



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Determinación de los niveles de expresión de los genes GH3 durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*

Tesis que presenta

Hugo Alejandro Méndez Hernández

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 Hugo Alejandro Méndez Hernández titulado “Determinación de los niveles de expresión de los genes GH3 durante la embriogénesis somática de *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, septiembre de 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 registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____
Nombre: Hugo Alejandro Méndez Hernández

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

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por haberme dirigido durante esta etapa importante de mi formación académica y por dejarme permanecer en su grupo de investigación.

A mi comité tutorial, la Dra. Clelia de la Peña Seaman y al Dr. Rafael Rojas Herrera, por el tiempo otorgado para las revisiones de mi documento y apoyo académico.

Al Dr. Geovanny Nic Can, por su apoyo en experimentos importantes durante mi formación.

A la M. en C. Rosa María Galaz Avalos por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al Dr. José Cetz por el apoyo en los datos de transcriptoma.

Al M. en C. Randy Avilez por su apoyo y comentarios a mi trabajo, por los consejos y por ser los “líderes” de la ES.

Al CONACyT, por el apoyo económico que se me otorgo durante la realización de este proyecto, con el número de becario 620490.

Al CICY, en especial a la UBBMP por permitirme el uso de sus instalaciones.

A todos mis amigos del laboratorio 24, Ruth, Ari, Don Johny, Erika, Jorge y Daniela por hacer de esta etapa algo maravilloso, así como a mis compañeros del posgrado.

DEDICATORIAS

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	V
LISTADO DE CUADROS	VII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	3
1.2 <i>COFFEA SPP.</i>	4
1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO <i>COFFEA</i>	5
1.4 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	7
1.4.1 AUXINAS	7
1.4.2 BIOSÍNTESIS DE LAS AUXINAS	8
1.4.3 AUXINA CONJUGADA	10
1.4.4 ACTIVACIÓN E INACTIVACIÓN DE LAS AUXINAS	12
1.4.5 DEGRADACIÓN DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO	14
1.5 EXPRESIÓN GÉNICA DURANTE LA ES	15
1.6 GENES DE LA FAMILIA GH3	15
1.6.1 LA FAMILIA GH3 EN <i>ARABIDOPSIS THALIANA</i>	16
1.8 HIPÓTESIS	17
1.9 OBJETIVOS	17

1.9.1 OBJETIVO GENERAL	17
1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
1.10 JUSTIFICACIÓN	17
1.11 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	18
CAPÍTULO II.....	19
OBTENCIÓN DEL PROCESO EMBRIOGÉNICO EN CAFÉ, CUANTIFICACIÓN DE CONJUGADOS Y DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES GH3.....	19
2.1 INTRODUCCIÓN	19
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	19
2.2.1 MATERIAL VEGETAL	19
2.2.2 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	20
2.2.3 EXTRACCIÓN DE ÁCIDO INDOL-3- ACÉTICO Y SUS CONJUGADOS.....	20
2.2.4 CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	21
2.2.5 ESTÁNDARES Y CURVAS DE CALIBRACIÓN	21
2.2.6 EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DEL ADNC	22
2.2.7 DISEÑO DE CEBADORES	22
2.2.8 CONDICIONES DE CORRIDA PARA LA PCR	23
2.2.9 CONDICIONES DE REACCIÓN DE Q-RT-PCR.....	24
2.2.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
2.3 RESULTADOS	25
2.3.1 INDUCCIÓN DE LA ES EN <i>COFFEA CANEPHORA</i>	25

2.3.3 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL.....	30
2.3.6 EXPRESIÓN DE LOS GENES GH3 POR MEDIO DE QRT-PCR, DURANTE EL PROCESO EMBRIOGÉNICO	34
2.3.7 ANÁLISIS TRANSCRIPTÓMICO.....	38
2.3.4 DISCUSIÓN	40
CAPÍTULO III	45
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	45
3.1 Conclusiones	45
3.2. Perspectivas	48
BIBLIOGRAFÍA.....	49

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Origen unicelular y pluricelular de los embriones somáticos.....	6
Figura 1.2 Estructuras de las auxinas naturales (A), y de los análogos de auxina (B).....	8
Figura 1.3. Rutas descritas para el metabolismo de las auxinas.	9
Figura 1.4. Estructuras de algunas moléculas de glucosa y aminoácidos conjugados con el AIA.....	11
Figura 1.5 El papel de los conjugados de AIA en la homeostasis de auxina (Modificado de Bajguz y Piotrowska, 2009).....	12
Figura 1.6 Filogenia de la familia de genes GH3.....	13
Figura 1.7 Acción de las enzimas GH3..	14
Figura 1.8 Miembros de la familia GH3 en <i>Arabidopsis thaliana</i> (Wang, 2008).	16
Figura 1.9 Estrategia experimental para determinar el papel de los genes GH3 durante la inducción de la ES de <i>Coffea canephora</i>	18
Figura 2.1 Inducción de la ES en <i>Coffea canephora</i>	26
Figura 2.2 Germinación de los embriones somáticos.....	27
Figura 2.3 Cromatograma en el que se muestra la separación y detección del AIA y de sus conjugados.....	27
Figura 2.4 Cantidad de ácido indol-3-acético (AIA) y sus conjugados, antes y durante la inducción de la ES en <i>C. canephora</i>	30
Figura 2.5 Integridad del ARN total aislado de los días (-14, -7 y 0) anteriores a la inducción (dai) de la embriogénesis somática, el día 0 de la inducción (ind) y los días (7, 14 y 21) posteriores a la inducción (dpi).....	31

Figura 2.6 Análisis de la expresión del gen de actina sintetizado a partir del ARN total extraído de explantes foliares de <i>C. canephora</i>	32
Figura 2.7 Determinación de la expresión de los genes que se encuentran involucrados en el proceso de conjugación del AIA.	33
Figura 2.8 Análisis mediante qPCR para la expresión de los genes <i>GH3.1</i> (barras negras), <i>GH3.3</i> (barras rojas) y <i>GH3.5</i> (barras azules) durante el pre-tratamiento e inducción de la ES.	36
Figura 2.9 Análisis mediante qPCR para la expresión de los genes <i>GH3.6</i> (barras negras), <i>GH3.9</i> (barras rojas) y <i>GH3. 17</i> (barras azules) durante el pre-tratamiento e inducción de la ES.	38
Figura 2.10 Mapa de calor para la expresión de los genes GH3.....	40
Figura 3.1 Modelo del comportamiento en la expresión de genes de la familia GH3 y de la homeostasis del AIA.....	47

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1 Secuencias de los cebadores específicos para los genes GH3 estudiados durante el pre-acondicionamiento e inducción de la ES en <i>Coffea canephora</i>	23
--	----

ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalén-1-acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
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
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIP	Ácido indol-3-pirúvico
ARN	Ácido ribonucleico
BA	Benciladenina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DEPC	Dietilpirocarbonato
dpi	Días posteriores a la inducción
dai	Días anteriores a la inducción
EC	Embriogénesis cigótica
ES	Embriogénesis somática
GH3	Gretchen Hagen-3
IAR3	Indol 3-acetic acid alanine resistant
ILL1	Indol 3-acetic acid leucine resistant like-1
IAOx	Indol-3- acetaldoxima
IPA-Ala	Ácido indol-3-propiónico-alanina
AJ	Ácido jasmónico
KIN	Cinetina
MS	Murashige & Skoog
PCR	Polymerase Chain Reaction
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
rpm	Revoluciones por minuto

