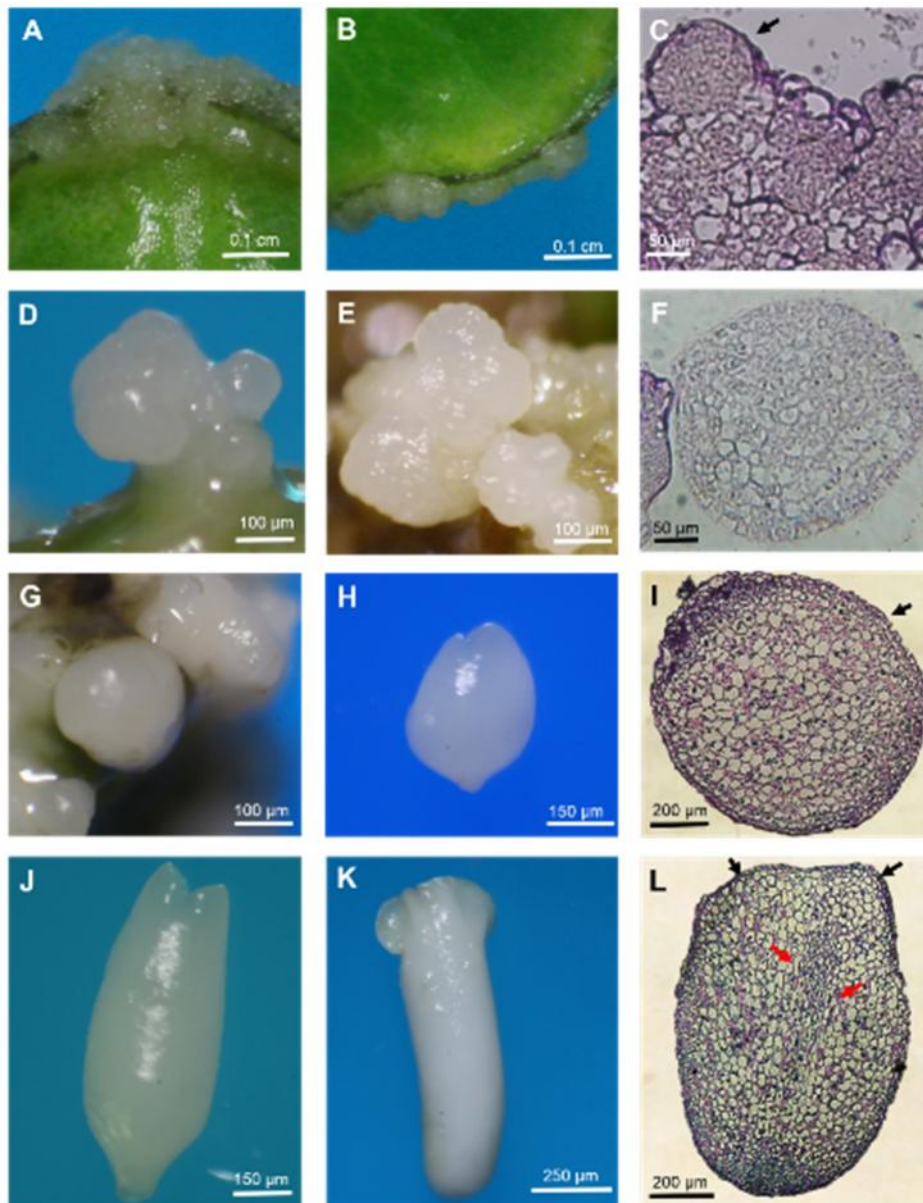


Figura 2.4 Principales estadios de desarrollo de embriones somáticos de *C. canephora*. (A, B) Masa proembriogénica de un explante foliar 21 días después de la inducción. (C) Corte histológico transversal de la masa proembriogénica formada a los 21 días. La flecha negra indica los centros meristemáticos. (D, E) Primeras estructuras embriogénicas formadas a los 35 días después de la inducción. (F) Corte trasversal de las primeras estructuras embriogénicas. (G) Estadio globular. (I) Corte transversal del estadio globular. La flecha negra indica la protodermis. (H) Estadio de corazón. (J) Estadio cotiledonar. (K) Estadio cotiledonar tardío. (L) Corte trasversal del estadio cotiledonar. Las flechas rojas indican la zona del procambium vascular, mientras que las flechas negras indican la zona de los primordios de los cotiledones.

2.3.2 Inmunolocalización del ácido 3-indol acético durante el periodo de preacondicionamiento en explantes foliares de *C. canephora*.

Para analizar la distribución del AIA en los tejidos durante la ES de *C. canephora*, se realizaron cortes transversales del tejido foliar muestreados los días -14, -7, -4 y 0 durante el pre-tratamiento y (7, 14, y 21 días después de la inducción. Se utilizaron dos anticuerpos, uno primario anti-AIA de ratón y uno secundario acoplado con Alexa Flúor 488. Se utilizó como tinción de contraste DAPI para teñir los núcleos. Para determinar la localización del AIA todas las muestras fueron analizadas en el microscopio confocal Olympus FV100 SW bajo las mismas condiciones y con la misma intensidad del láser.

Antes del pre-tratamiento el AIA se localizó subcelularmente en los cloroplastos (Figs. 2.5 A, B y C) de las células del parénquima en empalizada y esponjoso, sin embargo, en la parte final de la hoja (Fig. 2.5 D) se observó una menor intensidad de la señal comparada con la nervadura media (Fig. 2.5 A).

Con el fin de descartar la falta de señal, o una señal inespecífica, así como la autofluorescencia del tejido se realizaron diversos testigos. En uno de ellos se omitió la incubación con el anticuerpo primario, y otro aplicando solamente el anticuerpo secundario. En el canal de Alexa flúor 488 no se observó señal (Anexo Figs. A.1 y A.2), por lo que podemos concluir que el tejido carece de autofluorescencia. Para comprobar la especificidad del anticuerpo primario se realizó un testigo tratándolo previamente con AIA libre, al realizar los análisis no se observó señal inespecífica en el canal de Alexa flúor 488, por lo que podemos concluir que el anticuerpo primario no tiene reacciones cruzadas con otras moléculas endógenas del tejido y la señal observada es la de la auxina libre (Anexo Figs. A.3 y A.4). Debido a que alrededor del 95% del AIA se encuentra en su forma conjugada, se decidió realizar otro testigo incubando el anticuerpo primario con el conjugado AIA-Ala. Se observó una señal similar a la que se obtiene al no tratar el anticuerpo primario, por lo que se puede deducir que el anticuerpo contra AIA no está reconociendo al conjugado de AIA, asegurando que la señal obtenida en cada una de las muestras es de AIA libre (Anexo Figs. A.5 y A.6).

En los primeros siete días de la etapa de pre-incubación la señal que muestra la presencia de AIA aumentó. Esta señal está presente en los cloroplastos de las células parénquima en

empalizada y esponjoso (Figs. 2.6 A, B y C). En el día -4 el AIA se localizó en las mismas células, pero la señal es más intensa (Figs. 2.7 A, B, C y D). A nivel subcelular se observó que los cloroplastos no tenían AIA, y que éste se encontró alrededor de ellos (Fig. 2.7 E). En el día cero se observó una acumulación mayor de AIA (Figs. 2.8 A, B y C) en los cloroplastos de las células del parénquima tanto en la empalizada como en el esponjoso (Fig. 2.8 D).

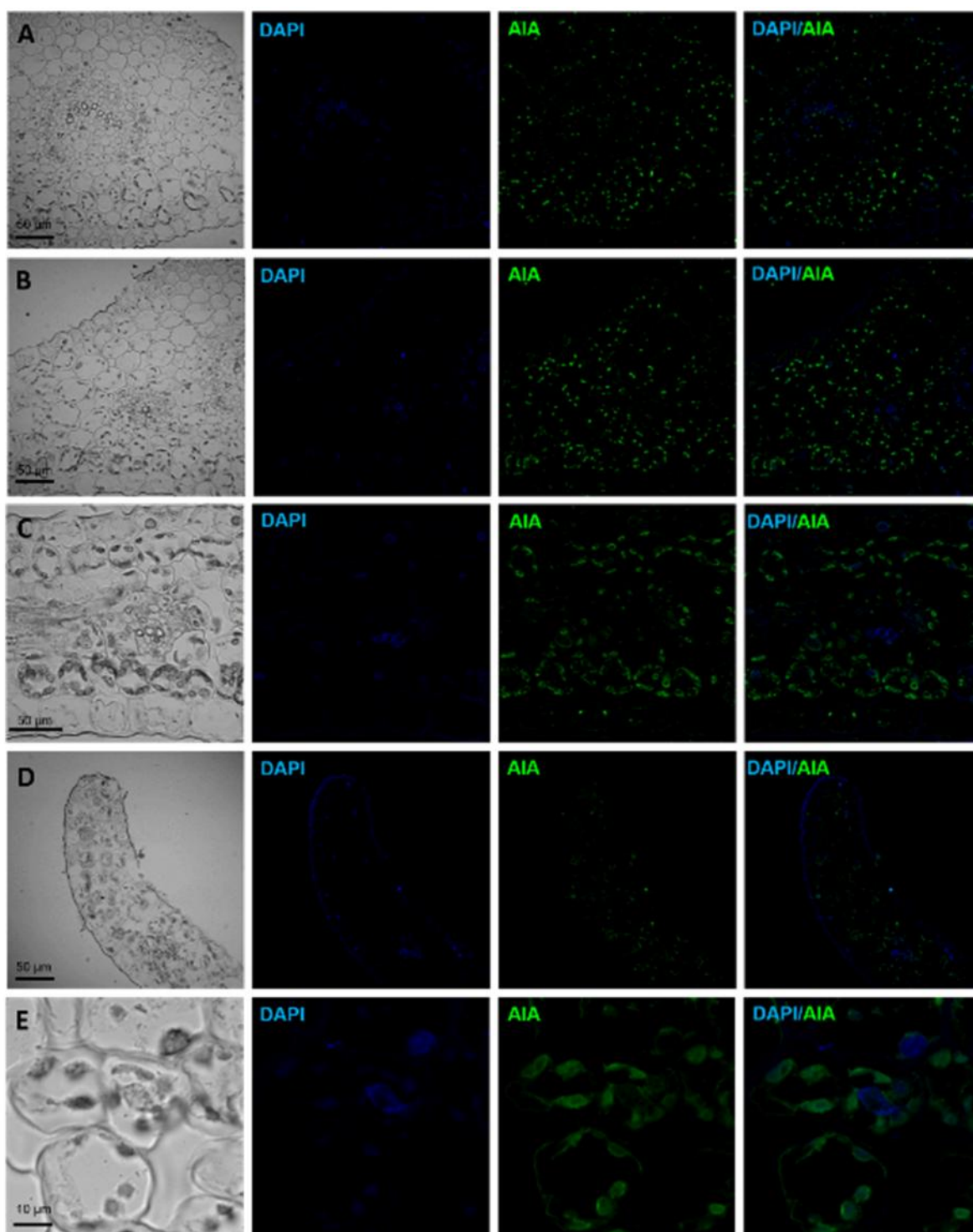


Figura 2.5 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de *C. canephora* durante el día -14 del periodo de pre-acondicionamiento. (A) Nervadura central de hoja. (B) Células aledañas a la nervadura central. (C) Parte media de la hoja. (D) Parte final de la hoja. (E) Cloroplastos de las células del parénquima en empalizada.

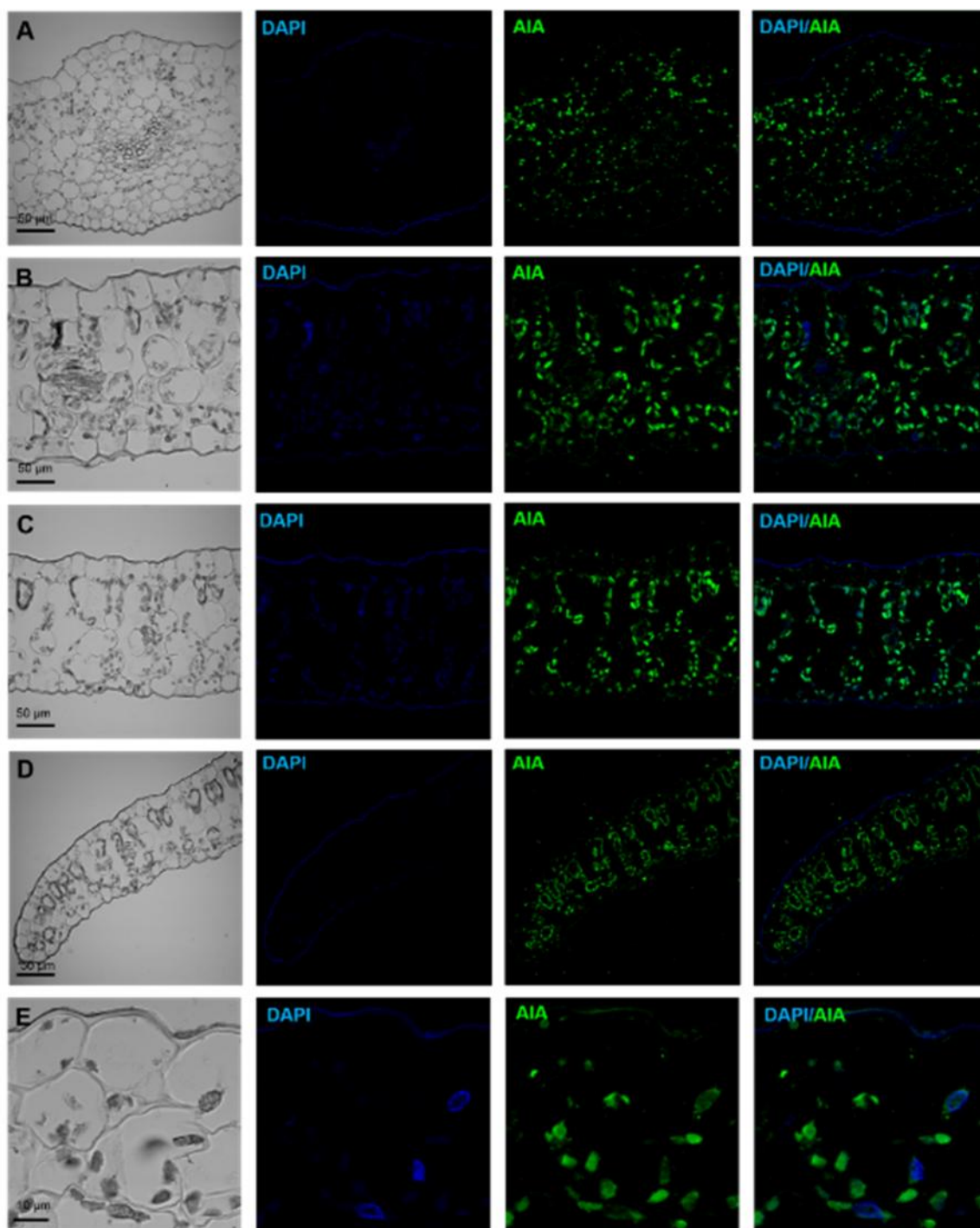


Figura 2.6 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de *C. canephora* durante día -7 del periodo de pre-acondicionamiento. (A) Nervadura central de la hoja. (B, C) Parte media de la hoja. (D) Parte final de la hoja. (E) Cloroplastos de las células del parénquima empalizada.