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) es el proceso mediante el cual se producen embriones a partir de células somáticas bajo condiciones controladas. A partir de su descubrimiento la ES se ha convertido en un importante modelo de estudio en diversas especies; como sistema de propagación de plantas presenta una serie de ventajas frente a otros sistemas: una gran capacidad de multiplicación aplicable industrialmente, permite obtener en un solo proceso estructuras completas con ápice y raíz, que pueden ser almacenadas y encapsuladas perfectamente, y permite el estudio de los procesos bioquímicos y moleculares que sufre la célula hasta formar un embrión somático. Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) son factores clave para este proceso, las auxinas son RCV que se encuentran participando en casi todo el desarrollo de la planta. En nuestro laboratorio se ha establecido un sistema embriogénico para *Coffea canephora* para el estudio de la dinámica de concentración y homeostasis del ácido indol-3-ácetico (AIA), así como de sus conjugados AIA-alanina y AIA-glutámico durante el pre-acondicionamiento e inducción de la ES. El aumento y la disminución de las auxinas, tanto de la forma activa, como la conjugada, está regulada por la expresión de diferentes genes, como los genes de la familia *GRETCHEN HAGEN 3* (GH3) que codifican para amido sintetasas que catalizan la formación de estos conjugados a partir de los aminoácidos y el AIA libre para mantener los niveles activos de auxina. En el proyecto desarrollado en esta tesis encontramos que hay seis genes en el genoma del cafeto, el nivel de expresión de estos genes y el contenido de conjugados y de AIA libre es marcadamente diferente entre las fases de pre-acondicionamiento y la inducción de la ES, utilizando como modelo experimental la especie *C. canephora*, determinamos que existe una dinámica muy importante en la presencia del AIA libre y sus conjugados con los aminoácidos alanina, isoleucina y ácido glutámico, y que existe una importante correlación entre los niveles de expresión de los genes de la familia GH3 y los niveles de conjugados. El análisis del transcriptoma, en relación con la expresión de los genes de la familia GH3, nos permitió determinar que tres de ellos se encuentran en más de una copia.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) is the process by which embryos are produced from somatic cells under controlled conditions. Since its discovery, SE has become an important model for the study of biochemical and molecular biology processes that take place during the development of the embryos. SE is also used as a propagation system, and it presents some advantages such as high multiplication capacity. In our laboratory, it has been established a very efficient system for the propagation of *Coffea canephora* through SE. Using this system, in this thesis, I studied the expression of the GH3 gene family. I found that there is a very strong dynamic in the concentration of free IAA and its conjugates with alanine, isoleucine, and glutamic acid. Also, I found that there is an important correlation between the expression level of GH3 and the level of the IAA conjugates. Moreover, using bioinformatics tools I found that there are six GH3 genes in the genome of coffee. The level of expression of these genes and the content of conjugates, together with the levels of free IAA, is very different between the pre-treatment and induction stages. The analysis of the transcriptome looking at the expression of the GH3 family genes, let us find out that there are three of them present in more than one copy, which suggests different functions for each copy.

INTRODUCCIÓN

El proceso de embriogénesis en las plantas, normalmente inicia con la generación esporifítica, durante la cual se da la formación del cigoto, producido por la fusión de los gametos de la planta. La formación del embrión inicia con la división transversal del cigoto, dando como resultado una célula basal y una célula apical, la que posteriormente sufren una serie de divisiones que darán origen al embrión, en tanto que la célula basal dará origen al suspensor y a la hipófisis (Goldberg et al., 1994).

Por otra parte la presencia de reguladores de crecimiento vegetal (RCV) está relacionada con todos los procesos de reprogramación de las células y diferenciación (Goldberg et al., 1994), pero también existe un acontecimiento en el cual, una célula vegetal es capaz de diferenciarse, hasta la formación de una planta completa, siendo este es un ejemplo de la totipotencia celular conocido como embriogénesis somática (ES), mediante este proceso, se pueden obtener embriones no cigóticos a partir de prácticamente cualquier parte de la planta, algunos ejemplos de ES en la naturaleza los encontramos en hojas de plantas de la especie *Kalanchoe daigremontiana*, mediante la formación de plántulas en los bordes de sus hojas {Garces, 2007 30713 /id}.

El proceso de la ES puede ser inducida de manera *in vitro* utilizando como explante prácticamente cualquier tejido de la planta, esto es posible mediante la manipulación del medio de cultivo, este bajo condiciones asépticas y controladas, además del tipo de tejido empleado, así como la concentración de diferentes RCV, entre otros factores; se pueden mencionar dos procesos para la ES: directa e indirecta, en el primer proceso se necesita una proliferación mínima de tejido desorganizado, lo cual procede a la formación directa de los embriones y en la indirecta es necesaria la formación de un tejido des- diferenciado denominado callo, que prolifera abundantemente antes de la formación del embrión (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2012; Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

La reproducción sexual de plantas superiores ocurre dentro del pistilo, mediante la fertilización de gametos, lo cual da como resultado un cigoto, el cual da inicio a la embriogénesis cigótica (EC) (Goldberg et al., 1994), pero también existe un acontecimiento en el cual, una célula vegetal es capaz de diferenciarse, hasta la formación de una planta completa, este es un ejemplo de la totipotencia celular conocido

INTRODUCCIÓN

como embriogénesis somática (ES), Si bien los dos procesos embriogénicos son muy similares, tienen diferencias importantes. La ausencia de suspensor y de endospermo son dos de ellas, así como el hecho de que los embriones somáticos no pasan por un estado de quiescencia y germinan directamente en el medio en el que se encuentran (Dodeman et al., 1997). Adicionalmente, la falta de endospermo en la ES provoca la ausencia de señales generadas en él para la inducción y control de diversas funciones en el embrión (Costa et al., 2014; Bayer, 2014).

Una característica de los embriones somáticos es que son capaces de formar un nuevo individuo. Una característica que se extiende a lo largo del reino vegetal en relación con el uso de RCV. En otras especies la disminución o eliminación de auxina, encienden el programa embriogénico, mayormente se utiliza al ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). En el caso de la zanahoria (*Daucus carota*), se producen divisiones continuas hasta la formación de las células embriogénicas en presencia del 2,4-D en el medio de cultivo, sin embargo, para que se induzca la formación de las primeras estructuras embriogénicas es necesario eliminar al 2,4-D del medio de cultivo (Michalczuk et al., 1992).

Durante el proceso de inducción de la ES, influye mucho el medio de cultivo, las condiciones de luz y oscuridad, así como el tipo de explante utilizado y la adición de RC exógenos al medio de cultivo, todo esto es importante para lograr obtener una mejor respuesta embriogénica. Después de que se induce la ES, ocurren cambios en la homeostasis del AIA, en nuestro grupo de trabajo se ha desarrollado un modelo de estudio, en el que se obtienen plantas completas y sin deformaciones a partir de la ES en explantes foliares de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* (Quiroz-Figueroa et al., 2006b).

En este trabajo se determinaron los niveles de expresión de los genes de la familia GH3, durante el pre-acondicionamiento, inducción y desarrollo de la ES de *C. canephora*. En nuestro sistema de embriogénesis somática se ha demostrado que la mayor parte del AIA endógeno se encuentra de forma conjugada, esta conjugación es llevada a cabo por las enzimas codificadas por los genes de esta familia de amido sintetetasas.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Embriogénesis somática

La reproducción sexual de plantas superiores ocurre dentro del pistilo, mediante la fertilización de gametos, dando como resultado un cigoto, el cual da inicio a la embriogénesis cigótica (EC) (Goldberg et al., 1994). También existe un proceso en el cual una célula vegetal es capaz de diferenciarse, hasta la formación de una planta completa, este es un ejemplo de la totipotencia celular conocido como embriogénesis somática (ES). Mediante este proceso, se pueden obtener embriones no cigóticos a partir de prácticamente cualquier parte de la planta. Algunos ejemplos de ES en la naturaleza los encontramos en las hojas de plantas de la especie *Kalanchoe daigremontiana*, mediante la formación de embriones somáticos que se convierten en plántulas en los bordes de sus hojas (Garces et al., 2007).

El proceso de la ES, para su estudio, se logra también mediante el cultivo de células *in vitro*. Unas de las primeras investigaciones en las que se menciona el proceso de la ES fueron desarrolladas con cultivos celulares de zanahoria (Reinert, 1959; Steward et al., 1958). Este descubrimiento constituyó el punto de partida para lo que hoy en día es la inducción de la ES en más de 200 especies de distintas familias, tanto en plantas eudicotiledóneas, como monocotiledóneas (Barbón et al., 2008).

Los procesos que abarca la ES son de iniciación y desarrollo, mediante los cuales las células somáticas son sometidas a una reprogramación genética, mediante condiciones de inducción, adicionando RCV, en estas condiciones, las células sufren una serie de cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares produciendo así embriones somáticos. Los embriones somáticos tienen la capacidad de desarrollar una planta completa, al igual que los embriones cigóticos, después del proceso de germinación. La diferencia de la EC es que, como se trata de un proceso asexual, la nueva planta será idéntica a la donadora de la(s) célula(s) inicial(es) (Zimmerman, 1993; Tisserat, 1985).

Actualmente se han creado diversos modelos de ES en plantas para el estudio de los estadios de desarrollo, ya que los primeros estadios de desarrollo en la embriogénesis

cigótica son muy difíciles de manipular y observar (Zimmerman, 1993). En la actualidad se conocen varias diferencias entre ambos tipos de embriogénesis, tales como la ausencia de endospermo, y que la ES ocurre por un patrón de reprogramación de expresión de genes que hacen que exista una diferenciación celular, y la prácticamente inexistencia de suspensor; otra diferencia significativa entre embriones cigóticos y somáticos, es que los embriones somáticos no pasan por la fase de quiescencia (Pasternak et al., 2002).