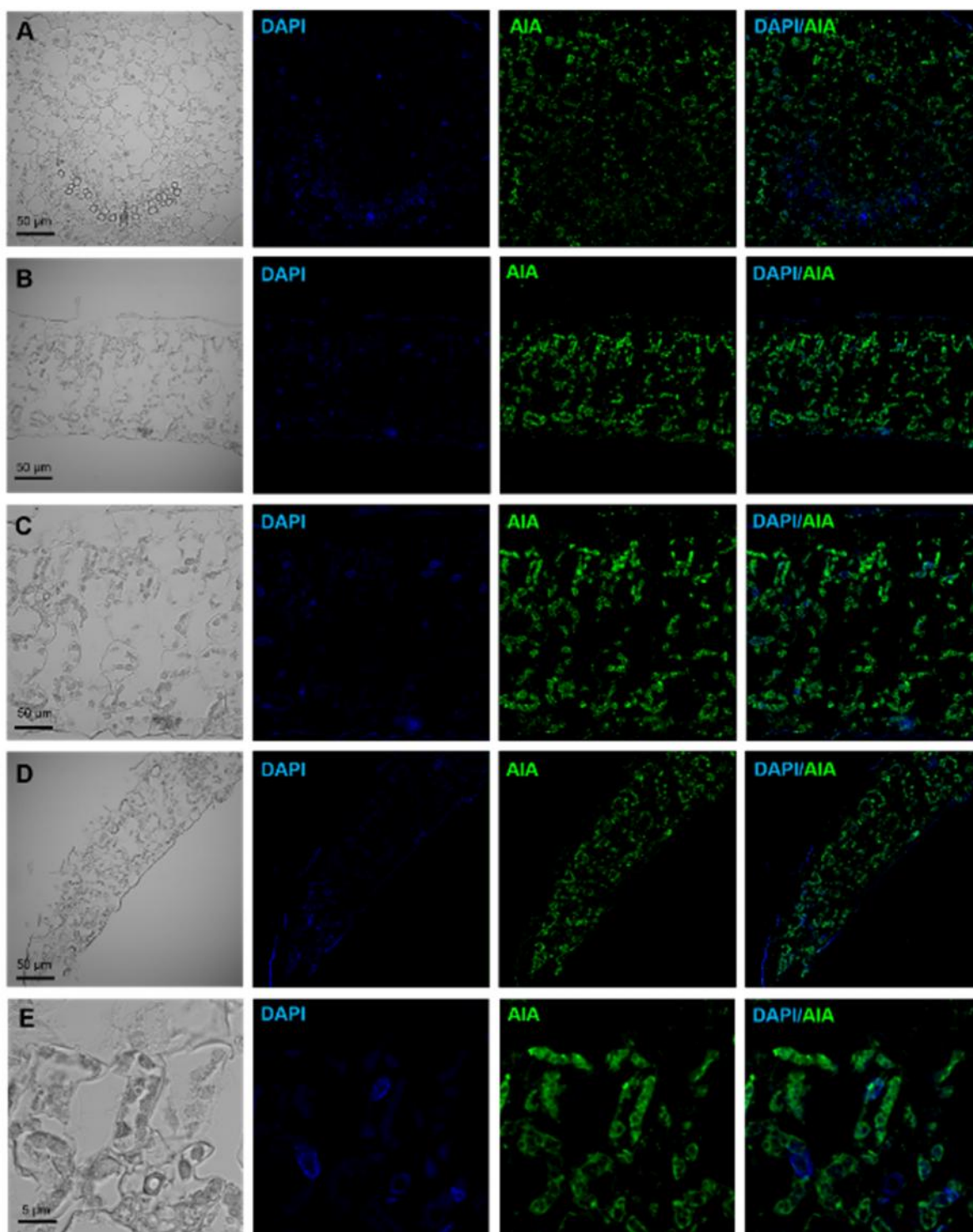


Figura 2.7 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de *C. canephora* día -4 del periodo de pre-acondicionamiento. (A) Nervadura central de la hoja. (B, C) Parte media de la hoja. (D) Parte final de la hoja. (E) Cloroplastos de las células del parénquima empalizada.

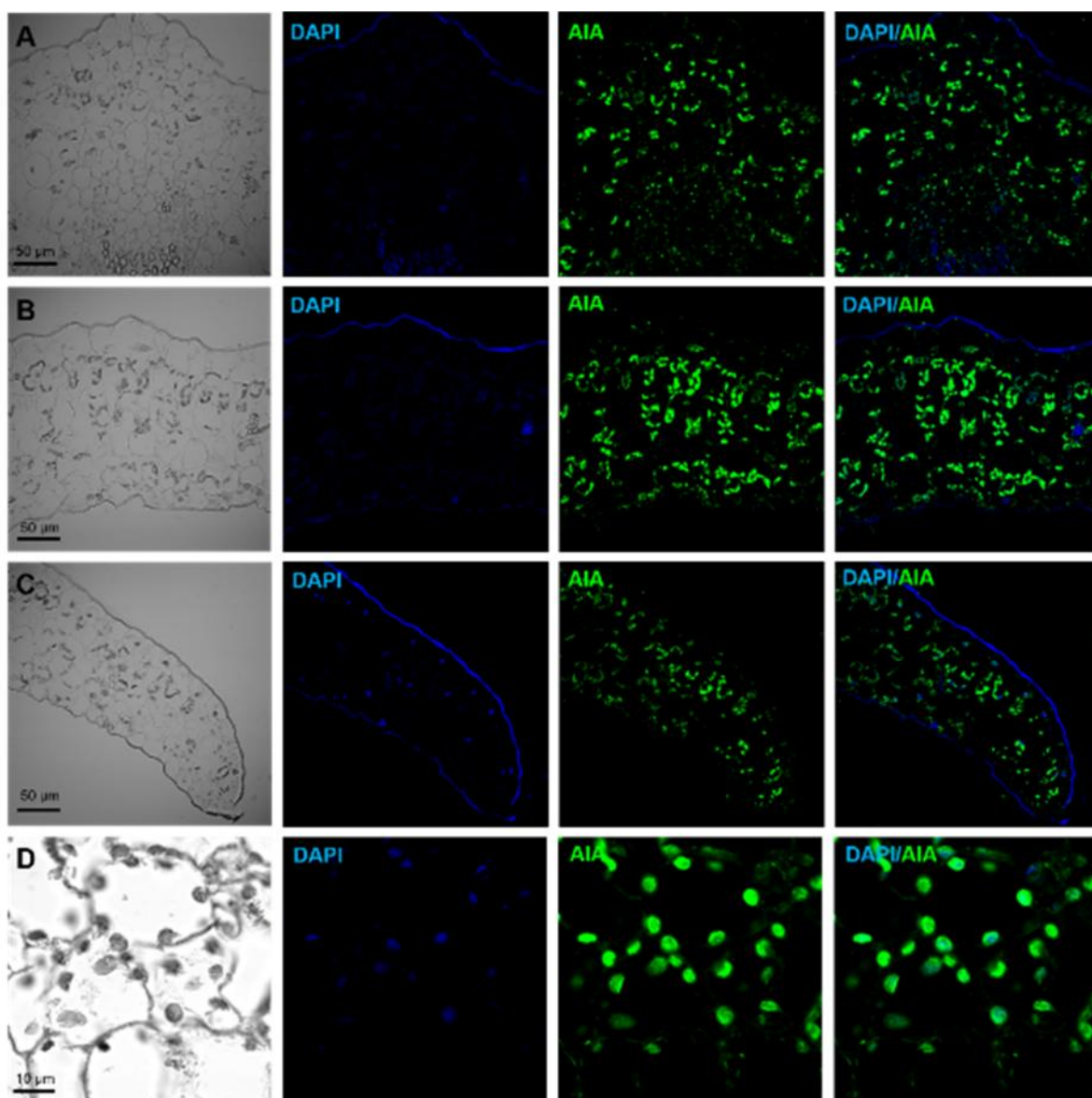


Figura 2.8 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de *C. canephora* día cero de la etapa de pre-acondicionamiento. (A) Nervadura central de la hoja. (B) Parte media de la hoja. (C) Parte final de la hoja. (D) Cloroplastos de las células del parénquima empalizada.

Para analizar la distribución del AIA durante el periodo de inducción, se realizaron experimentos de inmunolocalización, siete días después de que los explantes fueron cultivados en el medio de inducción, la acumulación del AIA disminuyó en las células de la nervadura central y en la parte media del explante (Figs. 2.9 A y B); subcelularmente se le encontró en el plasmalema y fuera de los cloroplastos (Figs. 2.9 C). En las células de la

periferia del explante se observó mayor acumulación de AIA en su citoplasma y nucleó (Fig. 2.9 D). A los 14 días la acumulación de AIA disminuyó en las células de la nervadura central y en la parte media del explante (Figs. 2.10 A y B). En las células del borde, el AIA se localizó tanto en núcleo como en citoplasma, al igual que en el día 7 (Figs. 2.10 C). En el día 21, en el tejido foliar se presentó una disminución en la señal del AIA (Figs. 2.11 A y B), mientras que en las células de la periferia se observó una mayor acumulación del AIA (Fig. 2.11 C). Estas observaciones coinciden con los datos de cuantificación reportados previamente por nuestro grupo, corroborando que durante la etapa de pre-incubación existe una acumulación de AIA, debido al tratamiento con una auxina exógena (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Durante la etapa de inducción el contenido de auxina exógena disminuyó en la mayor parte del explante. Las células de la periferia que dan origen a la masa proembriogénica mantienen una acumulación en su citoplasma y núcleo.

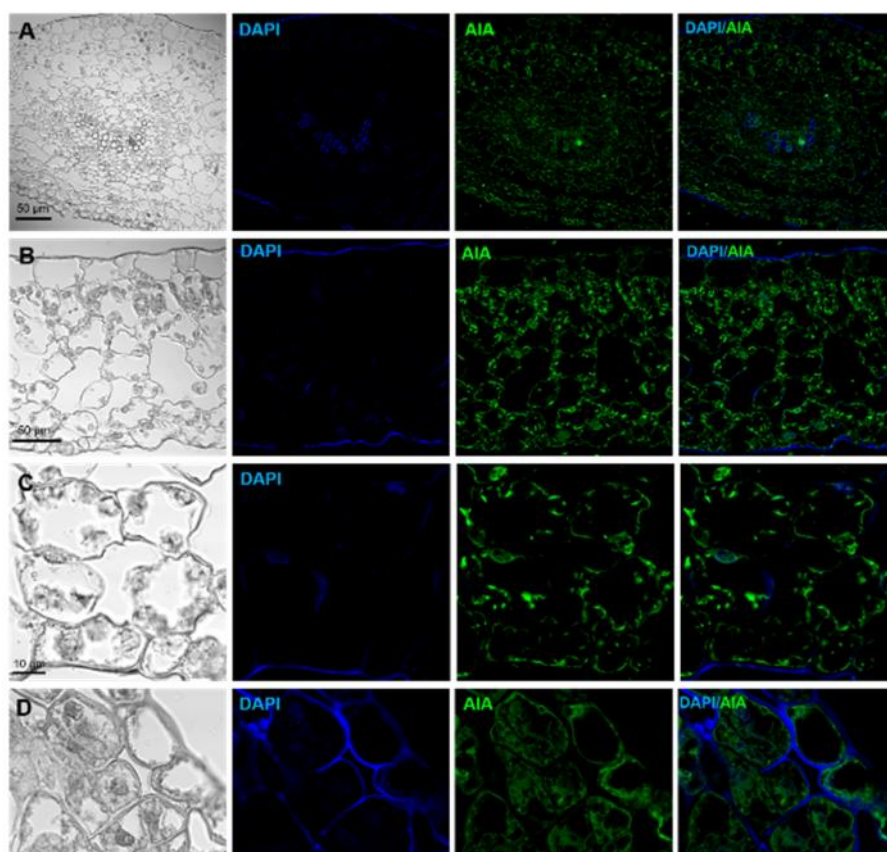


Figura 2.9 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de *C. canephora* 7 días después de la inducción de la ES en un medio libre de auxina. (A) Nervadura central. (B) Parte media de la hoja. (C) Células de la de la parte media de la hoja. (D) Células de la periferia del explante.

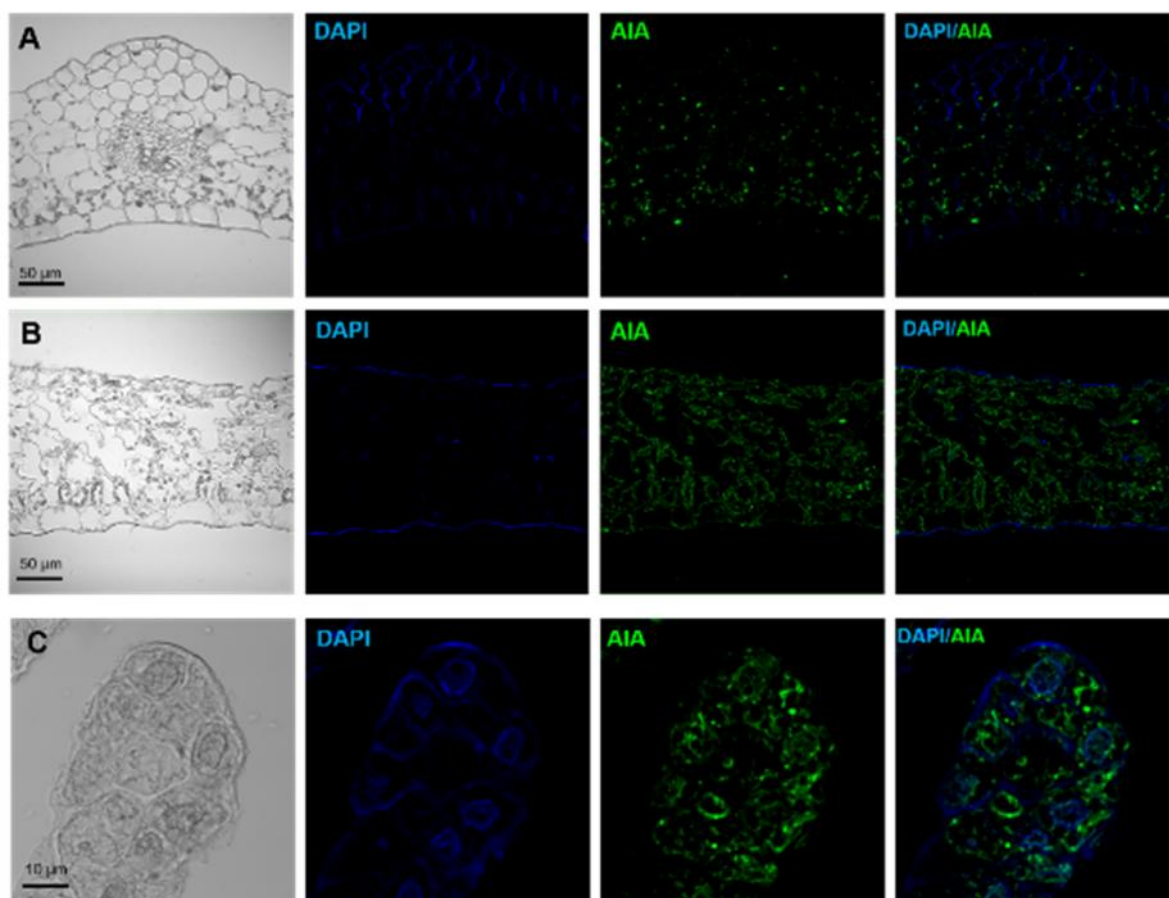


Figura 2.10 Inmunolocalización del AIA en explantes foliares de *C. canephora* 14 días después de la inducción de la ES en un medio libre de auxina. (A) Nervadura central. (B) Parte media de la hoja. (D) Células de la periferia del explante.