A partir del inicio del proceso embriogénico se observa la formación de las estructuras pro-embriónicas, las cuales dan origen a la formación de los estadios tipo globular, corazón, torpedo y cotiledonar. Es necesario mencionar que el desarrollo morfológico de un embrión somático es similar o parecido, en términos morfológicos, al de un embrión cigótico mas no igual; durante los primeros estadios de la EC se observa la presencia del suspensor que es importante durante el desarrollo del embrión, a diferencia de la ES en la cual no se observa, excepto cuando la ES se origina por la vía unicelular (Quiroz-Figueroa et al., 2006b). Desde luego los embriones somáticos no desarrollan endospermo. También es importante mencionar que en el caso de la ES no se produce la fase de dormancia, los embriones somáticos germinan directamente después de alcanzar el estadio cotiledonar.

1.2 *Coffea spp*

Actualmente, el café es la mercancía que más se comercializa en el mundo. Se consumen más de 2,250 millones de tazas de café al día en el mundo, y se cultivan más de once millones de hectáreas. Más de 80 millones de personas dependen de la industria del café.

El café pertenece a la familia de las Rubiaceae y representa al género *Coffea*. De las más de 124 especies de café que existen, solo dos son las especies económicamente importantes: *Coffea canephora* y *C. arabica*. Todas las especies de café son arbustos leñosos perennes, que difieren de forma importante en morfología, tamaño y nicho ecológico.

C. canephora es una especie diploide ($2n = 2x = 22$), de polinización cruzada (alógama) y consiste de poblaciones polimórficas de individuos heterocigotos. Es más resistente a los patógenos y diferentes tipos de extremos ambientales que produce un café de menor

calidad y contiene una mayor cantidad de cafeína. *C. arabica* es un híbrido natural entre *C. canephora* y *C. eugenioides*, es alotetrapoide ($2n = 4x = 44$), autógama y proporciona un café de mayor calidad, contiene menor cantidad de cafeína, pero por otra parte esta especie es más susceptible a los patógenos.

1.3 Embriogénesis somática en el género *Coffea*

En la especie *C. canephora*, el proceso de embriogénesis somática y la descripción de producción de embriones somáticos obtenidos a partir de un tejido no diferenciado fue publicado por Staritsky (1970). La ES se ha convertido en un importante modelo para el estudio de la diferenciación de células somáticas, el modelo más utilizado para el estudio de la ES ha sido zanahoria (*Daucus carota*), ya que es un protocolo eficiente por su rápida respuesta a la inducción de la ES y la generación de grandes cantidades de embriones en volúmenes muy pequeños (Gaj et al., 2005).

Aunque se tienen varias definiciones, se puede decir que la ES es el proceso mediante el cual las células somáticas son inducidas a generar células embriogénicas, bajo condiciones de inducción, las cuales pasan por una serie de cambios bioquímicos, moleculares y morfológicos que resultan en la formación de un embrión (Komamine et al., 2005).

Los embriones somáticos pueden ser obtenidos de forma masiva por vía directa, en este proceso el programa genético para la ES es activado mediante condiciones favorables y se observa una proliferación mínima de tejido desorganizado, lo cual precede a la formación directa de los embriones, o por vía indirecta a través del cultivo de células, callos u órganos, en el que las células tienen que ser reprogramadas genéticamente para su desdiferenciación a tejido desorganizado denominado callo que prolifera abundantemente antes de la formación del embrión. Esta ruta incluye una serie de eventos característicos: diferenciación celular, activación de la división celular y la reprogramación de sus patrones de expresión génica (Yang y Zhang, 2010).

En cuanto a su origen celular, la ES puede originarse a través de dos vías que pueden ser por vía unicelular y vía pluricelular (Figura 1.1), aunque la capacidad de regeneración depende de la especie, la naturaleza del explante y otros factores como la adición o ausencia de RCV, así como su concentración, el tipo de medio de cultivo, además del

genotipo, estos factores influyen en cada proceso de inducción embriogénica (Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

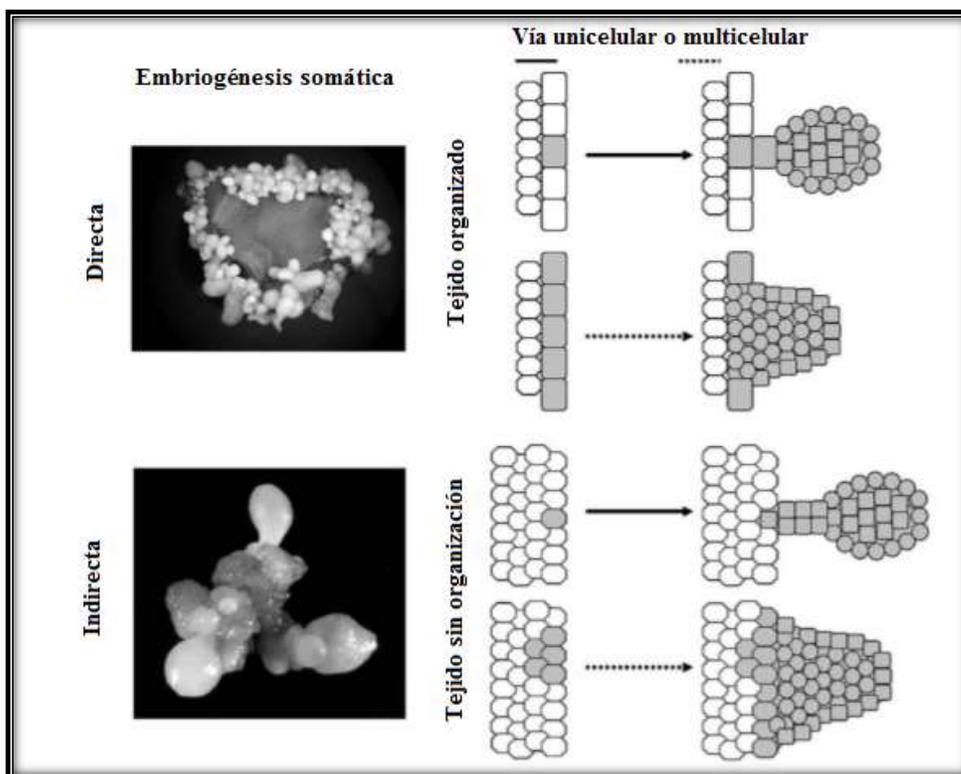


Figura 1.1 Origen unicelular y pluricelular de los embriones somáticos. Panel superior izquierdo embriogénesis somática directa en *Coffea canephora*. Panel inferior izquierdo, embriogénesis somática indirecta en *Coffea arabica*. Páneos del lado derecho, modelos para explicar la embriogénesis somática de origen uni o pluricelular, ya sea directa (panel superior derecho) como indirecta (panel inferior derecho) (Modificado a partir de Quiroz-Figueroa et al., 2006b).

Otro de los modelos de estudio, debido a que su genoma completo ha sido secuenciado, es *Arabidopsis thaliana*. En los últimos años se ha obtenido un método de inducción más o menos eficiente para la inducción de la ES a partir de embriones cigóticos inmaduros. El desarrollo de la ES en *A. thaliana* ha ayudado a la localización de algunos de los genes que parecen estar participando en la inducción y regulación de la ES (Wójcikowska y Gaj, 2016; Nowak et al., 2012; Capron et al., 2009; Kurczynska et al., 2007).

1.4 Reguladores del crecimiento vegetal

El crecimiento y desarrollo de las plantas no están dados únicamente por la absorción de nutrientes a través de las raíces, y la luz que recibe, sino que depende de la división celular y la expansión de las células, estos procesos son regulados por factores ambientales externos y por señales internas en la planta. Algunos autores definen a los RCV como una sustancia orgánica endógena que actúa a bajas concentraciones que promueve, inhibe o modifica la respuesta fisiológica de la planta. Las auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico y etileno, así como las poliaminas, el óxido nítrico, el ácido jasmónico, los brasinoesteroides, el ácido salicílico y las estrigolactonas son comúnmente reconocidos como RCV naturales. Las auxinas y citocininas son los RCV más comúnmente empleados en sistemas de cultivo de tejido vegetal para la regulación y diferenciación celular (Jiménez, 2005). En el caso de la ES, el éxito en su establecimiento depende de la presencia de una combinación adecuada de estos RCV. Sin embargo, las auxinas son el RCV que juega el papel más importante durante la inducción del proceso embriogénico. (Jones et al., 2013; Santner et al., 2009).

1.4.1 Auxinas

Los RCV más ampliamente estudiados son las auxinas, en particular el ácido indol-3-acético (AIA). Las auxinas son un grupo de compuestos que tienen un anillo aromático separado cerca de 5.5 Å de una carga negativa (Figura 1.2) (Korasick et al., 2013; Ayil-Gutiérrez et al., 2013). El ácido indol-3-acético es un factor clave de muchos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas y se encuentran involucradas en la respuesta a fenómenos tales como fototropismo, gravitropismo y dominancia apical y a nivel celular participan en la elongación, división y diferenciación celular (Mano y Nemoto, 2012; Bajguz y Piotrowska, 2009).