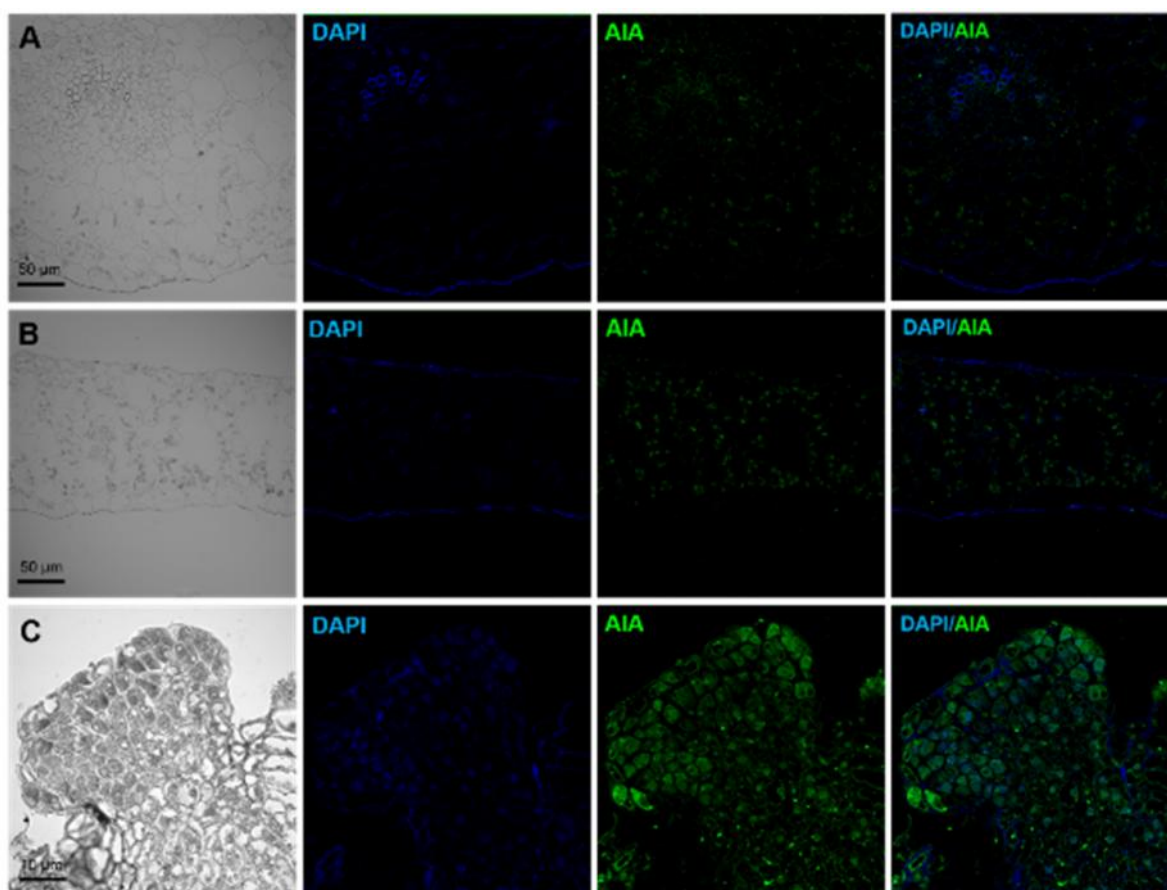


Figura 2.11 Inmunolocalización de AIA en explantes foliares de *C. canephora* 21 días después de la inducción de la ES en un medio libre de auxina. (A) Nervadura central. (B) Parte media de la hoja. (C) Células de la periferia del explante.

2.3.2 Inmunolocalización del ácido 3-indol acético en embriones somáticos de *C. canephora*.

La mayoría de lo que se sabe hoy en día sobre el papel de las auxinas durante la embriogénesis, se ha obtenido de estudios realizados en la EC de *A. thaliana*, si bien ya se sabe que comparada con la ES son dos procesos totalmente diferentes, algunas de las etapas morfológicas son similares. Para evaluar el papel del AIA endógeno durante inicios y desarrollo de la ES se decidió hacer estudios de inmunolocalización en diferentes estadios de desarrollo de embriones somáticos de *C. canephora*.

A diferencia de la EC, en nuestro modelo de estudio durante estadios tempranos los embriones mostraron una distribución uniforme del AIA (Fig. 2.12). El AIA se localiza tanto en núcleo como en el citoplasma y no hay señal en la pared celular. En embriones en el estadio globular se presentó una distribución diferencial del AIA, observándose una mayor acumulación en el citoplasma y en el núcleo de las células del protodermo cercanas al meristemo apical (Fig. 2.13) a diferencia del resto del embrión en donde se localizó en la pared celular, quizás esto se deba a que el AIA se trasporta desde otras células hacia los sitios de acumulación, al igual que en embriones somáticos de *P. abies*, los cuales mostraron una mayor acumulación de AIA en las células de la protodermis y una mayor expresión de un gen homólogo a *Pin1* de *A. thaliana* en este sitio (Palovaara et al., 2010). En el embrión en estadio corazón, se observó una mayor acumulación de AIA en el citoplasma y en el núcleo de las células del protodermo y las que darán origen a los primordios de los cotiledones (Fig. 2.14), en cambio en las células del procambium y el resto del embrión el AIA se encontró mayormente en la pared celular y en el núcleo.

En el embrión en la transición de corazón a cotiledonar se observó una mayor acumulación de AIA en el citoplasma y en el núcleo de las células de los primordios de los cotiledones (Figs. 2.15 A y B) y en las células que forman los meristemos apical y radicular, respectivamente. (Figs. 2.15 C y D).

En el embrión en estadio cotiledonar, al igual que en el embrión cigótico, se observó una mayor acumulación de AIA en las células de los meristemos apical y radicular, así como en las células que darán origen a los cotiledones. Para observar si la señal de AIA observada en la pared celular en estadios anteriores, correspondía específicamente con este sitio, se decidió, realizar la tinción de la pared con blanco del calcoflúor (BC). La señal de AIA se

solapo con la señal de BC, en las células inferiores a los primordios de los cotiledones y superiores al meristemo radicular (Fig. 2.16). Estos resultados coinciden con la distribución del AIA en embriones de otras especies como *P. abies* y *B. napus* (Rodríguez-Sanz et al., 2015) en los cuales el AIA se distribuye diferencialmente en las mismas células, por lo tanto quizás durante este tiempo el transporte esté jugando un papel crucial para dar destino a las células que darán origen a los tejidos y órganos fundamentales de las plantas. Para descartar autofluorescencia e inespecificidad del anticuerpo, se realizaron los testigos mencionados anteriormente. En ambos testigos no se observó señal inespecífica (Anexo Figs. A.7 y A.8).

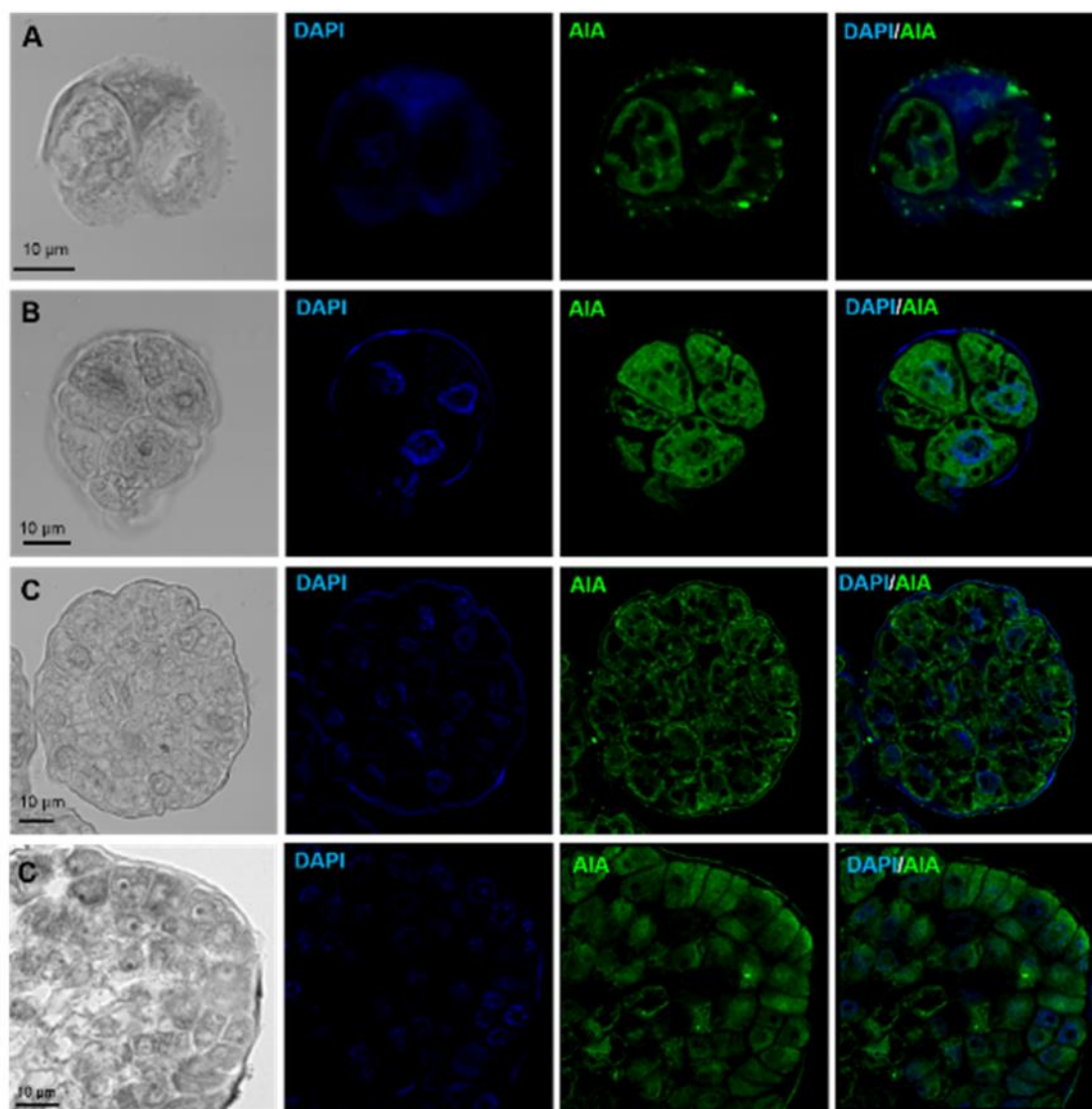


Figura 2.12 Inmunolocalización del AIA en embriones pre-globulares de *C. canephora*. (A, B) Embriones pre-globulares 21 días posteriores a la inducción. (C) Embriones pre-globulares 28 días posteriores a la inducción.

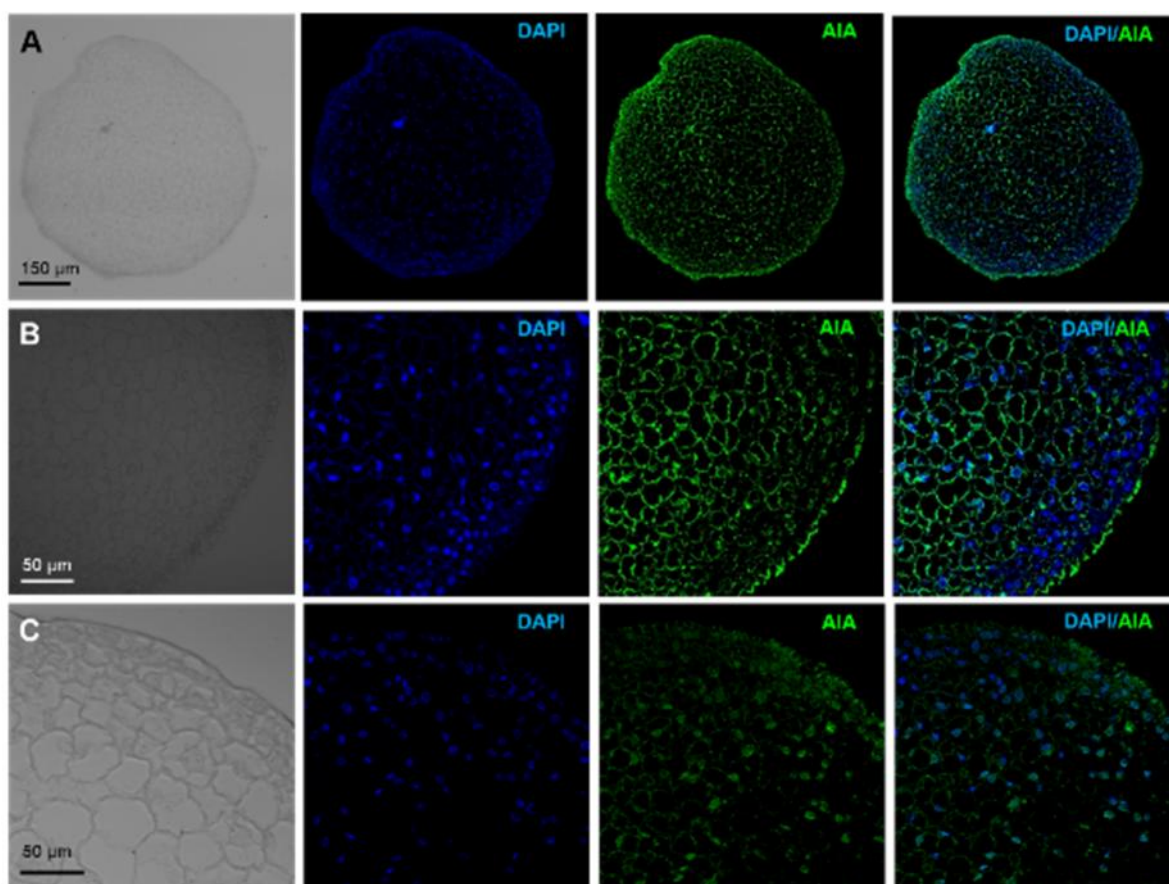


Figura 2.13 Localización del AIA en embrión somático de *C. canephora* en estadio globular tardío. (A) Embrión somático globular-transición corazón 10X, el AIA se encuentra mayormente en las células del meristemo apical y en las células que darán origen a los cotiledones. (B) Células del meristemo radicular 40X. (C) Células del protodermo.