Actualmente existe un consenso de que para la inducción de la ES se requiere de una concentración elevada en los niveles endógenos del ácido-3-indolacético (AIA) durante el proceso de incubación, probablemente para activar los programas genéticos que llevan a las células a cambiar su programación (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Sin embargo, una vez que el programa genético de las células ha cambiado, se requiere que disminuya la concentración endógena del AIA.

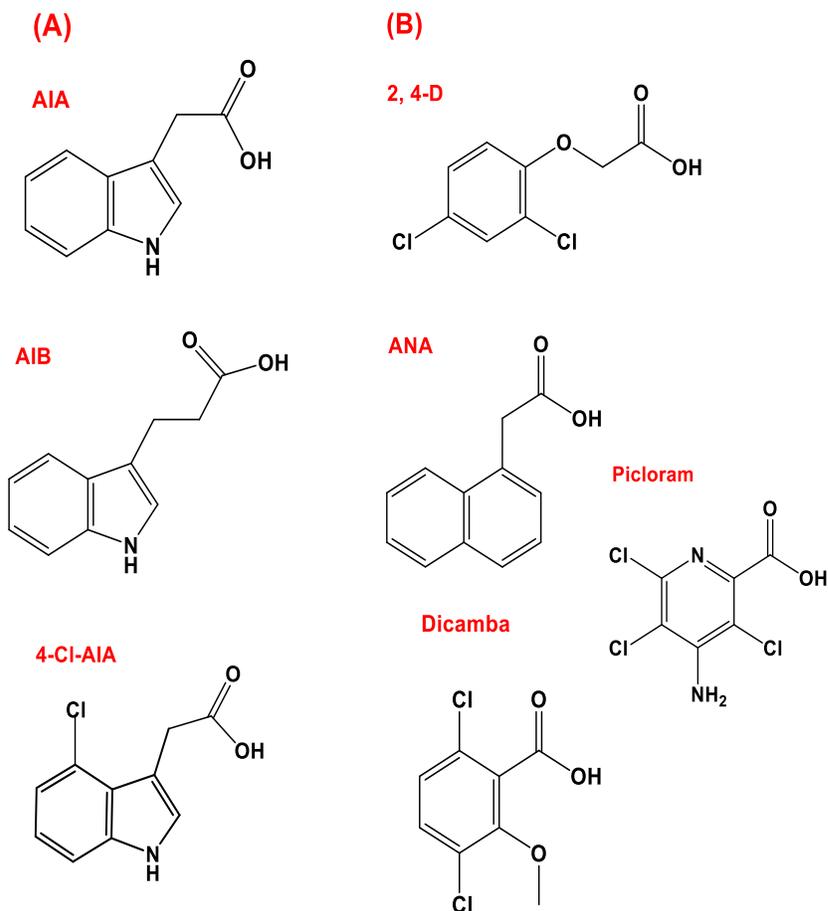


Figura 1.2 Estructuras de las auxinas naturales (A), y de los análogos de auxina (B). AIA = ácido-3-indol acético; AIB = ácido-3-indol butírico; 4-Cl-AIA = ácido 4-cloroindol acético; 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxi acético; ANA = ácido 1-naftalén acético; dicamba = ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico; picloram = ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

1.4.2 Biosíntesis de las auxinas

Si bien el papel fisiológico del AIA está bien documentado, no es así para su biosíntesis. Con base en enfoques bioquímicos se han propuesto cinco rutas de biosíntesis de este compuesto. En cuatro de ellas el precursor es el aminoácido triptófano. La base de la biosíntesis del AIA es la permanencia del grupo indol del triptófano, su descarboxilación y desaminación (Normanly et al., 1993). La diferencia entre las cuatro rutas de biosíntesis del AIA es el orden y la forma en que se llevan a cabo dichas reacciones básicas. La

evidencia actual sugiere que estas cuatro rutas de biosíntesis son las de mayor importancia biológica (Bartel, 1997).

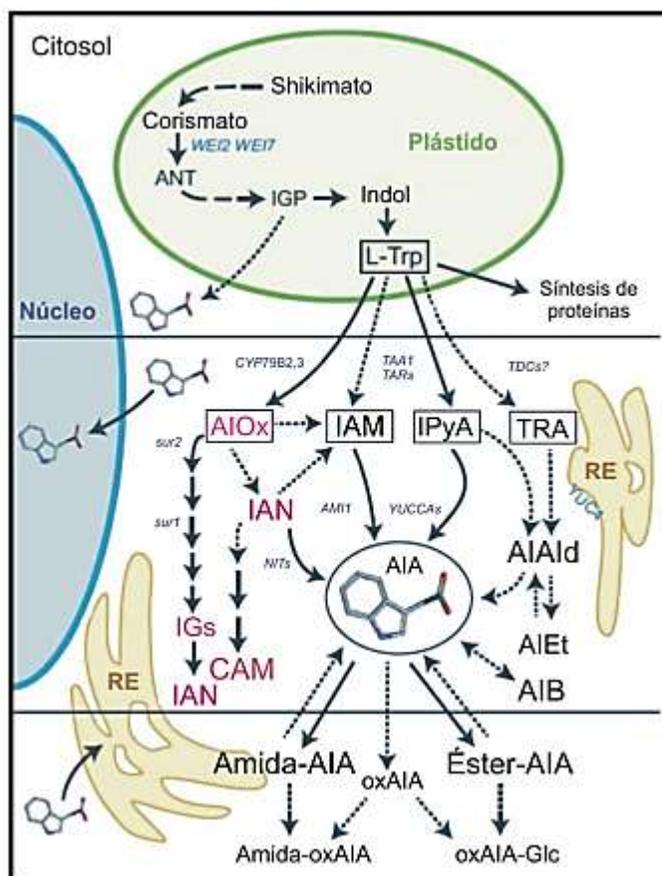


Figura 1.3. Rutas descritas para el metabolismo de las auxinas. (A) La biosíntesis de los precursores del AIA, IGP y L-Trp, se lleva a cabo en los plástidos. El L-Trp, el principal precursor en la biosíntesis del AIA se produce en la ruta del shikimato. (B) También se muestran las subsiguientes rutas de biosíntesis del AIA dependientes de L-Trp: las rutas IAOx, IAM, IPyA y TRA. Las enzimas conocidas se muestran en azul. Los intermediarios que también actúan como precursores y productos de degradación de los compuestos de defensa están en rojo. (C) Rutas de degradación y conjugación del AIA. El AIA puede ser conjugado a aminoácidos y carbohidratos o catabolizado para formar oxIAA. Algunos conjugados del AIA pueden ser vistos como formas de almacenamiento que pueden ser hidrolizados para rendir la forma libre del AIA. Las flechas sólidas indican rutas metabólicas para las cuales las enzimas, genes e intermediarios se conocen. Las flechas cortadas indican rutas metabólicas que aún no están bien definidas. ANT, antranilato; CAM, camalexina; Glu, glucosa; IAId, indol-3-acetaldehído; IAEt, indol-3-etanol; IAM, indol-3-acetamida; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IBA, ácido indol-3-butírico; IGP, indol-3-glicerol fosfato; IGs, indol glucosinolatos; IPyA, ácido indol-3-pirúvico; L-Trp, L-triptofano; NITs, nitrilasas; oxIAA, ácido 2-oxoindol-3-acético; TDCs, triptofano decarboxilasas; TRA, triptamina. Redibujado de Ljung (2013).

Con base en los principales compuestos intermediarios, las cuatro rutas de biosíntesis del AIA se pueden dividir en tres grandes grupos. En una ruta, por oxigenación del Trp se produce indol-3-acetaldoxima (IAOx) e indol-3-acetamida (IAM). En otra ruta, por descarboxilación del Trp se produce triptamina (TAM), y en la otra ruta por transaminación del Trp se produce ácido indol-3-pirúvico (IPA) (Figura 1.3) (Ruiz Rosquete et al., 2012).

La ruta del IAM es una ruta de biosíntesis descrita en bacterias y que también puede ocurrir en plantas. En *Agrobacterium tumefaciens* y *Pseudomonas syringae*, una monooxigenasa convierte al Trp en IAM y una IAM hidrolasa convierte al IAM en AIA. El IAM se encuentra en *Arabidopsis thaliana* en niveles similares que el AIA y se sabe que la enzima aminohidrolasa (AMI1) puede convertir al IAM en AIA *in vitro* (Pollmann et al., 2003).