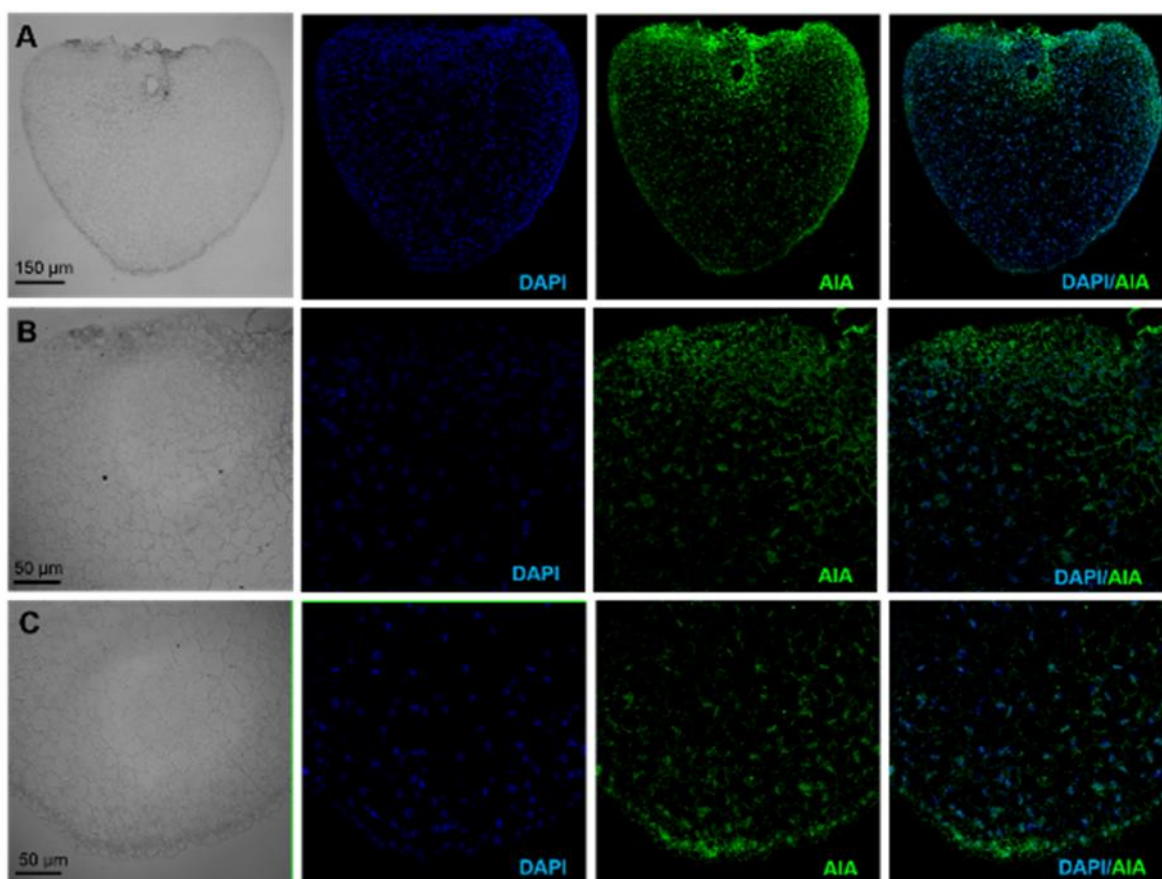


Figura 2.14 Localización del AIA y DAPI en embrión somático estadio corazón de *C. canephora*. (A) Embrión corazón 10X el AIA se encuentra mayormente en las células del protodermo y en células que darán origen a los cotiledones. (B) Células del protodermo 40X, el AIA se encuentra en el citosol y en el núcleo, en las células adyacentes se localiza únicamente en el núcleo y al interior de la pared celular. (C) Meristemo radicular.

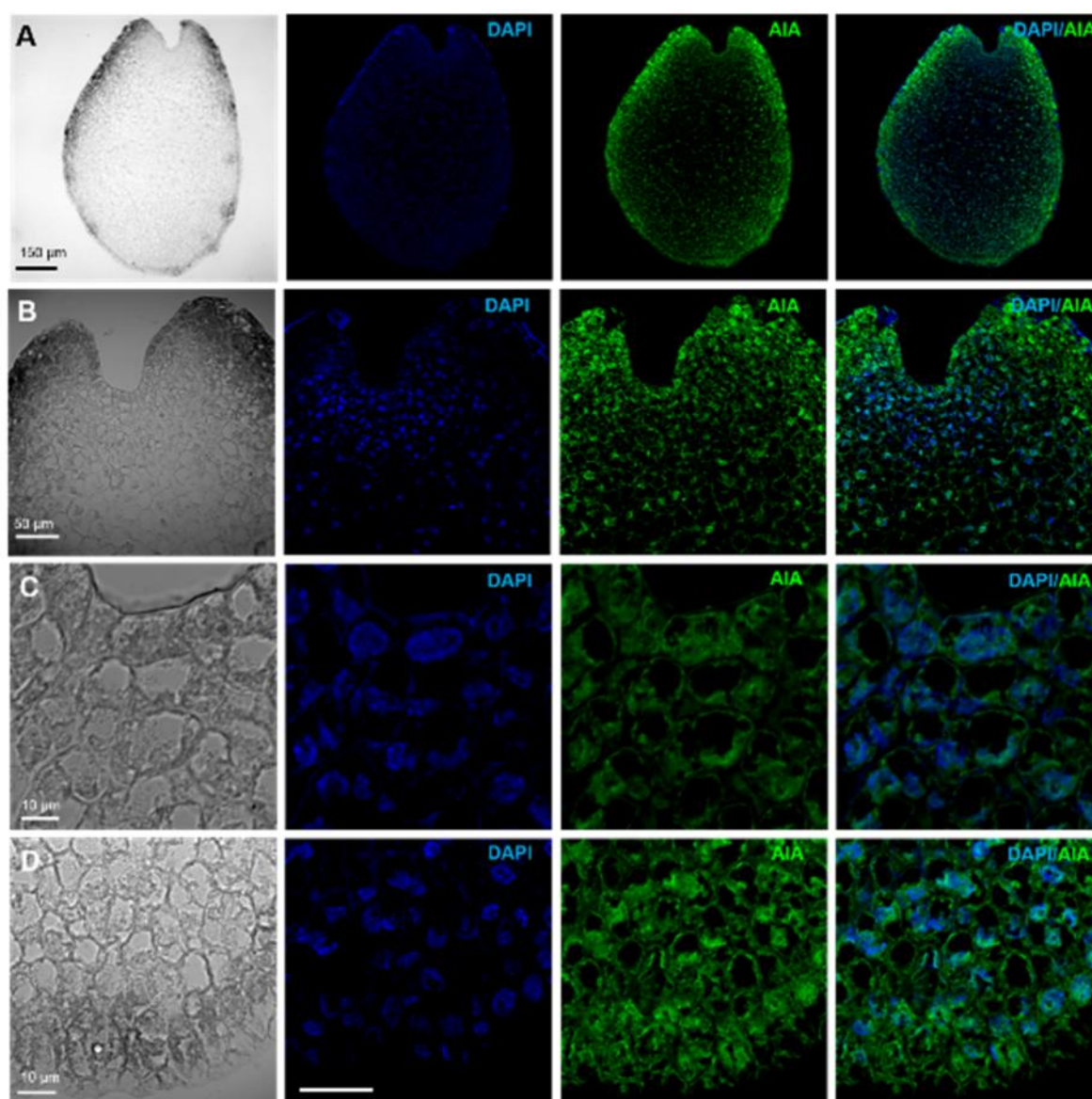


Figura 2.15 Localización del AIA y DAPI en embrión somático estadio transición corazón-cotiledonar de *C. canephora*. (A) Embrión corazón 10X el AIA se encuentra mayormente en las células del protodermo y en células que darán origen a los cotiledones. (B) Células del protodermo 40X, el AIA se encuentra en el citosol y en el núcleo, en las células adyacentes se localiza únicamente en el núcleo y al interior de la pared celular. (C) meristemo apical. (D) Meristemo radicular.

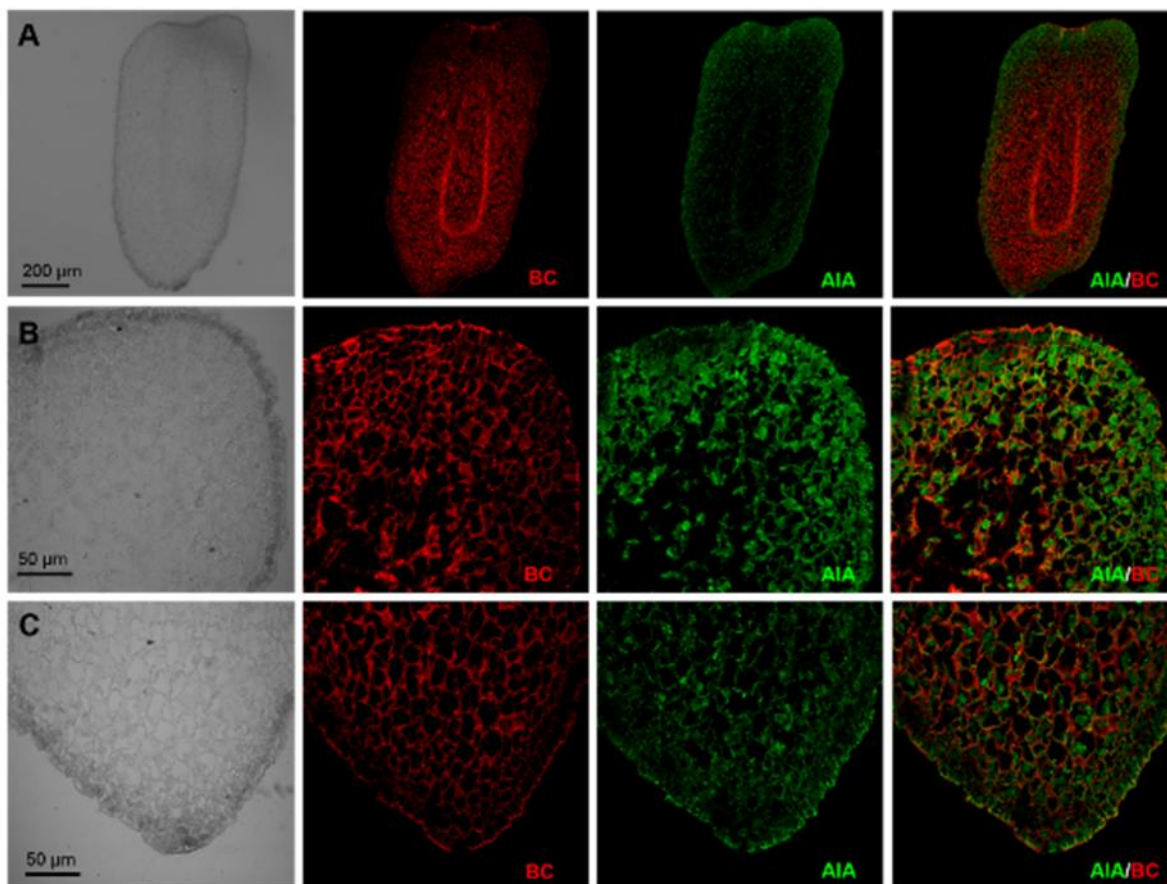


Figura 2.16 Localización del AIA y BC que tiñe la pared celular en embrión somático estadio cotiledonar de *C. canephora*. (A) Embrión estadio cotiledonar 10X el AIA se encuentra mayormente en las células de los cotiledones, meristemo apical y radicular. (B) Cotiledón 10X en las células del protodermo y meristemo apical, el AIA se localiza en el citosol. (C) Células del meristemo radicular 40X, el AIA se localiza en el citosol.

2.3.1 Inmunolocalización de la proteína PIN en embriones somáticos de *C. canephora*.

Estudios en *A. thaliana* han sugerido que el transporte de auxina es esencial para una correcta formación del eje embrionario, debido a que participa en la primera distribución diferencial de AIA de la célula basal, que dará origen al suspensor, a la célula apical, participando en la formación de la simetría bilateral en los estadios posteriores y en la correcta formación de los primordios de los cotiledones (Friml et al., 2003). Para evaluar el papel del transporte durante el proceso de ES en *C. canephora* se decidió realizar la inmunolocalización de uno de los transportadores, mediante el uso de un anticuerpo comercial dirigido contra el PIN1 de *A. thaliana*.

Durante los primeros estadios embriogénicos no se observó presencia del transportador PIN1 en el plasmalema, se distribuyó mayormente en el citoplasma (Fig. 2.17), mientras que en el estadio globular PIN1 se localizó en el plasmalema de las células del interior del embrión y en menor cantidad en las células de la protodermis (Fig. 2.18). En el estadio de corazón PIN1 se localizó en el plasmalema de las células que darán origen al tejido provascular (Fig. 2.19), y puesto que en este estadio se observó una mayor acumulación de auxina en las células que darán origen a los primordios de los cotiledones, es posible que PIN1 esté actuando en el transporte de auxina hacia estos sitios.

En el estadio cotiledonar se observó una mayor abundancia de PIN1 en las células del tejido provascular y en el meristemo radicular (Fig. 2.20), sugiriendo que desempeña un papel en el transporte de auxina para que la auxina se acumule en las células de los primordios de los cotiledones y en el meristemo radicular.

Para descartar señales por autofluorescencia o inespecificidad, se realizaron dos testigos, uno omitiendo el anticuerpo primario y otro bloqueando el anticuerpo primario con el péptido contra el que fue diseñado, en ambos testigos no se observó señal (Anexo Figs. A.9 y A.10).

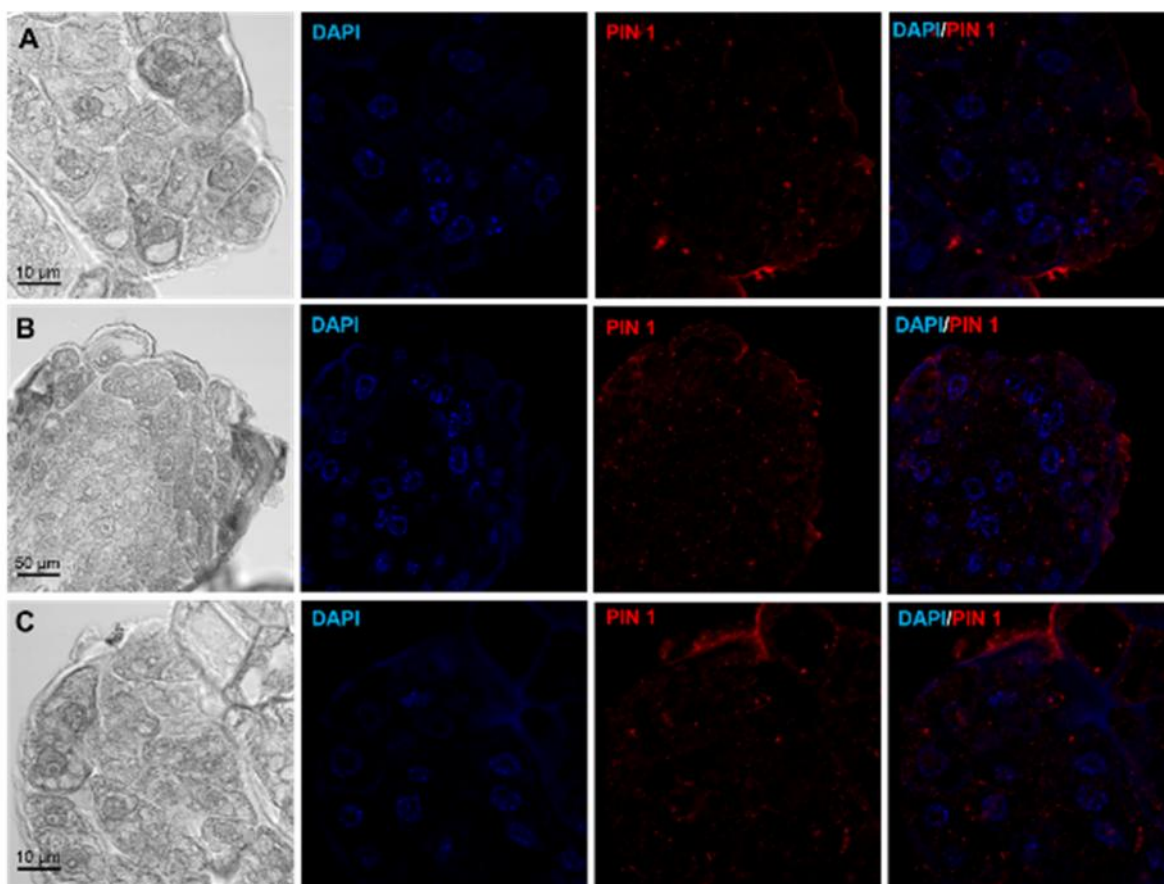


Figura 2.17 Localización del transportador PIN1 en pro-embrións de *C. canephora*. (A) Proembrión formado después de 21 días de inducción de la ES. (B y C) Proembrión formado a los 28 días después de la inducción de la ES.