La evidencia actual sugiere que existe una ruta de biosíntesis del AIA que es independiente del Trp. La principal evidencia proviene del descubrimiento en mutantes tanto de *Arabidopsis* como de maíz, que no producen Trp, por tener dañada la triptofano sintasa, sin embargo acumulan AIA. Así mismo, en dichas mutantes se puede sintetizar AIA a partir de precursores como el IGP o el indol. Poco se conoce sobre los potenciales intermediarios de esta vía y no se ha identificado ninguno de los genes involucrados en ella. También se sabe muy poco acerca de las reacciones enzimáticas e intermediarios metabólicos implicados en dicha vía de biosíntesis (Ljung et al., 2002; Wright et al., 1991).

1.4.3 Auxina conjugada

La mayor parte del AIA endógeno en las células vegetales no se encuentra en forma libre, sino que se encuentra de manera modificada por reacciones de conjugación. La conjugación es un mecanismo que interviene en la homeostasis del AIA regulando su concentración. Algunos compuestos con los que se conjuga el AIA pueden ser el mioinositol a través de la formación de un enlace éster, con diversos aminoácidos a través de la formación de un enlace amida, o con glucosa formando un enlace éster (Figura 1.4) (Bajguz y Piotrowska, 2009).

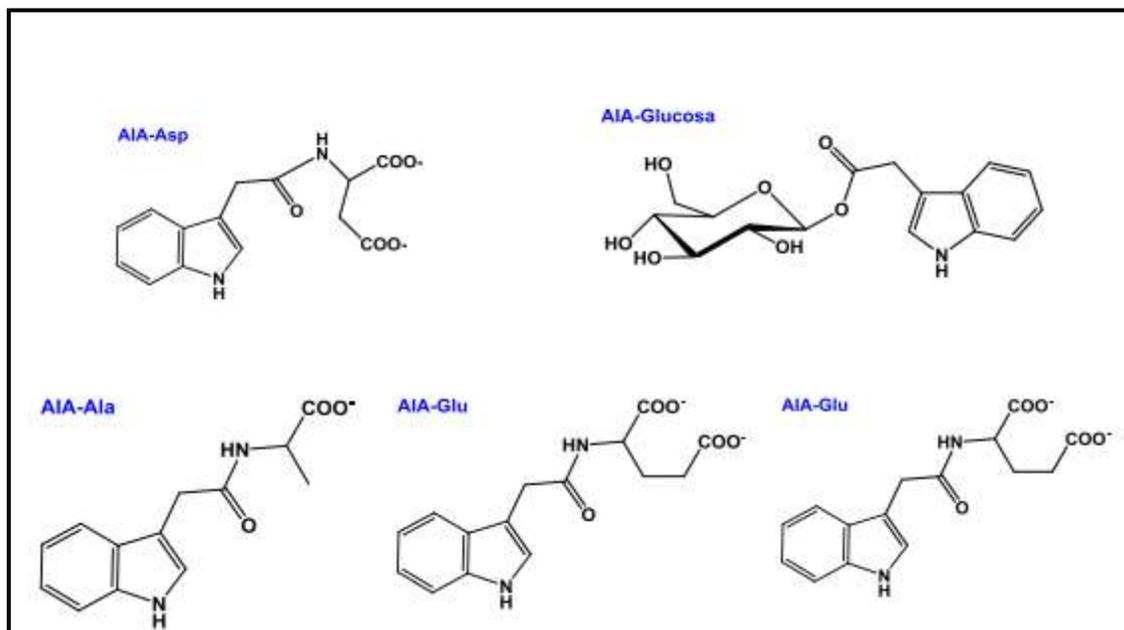


Figura 1.4. Estructuras de algunas moléculas de glucosa y aminoácidos conjugados con el AIA.

Existen conjugados del AIA con los aminoácidos alanina, aspártico, glutámico leucina, metionina, triptofano, entre otros. Los conjugados AIA-Ala y AIA-Leu, pueden ser hidrolizados para liberar la forma activa del AIA. Cuando los aminoácidos con los que se conjuga el AIA son los aminoácidos aspártico o glutámico, los compuestos formados, AIA-Asp o AIA-Glu, son destinados a la ruta de degradación del AIA. De esta forma los conjugados del AIA participan de forma muy activa en su homeostasis (Figura 1.5) (Bajguz y Piotrowska, 2009; Tam et al., 2000; Cohen y Bandursky, 1982).

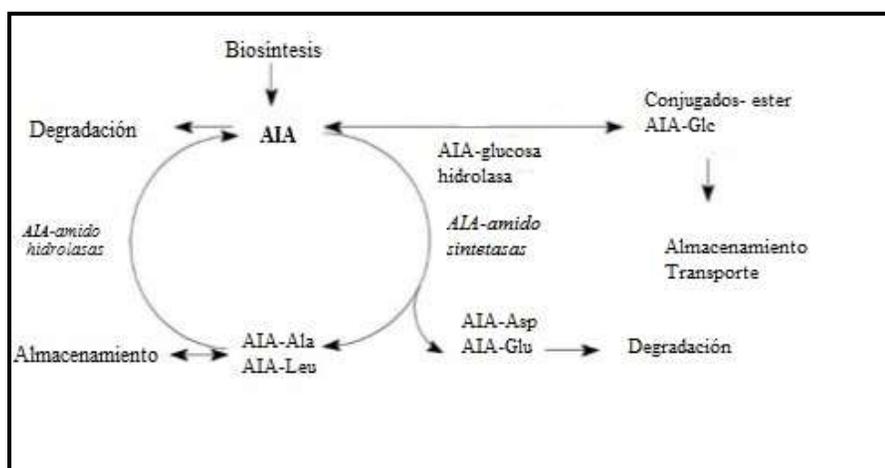


Figura 1.5 El papel de los conjugados de AIA en la homeostasis de auxina (Modificado de Bajguz y Piotrowska, 2009).

La ruta de biosíntesis de los conjugados del AIA tiene una estrecha relación con la presencia de genes que codifican para enzimas que hidrolizan el enlace amida de los conjugados y liberan la molécula de AIA, para cuando ésta sea necesaria para la planta.

También existen enzimas con una función de amido sintetasa, las cuales son codificadas por genes que pertenecen a la familia *GRETCHEN HAGEN 3* (GH3). Esta familia de genes fue caracterizada inicialmente en la especie *Glicine max* por la Dra. Gretchen Hagen y se caracterizan por ser responsivos a la presencia de auxinas. Se encuentran presentes en todas las especies vegetales y con un número diferente de genes codificando para ellas como puede apreciarse en la figura 1.6. El número de genes que codifican para miembros de la familia GH3 puede variar desde 19 en *A. thaliana* hasta 6 en papaya (Okrent y Wildermuth, 2011; Chen et al., 2010; Hagen y Guilfoyle, 1985).

Las enzimas codificadas por los genes de la familia GH3 catalizan la formación dependiente de ATP de conjugados amida (Ayil-Gutiérrez et al., 2013; Wang et al., 2008).

1.4.4 Activación e inactivación de las auxinas

Se sabe que existe una variación en relación con los mecanismos de detección de los RCV por las plantas y la respuesta a la señal varía en cada proceso. Los RCV tienen la función de controlar todos los procesos de desarrollo y crecimiento durante el ciclo de vida

de la planta, se ha observado que existen similitudes en los mecanismos de acción entre las auxinas que participan en la división, elongación y diferenciación celular y la acción que desempeña el ácido jasmónico en relación con la germinación de la semilla, el crecimiento de las raíces y la respuesta a patógenos (Santner et al., 2009).

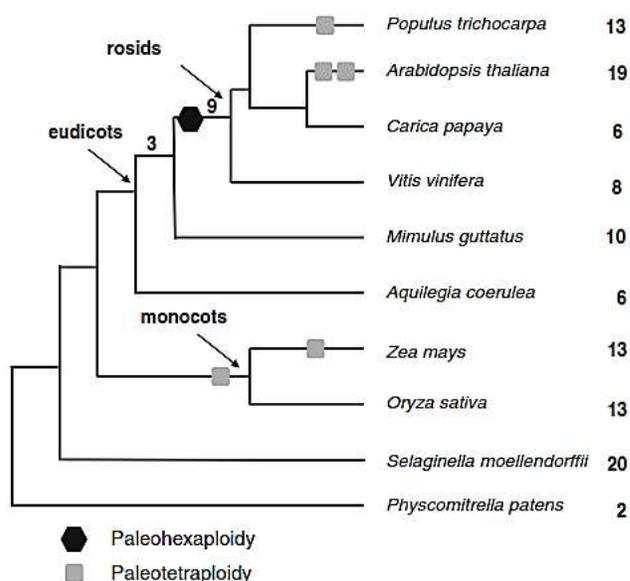


Figura 1.6 Filogenia de la familia de genes GH3. Se muestra la relación filogenética entre diversas especies vegetales y los eventos de paleohexaploidía y paleotetraploidia (Okrent y Wildermuth, 2011).