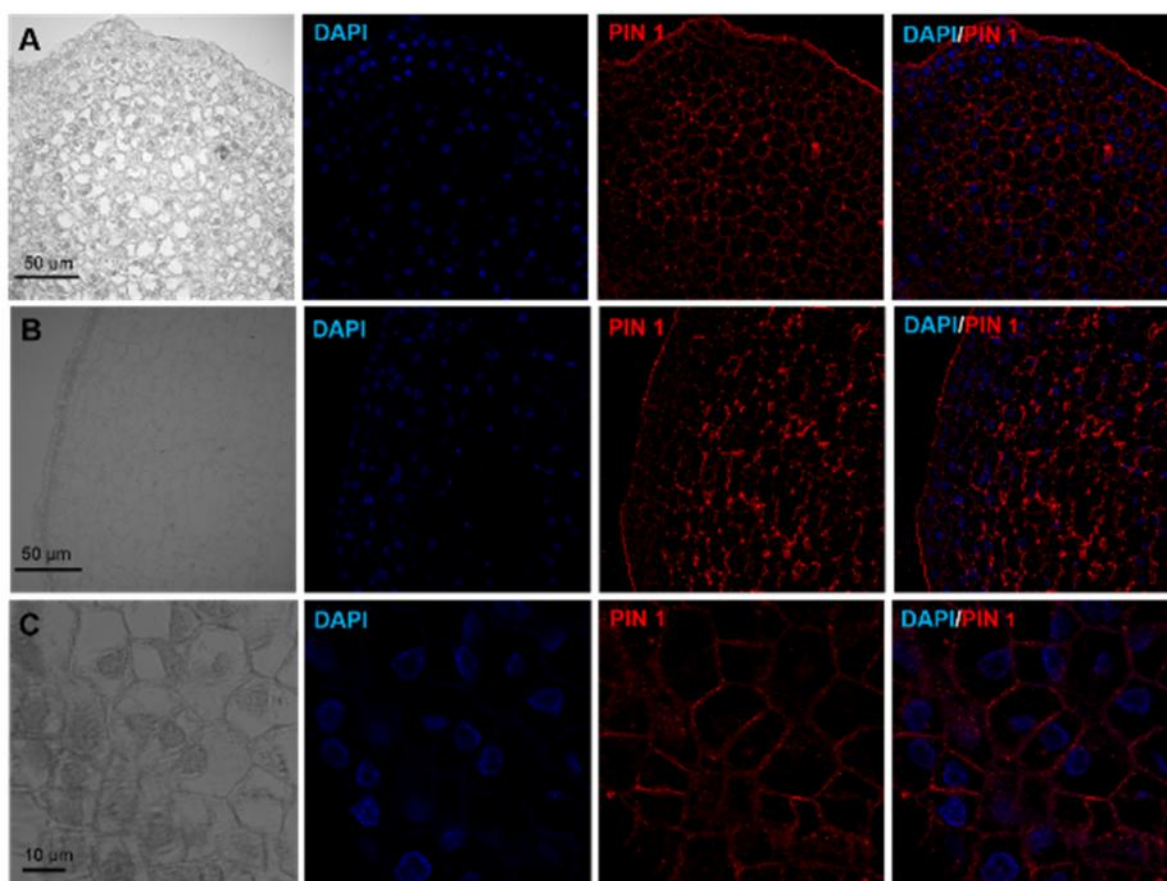


Figura 2.18 Localización del transportador PIN 1 en embrión somático en el estadio globular de *C. canephora*. (A y B) Embrión en el estadio globular. (C) Células que darán origen al protodermo. PIN1 se localiza en el plasmalema de todas las células. Se observó una mayor señal en las células del centro del embrión.

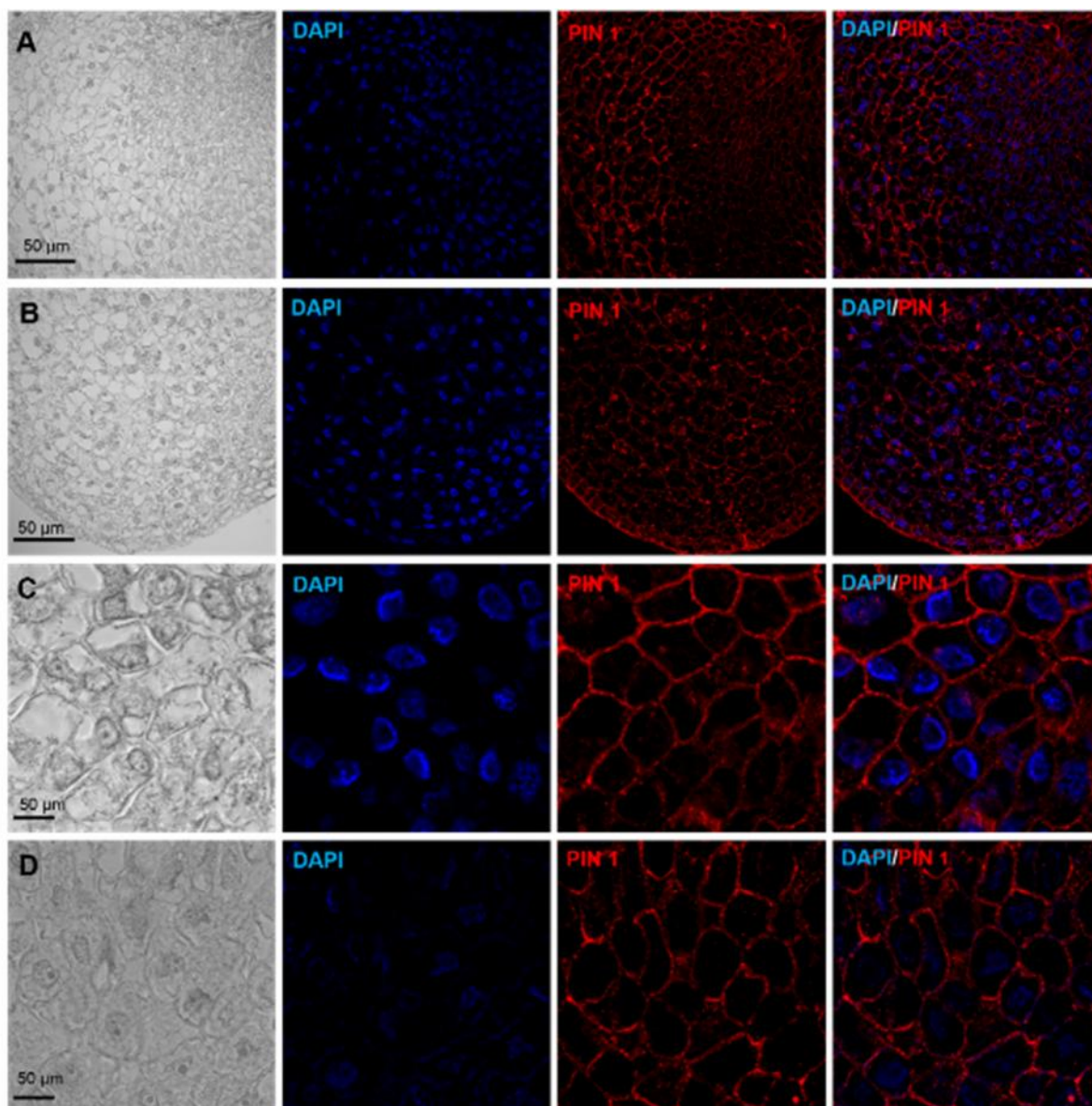


Figura 2.19 Localización del transportador PIN 1 en un embrión somático en el estadio de corazón. (A) Células que darán origen a los primordios de los cotiledones. (B) Células formadoras del meristemo radicular. (C) Acercamiento de las células de los primordios de los cotiledones. (D) Acercamiento de las células del meristemo radicular.

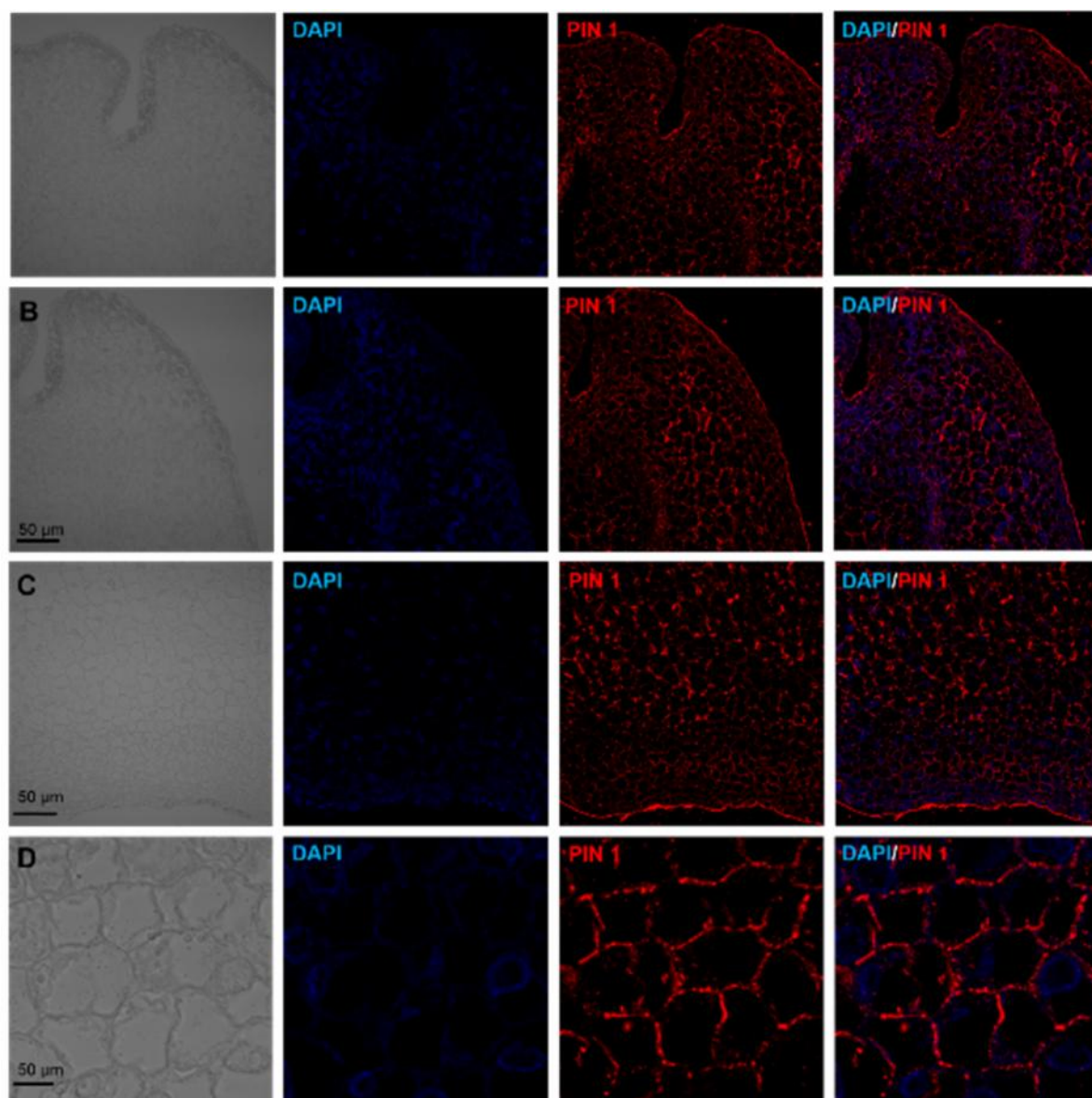


Figura 2.20 Localización del transportador PIN 1 en embriones somáticos en el estadio cotiledonar. (A y B) Primordios de los cotiledones. PIN 1 se localizó mayormente en el plasmalema de las células del procambium vascular. (C y D) Células del meristemo radicular. PIN1 se localizó mayormente en el plasmalema de las células superiores al meristemo.

2.4 DISCUSIÓN

La ES se ha convertido en una poderosa herramienta para la regeneración *in vitro* de especies de importancia económica, sin embargo, a pesar de sus múltiples aplicaciones, los mecanismos celulares, fisiológicos, genéticos, moleculares y bioquímicos involucrados en el proceso aún son poco entendidos. Una de las estrategias comunes para inducir la ES *in vitro*, es el uso de RCV en diferentes combinaciones y concentraciones. Las más utilizadas son las auxinas, compuestos de baja masa molecular, que tienen un papel crucial en la ES, debido a que el uso de inhibidores de su biosíntesis y transporte alteran el proceso embriogénico (Hakman et al., 2009; Choi et al., 2001).

La dinámica espacio-temporal del AIA es regulada por diversos mecanismos, como su biosíntesis, transporte, conjugación y degradación (Wang et al., 2015; Ludwig-Müller, 2011; Mravec et al., 2009). Se sabe que la auxina puede ser sintetizada mediante cinco rutas, cuatro dependientes de triptofano y una independiente, debido a su gran complejidad no todas las enzimas han sido caracterizadas; actualmente la ruta más detallada es la vía cuyo intermediario es el AIP, ya que consta únicamente de dos pasos, mediados por las enzimas TAA1 y YUCAA (Stepanova et al., 2011; Stepanova et al., 2008). Diversos estudios han mostrado que la auxina exógena promueve la biosíntesis de auxina endógena (Pescador et al., 2012; Vondráková et al., 2011; Michalczuk et al., 1992) y también su almacenamiento mediante la formación de conjugados reversibles (Michalczuk et al., 1992; Cohen y Bandursky, 1982). Por lo que tanto la auxina exógena como endógena desempeñan funciones vitales durante la ES.

El sistema de ES de *C. canephora*, desarrollado en nuestro laboratorio es dependiente de la etapa de pre-incubación, periodo en el que la acumulación de auxina libre y conjugada incrementa, presentando una mayor concentración el día en que los explantes son transferidos al medio de inducción (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Análisis previos en la expresión de los genes que codifican a las enzimas TAA1 y YUCCA mostraron que tienen una mayor expresión durante el periodo de pre-condicionamiento, evidenciando una participación importante de esta ruta (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Estos resultados sugieren que un tratamiento con auxina exógena promueve la acumulación de auxina endógena, posiblemente mediante la activación de su biosíntesis, debido a que nuestro sistema es dependiente de esta etapa, probablemente el incremento de AIA es clave para preparar a

las células para la fase de inducción, al igual que la ES en *D. carota*, modelo en que el proceso de inducción se lleva a cabo en presencia de 2,4-D, el cual induce la biosíntesis de AIA dependiente de triptofano (Ribnicky et al., 1996; Michalczuk et al., 1992).

Para observar los sitios de acumulación de auxina, durante el inicio y el desarrollo de la ES en *C. canephora*, se realizaron experimentos de inmunolocalización del AIA mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-AIA. Los resultados de nuestro trabajo se correlacionan con los datos de cuantificación previos (Ayil-Gutiérrez et al., 2013), ya que se observó una acumulación progresiva de AIA durante la etapa de pre-incubación, en las células del parénquima en empalizada y del tejido esponjoso, los experimentos en los que el anticuerpo primario fue saturado con AIA estándar mostraron que no existe una reacción cruzada con otros compuestos relacionados con su metabolismo, por lo que la señal observada es de auxina en su forma libre.