El proceso de conjugación entre el AIA y aminoácidos y otros compuestos, no está restringido a este RCV. Otro RCV que se conjuga es el ácido jasmónico, y la enzima que lo hace es producto de un gen de la familia GH3. El ácido jasmónico se conjuga con el aminoácido isoleucina. Lo interesante está en que a diferencia del AIA, que al conjugarse con aminoácidos como glutámico o aspártico, el AIA es dirigido a la ruta oxidativa que en consecuencia es degradado, a diferencia del ácido jasmónico que necesita ser conjugado para convertirse en la molécula activa (Figura 1.7) (Westfall et al., 2010).

1.4.5 Degradación del ácido indol-3-acético

Durante el proceso de degradación del AIA no ha sido tan estudiado como el proceso de biosíntesis y su transporte, de tal manera que la comprensión del proceso de degradación es un poco limitada. Por ejemplo en *A. thaliana* existe evidencia que sugiere que el AIA conjugado con aminoácidos como glutámico o aspártico, marcan el inicio de la ruta de degradación del AIA, siendo este proceso irreversible y puede ser llevado a cabo mediante dos distintas vías: una oxidación descarboxilativa o una oxidación sin descarboxilación (Westfall et al., 2010).

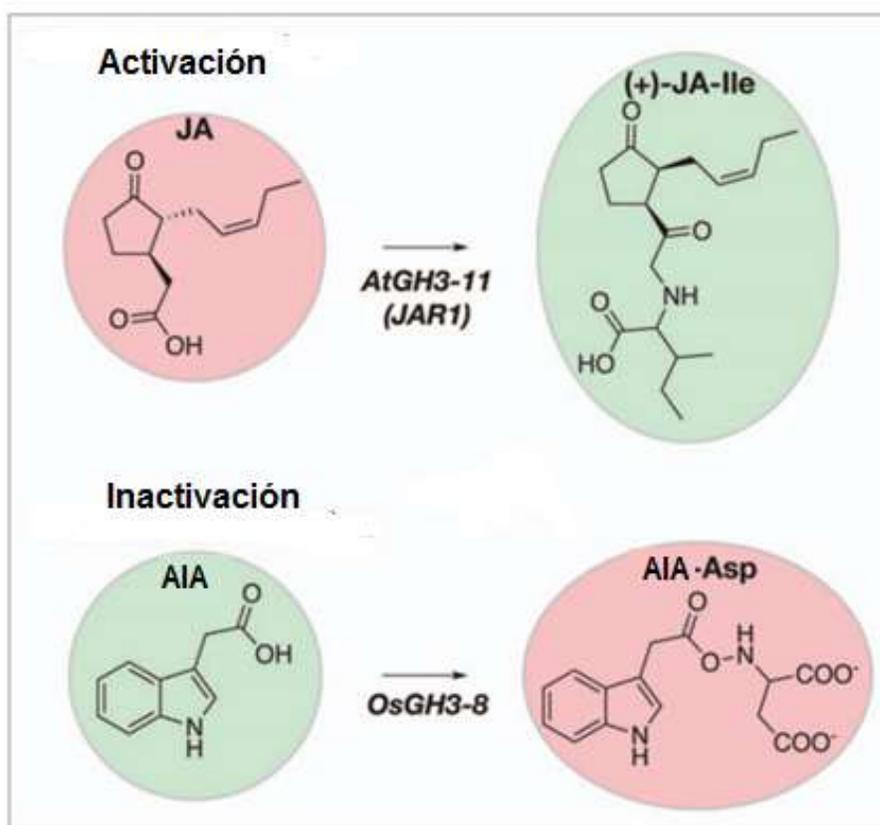


Figura 1.7 Acción de las enzimas GH3. Modificación del ácido jasmónico (JA) y del ácido indol-3-acético (AIA). Conjugación del JA con isoleucina por la enzima codificada por el gen *AtGH3-11* y produce la forma activa JA-Ile. Conjugación del AIA con el ácido aspártico por la enzima codificada por el gen *OsGH3-8* y produce IAA-Asp el cual conduce a la degradación del AIA. Los colores rosado y verde corresponden a las formas inactivas y activas de los RCV, respectivamente (Modificado de Westfall, 2010).

1.5 Expresión génica durante la ES

Actualmente la inducción de la ES representa una importante herramienta para el estudio de los diferentes procesos que se establecen durante el proceso y el desarrollo de los embriones, ya que mediante el cambio de su programa genético tienen la capacidad de diferenciarse y dar origen a un embrión somático, encontrándose varios factores involucrados varios factores, como RCV, fuente de nitrógeno, tipo de explante, por otra parte durante el proceso embriogénico se expresa un importante número de genes que regulan alguna función específica, para el estudio de los diferentes procesos que van ocurriendo durante la inducción y el desarrollo de embriones la ES representa una poderosa herramienta para entender la complejidad de esta, ya que es una red compleja en la que se expresan un número importante de genes que codifican diferentes enzimas para la regulación de funciones específicas, en *A. thaliana* se conoce que existen un aproximado de 4000 genes que se expresan durante el proceso de ES manteniendo una modulación de este proceso (Ikeda et al., 2006).

1.6 Genes de la familia GH3

El primer gen GH3 fue identificado en 1984, como un gen de respuesta temprana a auxina (Hagen et al., 1984). Desde entonces se han determinado en prácticamente cada especie vegetal en el que se les ha buscado (Terol et al., 2006).

La familia de genes GH3 ha sido dividida en tres grupos dependiendo del sustrato que use la enzima. El grupo I contiene a los genes que codifican a las enzimas que usan como sustrato al ácido jasmónico. Este gen fue descubierto en una mutante (JAR1), la cual es insensible al ácido jasmónico. En *A. thaliana* es el gen AtGH3.11 y la enzima cataliza la formación del conjugado ácido jasmónico-isoleucina. El grupo II comprende a los genes GH3 que codifica para las enzimas que catalizan la formación de los conjugados del AIA o ácido salicílico, y el grupo III comprende a los genes que codifican para las enzimas que usan como sustrato al benzoato (Chen et al., 2010). Se conoce muy poco sobre los aspectos bioquímicos de las amidosintasas, de la función de su diversidad y de su papel durante la inducción de la ES.

1.6.1 La familia GH3 en *Arabidopsis thaliana*

Si bien se han identificado genes de la familia GH3 tanto en eudicotiledóneas como monocotiledóneas, así como en gimnospermas (Figura 1.6), es en *Arabidopsis* en la planta en la que se han estudiado con más profundidad. En *Arabidopsis* la familia de genes GH3 se compone de 19 miembros y un gen que solo codifica para el amino-terminal de la proteína (Figura 1.8). Los genes GH3 en esta especie se encuentran en los cromosomas 1, 2, 4 y 5. La GH3.11 codifica para la enzima que conjuga ácido jasmónico con isoleucina, en tanto que la GH3.5 codifica para la enzima que conjuga tanto ácido salicílico como AIA. No se conoce el sustrato de adenilación de once de estas enzimas. (Wang et al., 2008; Hagen y Guilfoyle, 1985).

GH3	Número de accesión	Cromosoma	Grupo (s)	Sustrato de adenilación	Sinónimos
AtGH3-1	At2g14960	2	II	NE	
AtGH3-2	At4g37390	4	II	AIA	YDK1
AtGH3-3	At2g23170	2	II	AIA	
AtGH3-4	At1g59500	1	II	AIA	
AtGH3-5	At4g27260	4	II	AIA, SA	AtGH3a/WES1
AtGH3-6	At5g54510	5	II	AIA	DFL1
AtGH3-7	At1g23160	1	III	(-)	
AtGH3-8	At5g51470	5	III	(-)	
AtGH3-9	At2g47750	2	II	AIA	
AtGH3-10	At4g03400	4	I	(-)	DFL2
AtGH3-11	At2g46370	2	I	AJ	FIN219/JAR1
AtGH3-12	At5g13320	5	III	(-)	PBS3/GDG1
AtGH3-13	At5g13350	5	III	NE	
AtGH3-14	At5g13360	5	III	NE	
AtGH3-15	At5g13370	5	III	(-)	
AtGH3-16	At5g13380	5	III	NE	
AtGH3-17	At1g28130	1	II	AIA	
AtGH3-18	At1g48670	1	III	(-)	
AtGH3-19	At1g48660	1	III	(-)	
AtGH3-20/ truncado	At1g48690	1	III	(-)	

Figura 1.8 Miembros de la familia GH3 en *Arabidopsis thaliana* (Wang, 2008).

1.8 HIPÓTESIS

Si el aumento del AIA endógeno actúa como una señal de activación de los genes GH3 durante la inducción de la ES entonces es posible que se expresen selectivamente y se produzca un aumento en los conjugados del AIA durante el proceso de la ES.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel de los genes GH3 durante la inducción de la ES de *Coffea canephora*.