El AIA se localizó subcelularmente en la periferia e interior de los cloroplastos; esto no es de sorprenderse, ya que estudios realizados en protoplastos tratados con triptofano marcado muestran que alrededor del 30-40% del AIA es sintetizado en estos organelos (Göran et al., 1990; Goran et al., 1982) por otra parte existe evidencia que el AIA sintetizado en el citosol puede ser transportado a los cloroplastos (Folke et al., 1993), sin embargo, aún no se conoce el mecanismo de este transporte.

Durante la etapa de inducción la acumulación de AIA disminuyó, al igual que en los experimentos realizados previamente (Ayil-Gutiérrez et al., 2013), sin embargo, su distribución en los explantes fue diferencial. Las células de la periferia, mostraron una mayor señal tanto en su citoplasma y núcleo, en relación a otras células del explante. De manera similar ocurre durante la ES en *A. thaliana* y *Q. suber*, sistemas en los que las células de los centros meristemáticos presentan una acumulación mayor de auxina, en comparación con células vecinas, lo que sugiere que el AIA tiene un papel muy importante durante la formación de células proembriogénicas (Rodríguez-Sanz et al., 2014; Su y Zhang, 2009). Por otra parte, ensayos de inmunolocalización del AIA, durante la embriogénesis en *B. napus*, muestran una acumulación de AIA mayor en embriones multicelulares durante los estadios iniciales; por el contrario, las microesporas que no responden a la inducción mostraron una acumulación baja de AIA. En diversos sistemas *in vitro* se ha visto que las auxinas, juegan una función esencial durante el ciclo celular, ya que su ausencia provoca

que la división celular se detenga (Corsi y Avanzi, 1970), además de que afecta la regulación transcripcional y pos-transcripcional de los componentes del ciclo celular (Perrot-Rechenmann, 2010).

La mayor parte del conocimiento que se tiene en actualidad sobre la distribución del AIA durante el inicio y los estadios posteriores en la embriogénesis, se ha obtenido mediante estudios en la EC en *A. thaliana*, la cual inicia con una división asimétrica del cigoto formándose una célula basal y una de menor tamaño llamada apical, que presenta una mayor acumulación de auxina (Friml et al., 2003), debido a que la expresión de genes que codifican a las enzimas involucradas en su biosíntesis se localizan en el suspensor, se sugiere que la auxina es transportada desde el suspensor hacia la célula apical, estableciendo el primer gradiente diferencial de auxina (Robert et al., 2013). En el estadio globular, la distribución de auxina se invierte, mostrando una mayor acumulación en la hipófisis, originada por la posición de los transportadores PIN7, PIN4 y PIN1, siendo este último el que cambia su polaridad en el estadio de corazón, ubicándose en la parte basal de las células que darán origen al tejido provascular, provocando una acumulación de auxina en las células que darán origen a los primordios de los cotiledones (Friml et al., 2003).

En nuestro sistema embriogénico, a diferencia de la EC, los embriones tempranos tienen divisiones irregulares y carecen de suspensor, sin embargo, los cambios morfológicos posteriores son similares. En los estadios iniciales se observó una distribución de auxina uniforme, similar a lo que sucede en embriones de *B. napus*, los cuales no presentan una distribución diferencial de auxina (Rodríguez-Sanz et al., 2014). Sin embargo en los estadios corazón y cotiledonar el AIA se distribuyó diferencialmente acumulándose principalmente en el citoplasma y núcleo de las células formadoras de la protodermis, primordios de los cotiledones y meristemo radicular similar a lo que sucede en embriones de *B. napus* (Rodríguez-Sanz et al., 2014; Soriano et al., 2014) y la gimnosperma *P. abies*, que en contraste con *A. thaliana* tienen entre 3-4 cotiledones, los cuales presentan una mayor acumulación de AIA (Hakman et al., 2009). Estos resultados sugieren que durante la formación del embrión somático al igual que la EC la auxina se acumula en sitios precisos, posiblemente como producto de su transporte polar, participando en la formación de los tejidos fundamentales del embrión.

Debido a que subcelularmente el AIA se presentó en los núcleos, posiblemente la señalización de la auxina tenga un papel central, ya que se sabe que a concentraciones elevadas funciona como un puente entre la interacción de la subunidad TIR1/AFB del complejo ubiquitina ligasa SCF^{TIR1/AFB} y la proteína Aux/AIA, originado que estas últimas sufran un proceso de poliubiquitinación y sean degradadas por el proteosoma 26S (Ramos et al., 2001; Deshaies, 1999), produciendo así la liberación de los ARF, los cuales regulan la expresión de genes de respuesta a auxina. Se sabe que en embriones cigóticos de *A. thaliana* la degradación de la proteína Aux/AIA, permite la actividad de factor de transcripción MP/NPH4, para reprimir la transcripción de los genes *CUP-SHAPED COTYLEDON1* (CUC), implicados en la formación del meristemo apical y separación de los cotiledones (Aida et al., 1999).

Para evaluar la participación del transporte durante la ES, se decidió realizar experimentos de inmunolocalización, mediante el uso de un anticuerpo comercial dirigido contra PIN 1 de *A. thaliana*. Puesto que existía la posibilidad de que el anticuerpo anti-PIN1 identificara a otros miembros de la familia PIN, se decidió realizar testigos saturando al anticuerpo primario con el péptido contra el que fue diseñado, los cuales no mostraron señal, por lo que se puede concluir que el anticuerpo utilizado no tiene reacción cruzada con otras proteínas. Nuestros resultados muestran que en las células embriogénicas PIN1 se localiza en el citosol, sin embargo, en embriones en estadio globular PIN 1 se localizó en el plasmalema de las células internas del embrión y en los estadios corazón y cotiledonar se observó una mayor señal en el plasmalema de las células del tejido provascular y meristemo radicular, resultados similares se obtuvieron en estudios de hibridación *in situ* de un gen homólogo a *PIN1*, en embriones somáticos de *P. abies*, los cuales revelaron que, al igual que en la EC, este gen se expresa en todas las células durante estadios tempranos de desarrollo. En estadios posteriores sus sitios de expresión se restringe a los cotiledones y células del vascular (Hakman et al., 2009).

Por otra parte, experimentos realizados con TIBA un inhibidor del transporte polar de auxina, muestran malformaciones en los embriones somáticos de *C. canephora* (Pérez Hernández, 2013), afectando su simetría bilateral provocando la fusión de cotiledones, similar a lo que sucede en otras especies como *Daucus carota*, *Panax ginseng*, *Picea abies* y *Brassica juncea* (Larsson et al., 2008; Ramarosandratana y Van Staden, 2004; Choi et

al., 1997a; Choi et al., 1997b; Liu et al., 1993; Schiavone y Cooke, 1987).

De este modo, estas observaciones sugieren que la auxina es transportada, hacia la protodermis, los primordios de los cotiledones y meristemas radicular, para establecer sitios de acumulación máxima de auxina para dar origen a la simetría bilateral del embrión y la formación de los tejidos fundamentales

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSIONES

En resumen, los resultados presentados en este trabajo muestran que los niveles de AIA aumentan gradualmente durante el periodo de pre-condicionamiento acumulándose principalmente en los cloroplastos, lo que sugiere la activación de su biosíntesis, después de someter a las plántulas a la presencia de una auxina exógena. Cuando los explantes son cultivados en el medio de inducción la distribución de auxina fue diferencial, se determinó una mayor acumulación de AIA en las células de la periferia del explante.

Después de 21 días de inducida la ES, en un medio libre de auxina, las primeras estructuras embriogénicas que aparecen muestran una distribución uniforme del AIA, difiriendo del gradiente que se forma durante los primeros estadios de la EC, sin embargo, a partir del estadio globular el AIA se encuentra distribuido diferencialmente, acumulándose en las células que darán origen a los tejidos primarios, igual a como sucede en la EC, sugiriendo que durante esta parte del proceso el transporte polar del AIA tiene un papel esencial.

Los experimentos de inmunolocalización del transportador PIN 1 mostraron una mayor acumulación en el plasmalema de las células del tejido provascular. Todos estos datos sugieren que durante la inducción de la ES la biosíntesis del AIA, junto con su distribución diferencial, posiblemente como producto de su transporte polar, juegan un papel esencial para que se formen las estructuras embrionarias.

3.2. PERSPECTIVAS

Los resultados en este trabajo aportan nuevos conocimientos sobre la función de las auxinas durante la inducción de la ES *in vitro* y abren la posibilidad de nuevos estudios sobre la homeostasis de auxina durante este proceso como:

- ¿Cuáles son los perfiles proteicos y metabólicos en los cloroplastos durante la etapa de pre-condicionamiento?
- ¿Además del transportador PIN1, que otros miembros de esta familia participan en

la distribución de auxina durante la ES en *C. Canephora*?

- ¿Cómo afectan la distribución de auxina y la posición del transportador PIN1 los inhibidores de transporte como TIBA y NPA?
- ¿Los sitios de acumulación de auxina son los mismos en los que tiene actividad el promotor DR-5?

ANEXOS

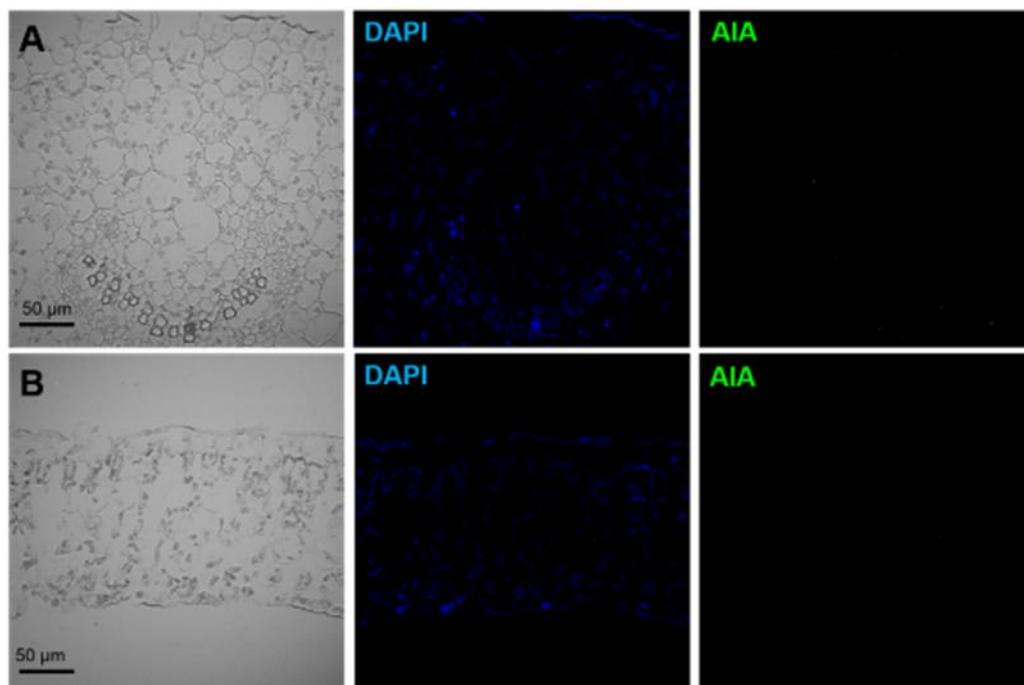


Figura A.1 Testigo negativo omitiendo la incubación con el anticuerpo primario. (A) Nervadura central de la hoja. (B) Parte media de la hoja.

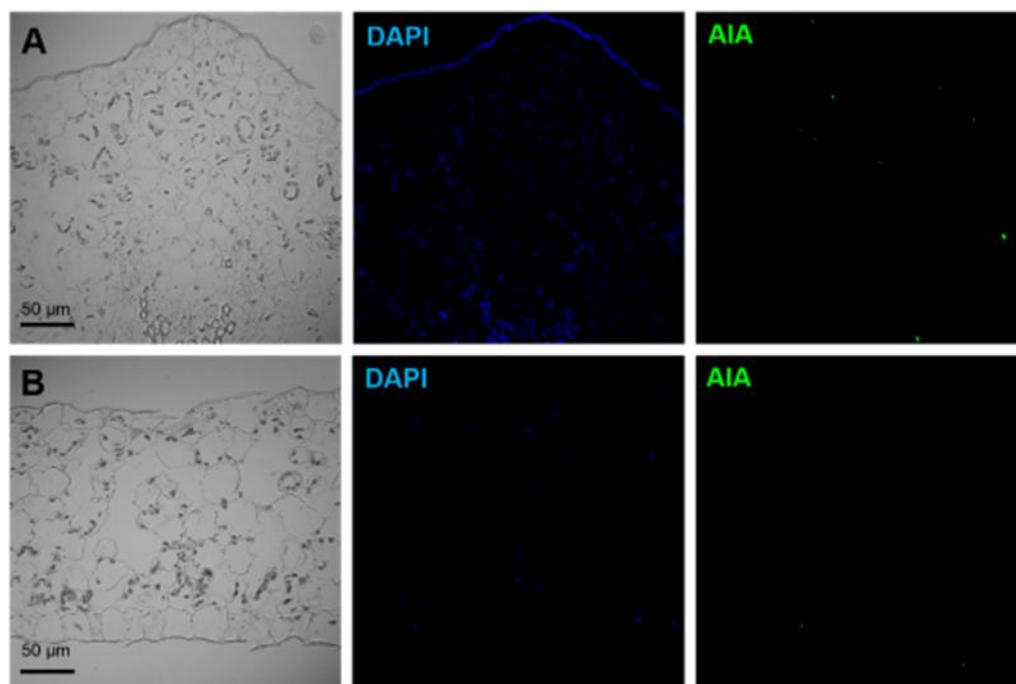


Figura A.2 Testigo negativo con anticuerpo bloqueado con AIA estándar. (A) Nervadura central de la hoja. (B) Parte media de la hoja.

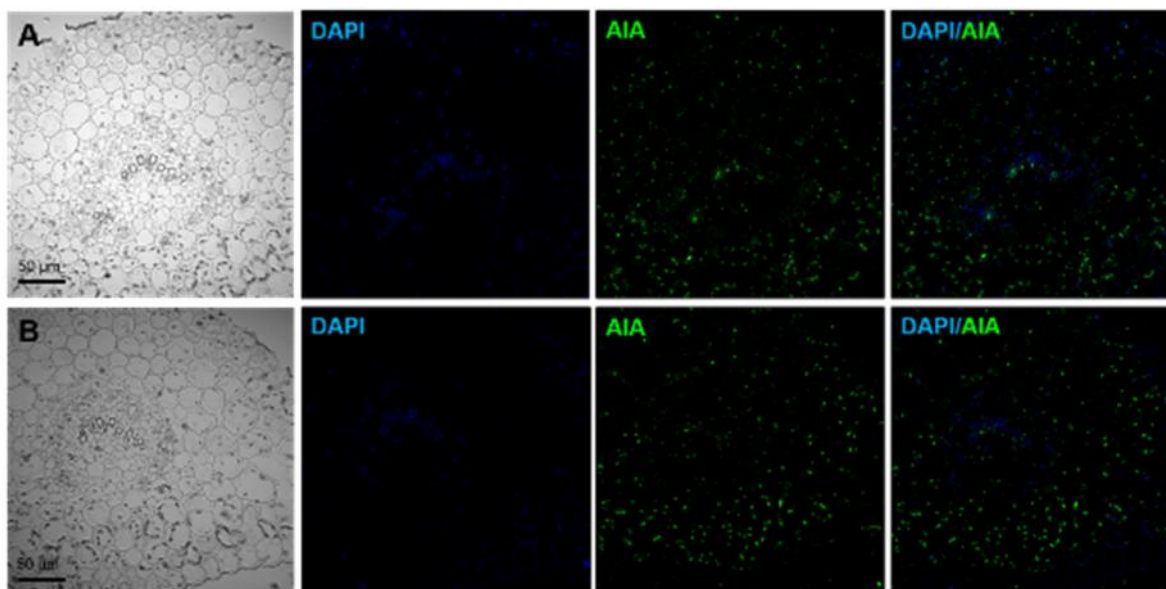


Figura A.3 Testigo pre-tratando el anticuerpo primario con el conjugado AIA-Ala. (A) Anticuerpo pre-tratado con AIA-Ala. (B) Anticuerpo primario sin tratar.

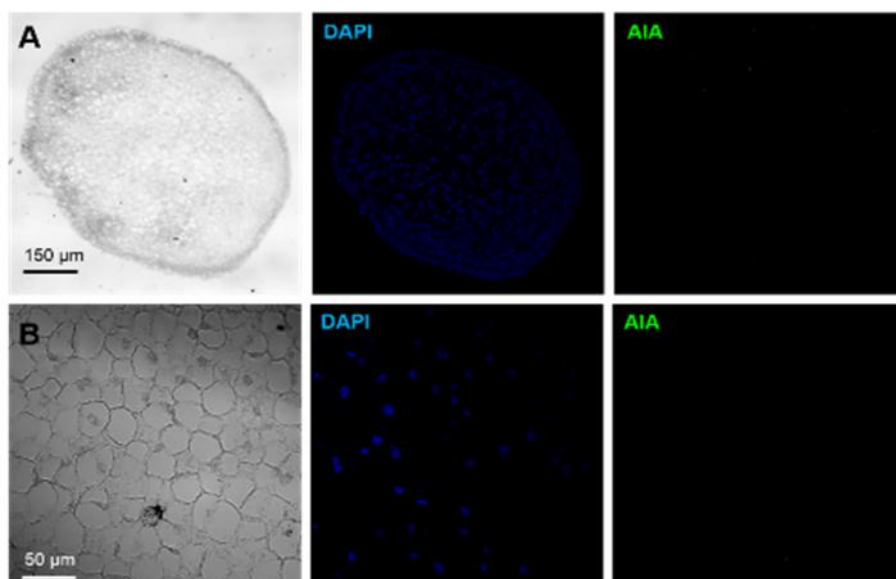


Figura A.4 Testigos negativos en embriones somáticos de *C. canephora* tratados sin anticuerpo primario. (A) Embrión globular (B) Embrión estadio corazón. (C) Células del protodermo 60X. Las muestras fueron analizadas bajo las condiciones anteriores, no se mostró señal inespecífica en el tejido. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

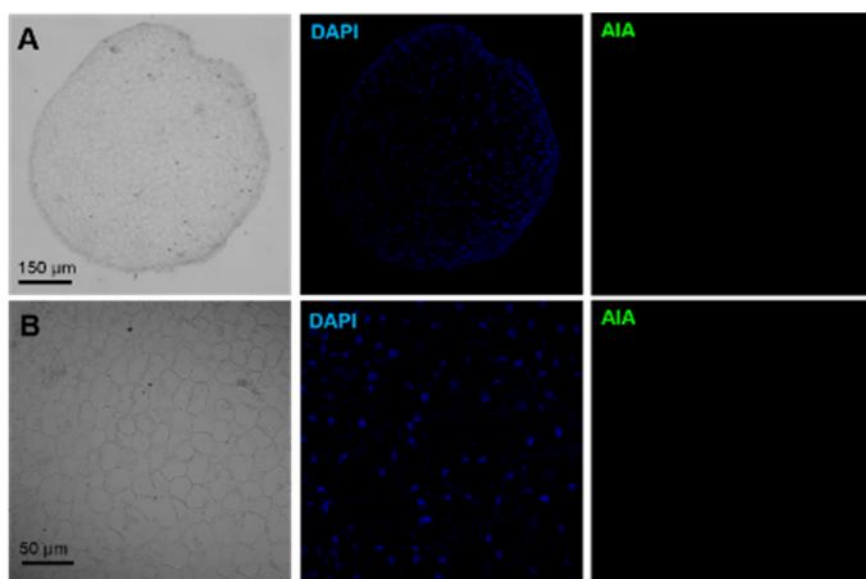


Figura A.5 Testigos negativos en embriones somáticos de *C. canephora* tratados y bloqueando el anticuerpo primario con AIA estándar. (A) Embrión globular. (B) Embrión corazón. Células del protodermo en 60X. Las muestras fueron analizadas bajo las condiciones anteriores, no se mostró señal inespecífica en el tejido. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

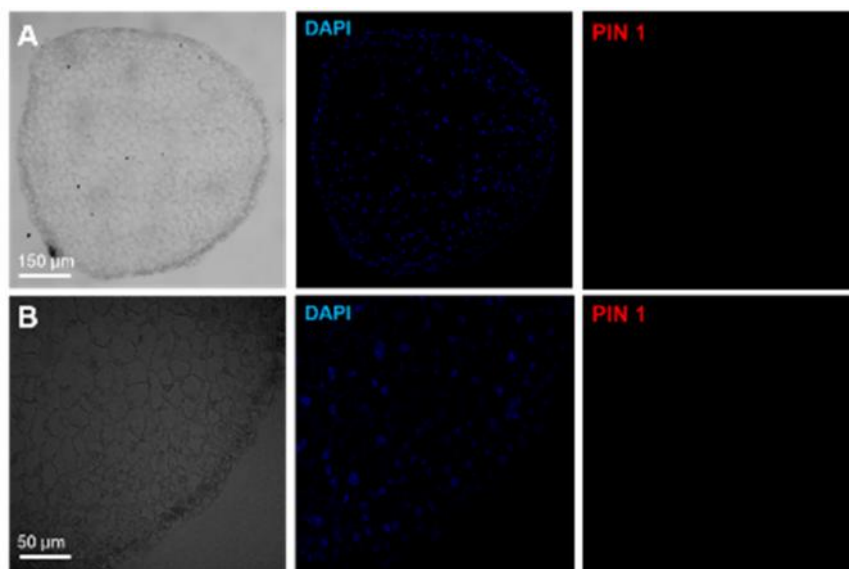


Figura A.6 Testigos negativos en embriones somáticos de *C. canephora* tratados sin anticuerpo primario. (A) Embrión globular. (B) Embrión en el estadio corazón. (C) Células del protodermo, 60X. Las muestras fueron analizadas bajo las condiciones anteriores, no se mostró señal inespecífica en el tejido. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

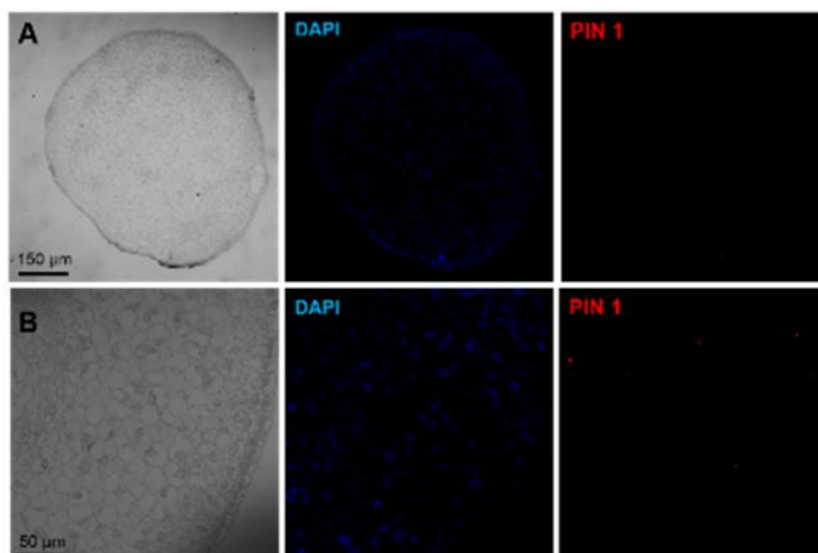


Figura A.7 Testigos negativos en embriones somáticos de *C. canephora* tratados y bloqueando el anticuerpo primario con el péptido contra el cual fue diseñado. (A) Embrión globular. (B) Embrión en el estadio de corazón. Células del protodermo, 60X. Las muestras fueron analizadas bajo las condiciones anteriores, no se determinó señal inespecífica en el tejido. Los núcleos fueron teñidos con DAPI.

BIBLIOGRAFÍA

- Adamowski, M. y J. Friml (2015). PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *The Plant Cell*, 27, 20-32.
- Aida, M., T. Ishida y M. Tasaka (1999). Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development*, 126, 1563-1570.
- Ayil-Gutiérrez, B., R. M. Galaz-Avalos, E. Peña-Cabrera y V. M. Loyola-Vargas (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998.
- Ayil-Gutiérrez, B. A. (2013). Estudio del ácido indolacético y sus conjugados durante la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*, CICY, Mérida. 73 p.
- Baldi, B. G., B. R. Maher, J. P. Slovin y J. D. Cohen (1991). Stable isotope labeling, *in vivo*, of D- and L-tryptophan pools in *Lemna gibba* and the low incorporation of label into indole-3-acetic acid. *Plant Physiology*, 95, 1203-1208.
- Balzan, S., G. S. Johal y N. Carraro (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science*, 5, 393.
- Barbez, E., M. Kubes, J. Rolcik, C. Beziat, A. Pencik, B. Wang, M. R. Rosquete, J. Zhu, P. I. Dobrev, Y. Lee, E. Zazimalova, J. Petrásek, M. Geisler, J. Friml y J. Kleine-Vehn (2012). A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, 485, 119-122.
- Bartel, B., S. LeClere, M. Magidin y B. K. Zolman (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20, 198-216.
- Benková, E., M. Michniewicz, M. Sauer, T. Teichmann, D. Seifertová, G. Jürgens y J. Friml (2003). Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 115, 591-602.
- Boutilier, K., R. Offringa, V. K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C. Liu, A. A. M. Van Lammeren, B. L. A. Miki, J. B. M. Custers y M. M. Van Lookeren-Campagne (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14, 1737-1749.
- Braun, N., J. Wyrzykowska, P. Muller, K. David, D. Couch, C. Perrot-Rechenmann y A. J. Fleming (2008). Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco. *The Plant Cell*, 20, 2746-2762.
- Bruinsma, J. y K. Hasegawa (1990). A new theory of phototropism. Its regulation by a light-

- induced gradient of auxin-inhibiting substances. *Physiologia Plantarum*, 79, 700-704.
- Cho, M. y H. Cho (2012). The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e22990-1.
- Cho, M., E. M. Henry, D. R. Lewis, G. Wu, G. K. Muday y E. Spalding (2014). Block of ABCB19 ion channel activity by 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)-benzoic acid (NPPB) impairs polar auxin transport and root gravitropism. *Plant Physiology*, 166, 2091-2099.
- Choi, E. Y., S. H. Kim, Y. W. Soh y C. D. Yang (1997a). Developmental and structural aspects of somatic embryos formed on medium containing 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Cell Reports*, 16, 738-744.
- Choi, Y. E., H. S. Kim, W. Y. Soh y D. C. Yang (1997b). Developmental and structural aspects of somatic embryos formed on medium containing 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Cell Reports*, 16, 738-744.
- Choi, Y. E., M. Katsumi y H. Sano (2001). Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Science*, 160, 1183-1190.
- Chugh, A. y P. Khurana (2002). Gene expression during somatic embryogenesis –recent advances. *Current Science*, 83, 715-730.
- Cohen, J. D. y R. S. Bandursky (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 403-430.
- Corsi, G. y S. Avanzi (1970). Cytochemical analyses on cellular differentiation in the root tip of *Allium cepa*. *Caryologia*, 23, 381-394.
- Debergh, P. C. y R. H. Zimmerman (1993). Micropropagation. Technology and application, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 484 p.
- Deshaies, R. J. (1999). SCF and cullin/RING H2-based ubiquitin ligases. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, 435-467.
- Dublin, P. (1981). Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25, 237-242.
- Dubrovsky, J. G., M. Sauer, S. Napsucialy-Mendivil, M. G. Ivanchenko, J. Friml, S. Shishkova, J. Celenza y E. Benková (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 8790-8794.
- Elhiti, M., C. Stasolla y A. Wang (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49, 631-642.

- Fehér, A., T. P. Pasternak y D. Dudits (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 201-228.
- Feldwisch, J., R. Zettl, F. Hesse, J. Schell y K. Palme (1992). An auxin-binding protein is localized to the plasma membrane of maize coleoptile cells: Identification by photoaffinity labeling and purification of a 23-kDa polypeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89, 475-479.
- Feraru, E., S. Vosolsobe, M. I. Feraru, J. Petrásêk y J. Kleine-Vehn (2012). Evolution and structural diversification of PILS putative auxin carriers in plants. *Frontiers in Plant Science*, 3, 227.
- Folke, S., E. Agneta, G. Per, O. Olof y S. Göran (1993). Compartmentation of indole-3-acetic acid metabolism in protoplasts isolated from leaves of wild-type and IAA-overproducing transgenic tobacco plants. *Planta*, 91, 274-279.
- Friml, J. y K. Palme (2002). Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology*, 49, 273-284.
- Friml, J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa y G. Jurgens (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426, 147-153.
- Gaj, M., S. Zhang, J. Harada y P. Lemaux (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222, 977-988.
- Gaj, M. D. (2001). Direct somatic embryogenesis as a rapid and efficient system for *in vitro* regeneration of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64, 39-46.
- Gaj, M. D. (2004). Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43, 27-47.
- Gao, Y. y Y. Zhao, (2014). Auxin biosynthesis and catabolism, en: *Auxin and Its Role in Plant Development*, Zazímalová, E., J. Petrásêk y E. Benková, (eds). Springer. Vienna. pp. 21-38.
- Garces, H. M., C. E. Champagne, B. T. Townsley, S. Park, R. Malho, M. C. Pedroso, J. J. Harada y N. R. Sinha (2007). Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 15578-15583.
- Geisler, M., J. J. Blakeslee, R. Bouchard, O. R. Lee, V. Vincenzetti, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bailly, E. L. Richards, K. F. K. Ejendal, A. P. Smith, C. Baroux, U. Grossniklaus, A. Muller, C. A. Hrycyna, R. Dudler, A. S. Murphy y E. Martinoia (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1. *The Plant Journal*, 44, 179-194.