1.9.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la relación entre el contenido endógeno de auxinas y sus conjugados durante la inducción de la ES.
- Evaluar la expresión de los genes *CcGH3.1* durante el pre-acondicionamiento e inducción de las ES.

1.10 JUSTIFICACIÓN

Se ha determinado que la adición de RCV al medio de cultivo durante el periodo de pre-tratamiento, induce la biosíntesis de RCV endógenos, incluyendo a la familia de los conjugados del AIA con aminoácidos. Este hecho sugiere la participación de los genes de la familia GH3 que codifican para las enzimas que forman los enlaces amida entre el AIA y los aminoácidos. La medición de los niveles endógenos de AIA libre y sus conjugados, así como de la expresión de los genes GH3 en la ES, de tal manera podremos tener un mejor conocimiento de cómo se mantiene la homeostasis de la auxina durante la inducción del proceso embriogénico.

1.11 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En los experimentos llevados a cabo en esta investigación se propagaron plántulas de *C. canephora* de aproximadamente 8 semanas, provenientes de embriones somáticos, estas plántulas fueron mantenidas en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) sin RCV mantenidas en condiciones de fotoperiodo de 16/8h luz/oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ de forma constante durante todo el tiempo que se llevó a cabo este estudio. Posteriormente estas las plántulas fueron colocadas en un medio de pre-tratamiento por 14 días en presencia de ANA $0.54 \mu\text{M}$ y KIN $2.32 \mu\text{M}$, en los cuales se tomaron muestras (- 14 y -7) de los días anteriores a la inducción (dai). Posteriormente a los 14 días fueron tomados los explantes de las hojas de estas plantas y con ayuda de un sacabocado de un centímetro de diámetro y se colocaron en el medio de inducción líquido que contenía $5 \mu\text{M}$ de BA, en condiciones de oscuridad a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, de los cuales se tomaron muestras (0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21) de los días posteriores a la inducción (dpi) de la ES. El proceso fue llevado hasta los 56 días en los cuales se aislaron los embriones en estadio cotiledonar para ser germinados en un medio MS sin RCV para la obtención de nuevo material vegetal. La extracción de AIA y sus conjugados, así como los niveles de análisis de expresión fueron llevadas a cabo en todos los puntos de muestreo desde el pre-tratamiento hasta inducción de la ES (Figura 1.9).

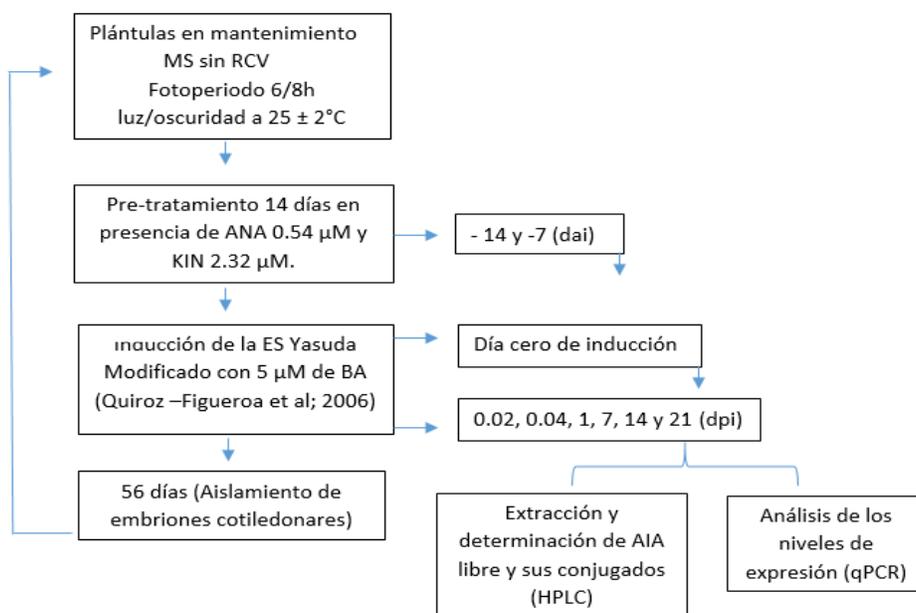


Figura 1.9 Estrategia experimental para determinar el papel de los genes GH3 durante la inducción de la ES de *Coffea canephora*.

CAPÍTULO II

OBTENCIÓN DEL PROCESO EMBRIOGÉNICO EN CAFÉ, CUANTIFICACIÓN DE CONJUGADOS Y DETERMINACIÓN DE NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES GH3

2.1 INTRODUCCIÓN

Las auxinas son de gran importancia para el crecimiento y desarrollo de las plantas, se sabe que participan en procesos biológicos tales como tropismos, desarrollo vascular, elongación y división celular, entre otros. La auxina más estudiada es el ácido-indol-3-acético (AIA) (Davies, 1995). En la mayoría de los procesos conocidos regulados por el AIA los mecanismos de percepción, transporte, biosíntesis y conjugación son fundamentales y mayormente han sido estudiados en *Arabidopsis thaliana* (Woodward y Bartel, 2005).

La actividad y estabilidad de estos compuestos es modulada o regulada por medio de procesos de conjugación con diversos aminoácidos y glucosa. Estas reacciones son catalizadas por proteínas codificadas por genes de la familia GH3 (Westfall et al., 2012; Staswick et al., 2005). Esta actividad es una parte muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de la auxina, sin embargo, la base molecular por la cual una enzima GH3 selecciona algún RCV en particular para conjugarlo con un determinado aminoácido o con glucosa no es clara y poco se sabe acerca de sus funciones metabólicas y sus propiedades cinéticas (LeClere et al., 2002). La investigación reportada en esta tesis es un primer acercamiento al conocimiento de la función de las amido sintetisas codificadas por los genes GH3 en *C. canephora*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Se utilizaron de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* en medio de Murashie y Skoog (MS; (Murashige y Skoog, 1962); Phyto Technology Laboratories, M524) semisólido adicionado con tiamina-HCl 29.6 μ M (Sigma T3902), mio-inositol 550 μ M (Sigma, I5125), L-cisteína 0.15 μ M (Sigma, C-8277), sacarosa 87.64 mM (Sigma, S539) y 0.25 % (w/v) Gelrite (Sigma, G1910), bajo condiciones de fotoperiodo, 16 h luz/8 h

oscuridad ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) a una temperatura de $25 \text{ }^\circ\text{C}$, el medio fue ajustado a pH 5.8 y esterilizado a $121 \text{ }^\circ\text{C}$ (1 kg cm^{-2}) por 20 min, y fue resembrado cada 4 semanas (Quiroz-Figueroa et al., 2006b).

2.2.2 Inducción de la embriogénesis somática

Para la inducción embriogénica de *C. canephora* las plántulas, de las cuales se obtuvieron los explantes, fueron tratadas por dos semanas en un medio el cual contenía $0.54 \mu\text{M}$ de ácido naftalen acético (ANA) y $2.32 \mu\text{M}$ de Kinetina (KIN), cabe mencionar que sin este pre-tratamiento no existe una respuesta embriogénica. La inducción de la ES fue llevada a cabo bajo el protocolo descrito anteriormente (Quiroz-Figueroa et al., 2006b). Una vez que las plántulas fueron pre-tratadas se tomaron pequeños discos (explantes) provenientes del primer y segundo par de hojas con ayuda de un sacabocados de aproximadamente 10 mm y fueron depositados cinco explantes en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido (Yasuda et al., 1985) el cual contenía $5 \mu\text{M}$ de benciladenina (BA) como único regulador, los explantes fueron incubados bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ y mantenidos en agitación constante a 60 rpm durante 56 días.

2.2.3 Extracción de ácido indol-3- acético y sus conjugados.

Fueron colectados un total de 100 mg de tejido foliar por cada punto de muestreo, desde el inicio del pre-tratamiento (días -14 y -7) hasta la inducción (día cero). También se colectaron muestras durante los primeros 30 y 60 min de inducción así como 1,7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Posteriormente el tejido colectado fue congelado y almacenado hasta su uso a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres muestras biológicamente distintas a partir de experimentos independientes.