- Geldner, N., J. Friml, Y. D. Stierhof, G. Jurgens y K. Palme (2001). Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, 413, 425-428.
- Goldberg, R. B., G. De Paiva y R. Yadegari (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266, 605-614.
- Goran, S., J. Einar y C. Alan (1982). Biosynthesis of indole-3-acetic acid in protoplasts, chloroplasts and a cytoplasmic fraction from barley (*Hordeum vulgare* L.). *Planta*, 156, 541-545.
- Göran, S., G. Per, S. Folke y O. Olof (1990). Presence of indole-3-acetic acid in chloroplasts of *Nicotiana tabacum* and *Pinus sylvestris*. *Planta*, 180, 562-568.
- Grieneisen, V. A., J. Xu, A. F. M. Maree, P. Hogeweg y B. Scheres (2007). Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449, 1008-1013.
- Habets, M. E. J. y R. Offringa (2014). PIN-driven polar auxin transport in plant developmental plasticity: a key target for environmental and endogenous signals. *New Phytologist*, 203, 362-377.
- Hakman, I., H. Hallberg y J. Palovaara (2009). The polar auxin transport inhibitor NPA impairs embryo morphology and increases the expression of an auxin efflux facilitator protein PIN during *Picea abies* somatic embryo development. *Tree Physiology*, 29, 483-496.
- Herman, E. B. y G. J. Haas (1975). Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10, 588-589.
- Hertel, R., K. S. Thomson y V. E. A. Russo (1972). In-vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta*, 107, 325-340.
- Ikeda-Iwai, M., M. Umehara, S. Satoh y H. Kamada (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34, 107-114.
- Iorizzo M., S. Ellison, D. Senalik, P. Zeng, P. Satapoomin, J. Huang, M. Bowman, M. Iovene, W. Sanseverino, P. Cavagnaro, M. Yildiz, A. Macko-Podgorni, E. Moranska, E. Grzebelus, D. Grzebelus, H. Ashrafi, Z. Zheng, S. Cheng, D. Spooner, A. van Deynze y P. Simon, (2016). A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution, *Nature Genetics*, DOI: 10.1038/ng.3565. (En prensa).
- Jiménez, V. M. y F. Bangerth (2001). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiologia Plantarum*, 111, 389-395.
- Karami, O., B. Aghavaishi y A. Mahmoudi Pour (2009). Molecular aspects of somatic-to-embryogenic transition in plants. *Journal of Chemical Biology*, 2, 177-190.

- Krecek, P., P. Skupa, J. Libus, S. Naramoto, R. Tejos, J. Friml y E. Zazimalova (2009). The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*, 10, 249.
- Krikorian, A. D. y L. K. Simola (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiologia Plantarum*, 105, 348-355.
- Larsson, E., F. Sitbon, K. Ljung y S. von Arnold (2008). Inhibited polar auxin transport results in aberrant embryo development in Norway spruce. *New Phytologist*, 177, 356-366.
- Last, R. L., P. H. Bissinger, D. J. Mahoney, E. R. Radwanski y G. R. Fink (1991). Tryptophan mutants in *Arabidopsis*: the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes. *The Plant Cell*, 3, 345-355.
- LeClere, S., R. Tellez, R. A. Rampey, S. P. T. Matsuda y B. Bartel (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 20446-20452.
- Lee, M., Y. Choi, B. Burla, Y. Y. Kim, B. Jeon, M. Maeshima, J. Y. Yoo, E. Martinoia y Y. Lee (2008). The ABC transporter AtABCB14 is a malate importer and modulates stomatal response to CO₂. *Nature Cell Biology*, 10, 1217-1223.
- Lee, O. y M. Cho, (2014). Trafficking of ABCB-type auxin transporters, en: *Plant ABC Transporters*, Geisler, M., (ed). Springer International Publishing. Switzerland. pp. 287-300.
- Liao, C. Y., W. Smet, G. Brunoud, S. Yoshida, T. Vernoux y D. Weijers (2015). Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nature Methods*, 12, 207-210.
- Liu, C., Z.-H. Xu y N.-H. Chua (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell*, 5, 621-630.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943-950.
- Lotan, T., M. Ohto, Y. K. Matsudaira, M. A. L. West, R. Lo, R. W. Kwong, K. Yamagishi, R. L. Fischer, R. B. Goldberg y J. J. Harada (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEN1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93, 1195-1205.
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1757-1773.
- Luo, Y. K. y H. U. Koop (1997). Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Planta*, 202, 387-396.
- Mattsson, J., Z. R. Sung y T. Berleth (1999). Responses of plant vascular systems to auxin transport inhibition. *Development*, 126, 2979-2991.

- Michalczuk, L., D. M. Ribnicky, T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures. *Plant Physiology*, 100, 1346-1353.
- Miettinen, J. K. y H. Waris (1958). A chemical study of the neomorphosis induced by glycine in *Oenanthae aqnatica*. *Physiologia Plantarum*, 11, 193-199.
- Möller, B. y D. Weijers (2009). Auxin control of embryo patterning. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1, a001545.
- Mordhorst, A. P., K. J. Voerman, M. V. Hartog, E. A. Meijer, J. Van Went, M. Koornneef y S. C. De Vries (1998). Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics*, 149, 549-563.
- Mravec, J., P. Skupa, A. Bailly, K. Hoyerova, P. Krecek, A. Bielach, J. Petrásek, J. Zhang, V. Gaykova, Y. D. Stierhof, P. I. Dobrev, K. Schwarzerova, J. Rolcik, D. Seifertova, C. Luschnig, E. Benková, E. Zazimalova, M. Geisler y J. Friml (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, 459, 1136-1140.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nic-Can, G. I., S. Hernández-Castellano, A. Kú-González, V. M. Loyola-Vargas y C. De-la-Peña (2013). An efficient immunodetection method for histone modifications in plants. *Plant Methods*, 9, 47.
- Noh, B., A. S. Murphy y E. P. Spalding (2001). Multidrug resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell*, 13, 2441-2454.
- Normanly, J., J. D. Cohen y G. R. Fink (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 10355-10359.
- Okada, K., J. Ueda, M. K. Komaki, C. J. Bell y Y. Shimura (1991). Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *The Plant Cell*, 3, 677-684.
- Östin, A., M. Kowalczyk, R. P. Bhalerao y G. Sandberg (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118, 285-296.
- Ouyang, J., X. Shao y J. Li (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 24, 327-334.
- Palovaara, J., H. Hallberg, C. Stasolla, B. Luit y I. Hakman (2010). Expression of a gymnosperm PIN homologous gene correlates with auxin immunolocalization

- pattern at cotyledon formation and in demarcation of the procambium during *Picea abies* somatic embryo development and in seedling tissues. *Tree Physiology*, 30, 479-489.
- Parker, K. E. (1991). Auxin metabolism and transport during gravitropism. *Physiologia Plantarum*, 82, 477-482.
- Passarinho, P., T. Ketelaar, M. Xing, J. van Arkel, C. Maliepaard, M. Hendriks, R. Joosen, M. Lammers, L. Herdies, B. den Boer, L. van der Geest y K. Boutilier (2008). BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Molecular Biology*, 68, 225-237.
- Pasternak, T. P., E. Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potters, H. Asard, H. A. Van Onckelen, D. Dudits y A. Fehér (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129, 1807-1819.
- Pencik, A., B. Simonovik, S. V. Petersson, E. Henyková, S. Simon, K. Greenham, Y. Zhang, M. Kowalczyk, M. Estelle, E. Zazimalová, O. Novák, G. Sandberg y K. Ljung (2013). Regulation of auxin homeostasis and gradients in *Arabidopsis* roots through the formation of the indole-3-acetic acid catabolite 2-oxindole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, 25, 3858-3870.
- Péret, B., K. Swarup, A. Ferguson, M. Seth, Y. Yang, S. Dhondt, N. James, I. Casimiro, P. Perry, A. Syed, H. Yang, J. Reemmer, E. Venison, C. Howells, M. A. Perez-Amador, J. Yun, J. Alonso, G. T. S. Beemster, L. Laplaze, A. Murphy, M. J. Bennett, E. Nielsen y R. Swarup (2012). AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during *Arabidopsis* development. *The Plant Cell*, 24, 2874-2885.
- Pérez Hernández, C. A. (2013). Estudio de un inhibidor del transporte de auxinas en la embriogénesis somática de *Coffea canephora*, Universidad Politécnica del Centro, Villahermosa, Tabasco. 42 p.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a001446.
- Pescador, R., G. B. Kerbauy, W. Melo Ferreira, E. Purgatto, R. M. Suzuki y M. P. Guerra (2012). A hormonal misunderstanding in *Acca sellowiana* embryogenesis: levels of zygotic embryogenesis do not match those of somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 68, 67-76.
- Petersson, S. V., A. I. Johansson, M. Kowalczyk, A. Makoveychuk, J. Y. Wang, T. Moritz, M. Grebe, P. N. Benfey, G. Sandberg y K. Ljung (2009). An auxin gradient and maximum in the *Arabidopsis* root apex shown by high-resolution cell-specific analysis of IAA distribution and synthesis. *The Plant Cell*, 21, 1659-1668.
- Petrásek, J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675-2688.

- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas, (2006a). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: Plant cell culture protocols, Loyola-Vargas, V. M. y F. A. Vázquez-Flota, (eds). Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 111-117.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006b). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Radwanski, E. R. y R. L. Last (1995). Tryptophan biosynthesis and metabolism: biochemical and molecular genetics. *The Plant Cell*, 7, 921-934.
- Rajasekaran, K., M. B. Hein, G. C. Davis y I. K. Vasil (1987). Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *Journal of Plant Physiology*, 130, 13-25.
- Ramarosandratana, A. V. y J. Van Staden (2004). Effects of auxins and 2,3,5-triiodobenzoic acid on somatic embryo initiation from Norway spruce zygotic embryos (*Picea abies*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79, 105-107.
- Ramos, J. A., N. Zenser, O. Leyser y J. Callis (2001). Rapid degradation of auxin/indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *The Plant Cell*, 13, 2349-2360.
- Rampey, R. A., S. LeClere, M. Kowalczyk, K. Ljung, G. Sandberg y B. Bartel (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant Physiology*, 135, 978-988.
- Reinert, J. (1959). Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, 53, 318-333.
- Ribnicky, D. M., N. Ilic, J. D. Cohen y T. J. Cooke (1996). The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. The implications for carrot somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 112, 549-558.
- Robert, S., J. Kleine-Vehn, E. Barbez, M. Sauer, T. Paciorek, P. Baster, S. Vanneste, J. Zhang, S. Simon, M. Covanová, K. Hayashi, P. Dhonukshe, Z. Yang, S. Y. Bednarek, A. M. Jones, C. Luschnig, F. Aniento, E. Zazimalová y J. Friml (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell*, 143, 111-121.
- Rodríguez-Sanz, H., J. A. Manzanera, M. T. Solís, A. Gómez-Garay, B. Pintos, M. C. Risueño y P. S. Testillano (2014). Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, *Quercus suber* L. *BMC Plant Biology*, 14, 224.
- Rodríguez-Sanz, H., M. T. Solís, M. F. López, A. Gómez-Cadenas, M. Risueño y P. S. Testillano (2015). Auxin biosynthesis, accumulation, action and transport are involved in stress-induced microspore embryogenesis initiation and progression in

- Brassica napus*. Plant and Cell Physiology, 56, 1401-1417.
- Rubery, P. H. y A. R. Sheldrake (1974). Carrier-mediated auxin transport. Planta, 118, 101-121.
- Ruiz Rosquete, M., E. Barbez y J. Kleine-Vehn (2012). Cellular auxin homeostasis: gatekeeping is housekeeping. Molecular Plant, 5, 772-786.
- Santner, A., L. I. Calderon-Villalobos y M. Estelle (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature Chemical Biology, 5, 301-307.
- Scanlon, M. J. (2003). The polar auxin transport inhibitor *N*-1-naphthylphthalamic acid disrupts leaf Initiation, KNOX protein regulation, and formation of leaf margins in maize. Plant Physiology, 133, 597-605.
- Scarpella, E., D. Marcos, J. Friml y T. Berleth (2006). Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. Genes & Development, 20, 1015-1027.
- Schiavone, F. M. y T. J. Cooke (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors. Cell Differentiation, 21, 53-62.
- Shi, J. H. y Z. B. Yang (2011). Is ABP1 an auxin receptor yet? Molecular Plant, 4, 635-640.
- Söndahl, M. R. y W. R. Sharp (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 81, 395-408.
- Söndahl, M. R. y W. R. Sharp, (1979). Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods, en: Plant cell and tissue culture principles and applications, Sharp, W. R., P. O. Larsen, E. F. Paddock y V. Raghavan, (eds). Ohio State University Press. Columbus. pp. 527-584.
- Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Botanica Neederlandica, 19, 509-514.
- Staswick, P. E., B. Serban, M. Rowe, I. Tiriyaki, M. T. Maldonado, M. C. Maldonado y W. Suza (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. The Plant Cell, 17, 616-627.
- Stepanova, A. N., J. Robertson-Hoyt, J. Yun, L. M. Benavente, D. Y. Xie, K. Dolezal, A. Schlereth, G. Jürgens y J. M. Alonso (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. Cell, 133, 177-191.
- Stepanova, A. N., J. Yun, L. M. Robles, O. Novak, W. He, H. Guo, K. Ljung y J. M. Alonso (2011). The Arabidopsis YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. The Plant Cell, 23, 3961-3973.
- Steward, F. C., M. O. Mapes y K. Mears (1958). Growth and organized development of

- cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705-708.
- Su, Y. H. y X. S. Zhang (2009). Auxin gradients trigger de novo formation of stem cells during somatic embryogenesis. *Plant Signaling & Behavior*, 4, 574-576.
- Szemenyei, H., M. Hannon y J. A. Long (2008). TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science*, 319, 1384-1386.
- Takatsuka, H. y M. Umeda (2014). Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *Journal of Experimental Botany*, 65, 2633-2643.
- Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen y T. J. Guilfoyle (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *The Plant Cell*, 9, 1963-1971.
- Venis, M. A., R. M. Napier y S. Oliver (1996). Molecular analysis of auxin-specific signal transduction. *Plant Growth Regulation*, 18, 1-6.
- Vieten, A., M. Sauer, P. B. Brewer y J. Friml (2007). Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science*, 12, 160-168.
- Vondráková, Z., K. Eliášová, L. Fischerová y M. Vágner (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, 6, 587-596.
- Wang, B., J. Chu, T. Yu, Q. Xu, X. Sun, J. Yuan, G. Xiong, G. Wang, Y. Wang y J. Li (2015). Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 4821-4826.
- Waris, H. (1959). Neomorphosis in seed plants induced by amino acids I: *Oenanthae aquatica*. *Physiologia Plantarum*, 12, 753-766.
- West, M. A. L., K. M. Yee, J. Danao, J. L. Zimmerman, R. L. Fischer y R. B. Goldberg (1994). *LEAFY COTYLEDON 1* is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6, 1731-1745.
- Wisniewska, J., J. Xu, D. Seifertová, P. B. Brewer, K. Růžicka, I. Blilou, D. Rouquié, E. Benková, B. Scheres y J. Friml (2006). Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312, 883.
- Wright, A. D., M. B. Sampson, M. G. Neuffer, L. Michalczuk, J. P. Slovin y J. D. Cohen (1991). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science*, 254, 998-1000.
- Wu, Y., G. Haberland, C. Zhou y H.-U. Koop (1992). Somatic embryogenesis, formation of morphogenetic callus and normal development in zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* *in vitro*. *Protoplasma*, 169, 89-96.

- Yasuda, T., Y. Fujii y T. Yamaguchi (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, 26, 595-597.
- Zazimalová, E., A. S. Murphy, H. Yang, K. Hoyerová y P. Hósek (2010). Auxin transporters - Why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a001552.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 49-64.
- Zhao, Z., Y. Zhang, X. Liu, X. Zhang, S. Liu, X. Yu, Y. Ren, X. Zheng, K. Zhou, L. Jiang, X. Guo, Y. Gai, C. Wu, H. Zhai, H. Wang y J. Wan (2013). A role for a dioxygenase in auxin metabolism and reproductive development in rice. *Developmental Cell*, 27, 113-122.
- Zolman, B. K., A. Yoder y B. Bartel (2000). Genetic analysis of indole-3-butyric acid responses in *Arabidopsis thaliana* reveals four mutant classes. *Genetics*, 156, 1323-1337.
- Zuo, J., Q. W. Niu, G. Frugis y N. H. Chua (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30, 349-359.