El tejido congelado fue macerado en presencia de nitrógeno con ayuda de un mortero, una vez macerado se le adicionó 1 mL de agua ácida ajustado con HCl a un de pH 2.8. La mezcla obtenida se le adiciono 1 mL de una solución de hidroxitolueno butilado (Acros Organics, 112992500) y de acetato de etilo (CTR Scientific, CTR 00184), posteriormente la mezcla fue transferida a un tubo de ensayo con 1 mL adicional de agua ácida. La mezcla fue agitada durante 1 min y se le adiciono 2 mL más de acetato de etilo (CTR

Scientific, CTR 00184). Se agitó 1 min y se recuperó el sobrenadante y seguidamente se adicionó 2 mL de acetato de etilo (CTR Scientific, CTR 00184), se agitó durante 1 min, se recuperó el sobrenadante y se repitió el proceso una vez más. De esta mezcla se tomaron 3 mL del total de la fase orgánica y se evaporó con ayuda de nitrógeno gaseoso. Una vez seca la muestra fue resuspendida en 1 mL de la fase móvil (60% acetonitrilo; J. T. Baker, 9017-03: 40% agua conteniendo 0.5% ácido acético; CTR Scientific, 00500), filtrada a través de un filtro Millipore (0.22 µM).

2.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se inyectaron 20 µl del extracto, como se describió en el texto anterior. Los compuestos en los extractos de los tejidos fueron sometidos a una separación cromatográfica con un sistema de elución isocrático (mezcla de disolventes fija) con una velocidad de flujo de 0.6 mL/min⁻¹ en una columna de fase reversa C18 (Kromasil C18- 250mm x 4.60 mm; Phenomex 00G-3033-E0), utilizando como fase móvil una mezcla de 60% acetonitrilo; (J. T. Baker, 9017-03) y 40% agua conteniendo 0.5% ácido acético, filtrada y desgasificada. Las muestras fueron analizadas con un detector de fluorescencia (Agilent Technologies G1321A). Para este trabajo fue utilizado un cromatógrafo de líquidos marca Agilent Technologies 1200 con un sistema de bombas cuaternario modelo G1311A, con un auto-inyector modelo G1329A, utilizando una longitud de onda de emisión y una longitud de excitación de 280 nm. Los tiempos de retención y los picos de altura del AIA (Fluka, 45533), y sus conjugados, fueron utilizados como estándares para determinar la presencia en las muestras extraídas.

2.2.5 Estándares y curvas de calibración

Para los estándares se pesó con exactitud 0.001 g (1 mg) de los conjugados AIA- alanina, AIA- glutámico y AIA-leucina, al igual que del AIA, los cuales, de manera individual, se disolvieron en 1 mL de acetonitrilo (grado HPLC) en viales de 1.5 mL y fueron agitadas, posteriormente para las curvas de calibración se diluyeron volúmenes de 5, 10 15 20 y 25 µL de la segunda solución con acetonitrilo para obtener concentraciones diluidas de 0.203, 0.406, 0.609, 0.812 y 1.01 nmoles respectivamente. Las curvas de calibración se realizaron con los estándares, tanto libres como conjugados, usando el área debajo de cada pico de cada compuesto.

2.2.6 Extracción de ARN y síntesis del ADNc

El ARN total fue aislado utilizando el kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (R2051), siguiendo las instrucciones del fabricante, a partir de 50 mg de muestra de tejido foliar (explantos de los días -14 y -7) anteriores a la inducción, así como los días posteriores a la inducción (0, 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21), los cuales fueron congelados a -80 °C. La concentración y la pureza del ARN fueron verificadas por medio de un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y fueron analizadas en geles de agarosa al 1.5 % y teñidas con GelRed™.

La síntesis del ADNc se llevó a cabo en un volumen final de 24 µL y se utilizó el kit SuperScript® First-Strand (Invitrogen). Fue generado a partir de un µg del ARN total, al cual se le agregaron 2.5 µL de una mezcla que contenía los dNTPs (10 mM) y un µL de oligo dT (0.5 µg µL⁻¹) y el volumen final fue ajustado con agua DEPC hasta un total de 10 µL. La mezcla se incubó a 65 °C por un tiempo de 5 minutos y posteriormente fue enfriada en presencia de hielo por un minuto. Posteriormente a la mezcla le fueron adicionados 2 µL de amortiguador (Tris-HCl, 100 mM; KCl, 500 mM; MgCl₂, 1.5 mM, pH 8.3), 4 µL de MgCl₂ (25 mM), 2 µL de DTT y 1 µL de RNasa out y fue incubada a 42 °C por 2 minutos. Posteriormente se le adicionó un µL de Super Script II RT; la mezcla fue incubada a 42 °C por un total de 50 minutos y la reacción fue detenida a 70 °C por 15 minutos. Para eliminar todo el ARN sin reaccionar se adicionó un µL de RNasa H y se incubó por 20 minutos a 37 °C.

2.2.7 Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores, lo primero que se realizó fue una búsqueda de los posibles genes GH3 en la base de datos del genoma de café (<http://coffee-genome.org/>) (Denoëud et al., 2014). Se determinó que existen 6 genes que codifican para GH3 análogos a los genes GH3 de *A. thaliana*. Con el fin de diseñar cebadores específicos para cada gen se alinearon los seis genes para obtener las zonas no homólogas entre ellos. Para ello se usó el software ClustalW2 Multiple Sequence Alignment (<http://www.ebi.ac.uk/>). Una vez alineadas se seleccionaron las zonas no homólogas para cada uno de los genes. Con cada una de estas secuencias y utilizando el programa Oligo explorer 1.2 (<http://softadvi.Oligo Explorer 1.2 Software.html>) se diseñaron los cebadores respectivos. Cada uno de los cebadores diseñados se probó utilizando los programas

Oligo analyzer 3.1 (<http://www.idtdna.com/calc/analyzer>) y Oligo evaluator (Sigma Aldrich) (<http://www.oligoevaluator.com/OligoCalcServlet>).

Cuadro 2.1 Secuencias de los cebadores específicos para los genes GH3 estudiados durante el pre-acondicionamiento e inducción de la ES en *Coffea canephora*.

Gen	Iniciadores	Tamaño del producto (pb)
<i>GH3. 1</i>	5'-TCCAGAAGATGGTCTTGGCAG-3' 5'-CTGCAAAACTCGTGTACTCC-3'	197
<i>GH3. 3</i>	5'-ATCGACTCGGACAAGACAG-3' 5'-CTGCAAAACTCGTGTACTCC-3'	109
<i>GH3. 5</i>	5'-TCTAAAGCCTGACCCACAAC-3' 5'-ATGGTCCCAGTCACGATAAC-3'	159
<i>GH3. 6</i>	5'-ACGTCAAGAGTCGGTTGCTA-3' 5'-CATTGTAGGGCTCCAGAAG-3'	126
<i>GH3. 9</i>	5'-ACGTCAGAGTCGGTTGCTA-3' 5'-CATTGTAGGGCTCCAGAAG-3'	228
<i>GH3. 17</i>	5'-TTGTGCAGCGAAGATGCGATA-3' 5'-TAGGCTGGCGAACTACAAGC-3'	361
* <i>Actina</i>	5'-GGAGAGAGTATGAGCTGCCTGAC-3' 5'-CATACGATCAGCATAACCAGGGAA-3'	250

*Gen constitutivo usado como gen de referencia.

2.2.8 Condiciones de corrida para la PCR

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo utilizando una concentración inicial de 500 ng de ADNc para cada una de las muestras, 1 µL de Taq ADN polimerasa, 1 µL de cada cebador (10 mM), 5 µL de dNTPs (10 mM), 7.5 µL de MgCl₂ (50 mM) y 2.5 µL de amortiguador 10 X, el volumen total fue ajustado con agua libre de nucleasas y DNAsas a un volumen final de 24 µL. Las condiciones de corrida para la PCR de cada gen fueron las siguientes GH3.1: 95°C durante 3 min, 30 ciclos de 94° C durante 25 s, 52°C durante 30 s, 72°C durante 20s y una extensión final de 72° durante 3 min, GH3.3 : 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 94° C durante 20s, 61°C durante 30 s, 72°C durante 20 s y una extensión final de 72° durante 3 min, GH3.5: 95°C durante 3 min, 35 ciclos de 94°C

durante 20s, 60°C durante 30s, 72°C durante 20s y una extensión final de 72° durante 3 min, GH3.6: 95°C durante 5 min, 35 ciclos de 94° C durante 25s, 59°C durante 25s, 72°C durante 20 s y una extensión final de 72° durante 3 min, GH3.9: 95°C durante 4 min, 30 ciclos de 94° C durante 20s, 60°C durante 30s, 72°C durante 20 s y una extensión final de 72° durante 3 min, GH3.17: 95°C durante 4 min, 30 ciclos de 94° C durante 25s, 55°C durante 30s, 72°C durante 20 s y una extensión final de 72° durante 3 min y como gen testigo se utilizó la expresión del gen constitutivo actina: 95°C durante 5 min, 30 ciclos de 94° C durante 25s, 62°C durante 30s, 72°C durante 20 s y una extensión final de 72° durante 3 min. Los productos obtenidos de PCR fueron visualizados en un gel de agarosa al 1.5 % y teñidos con GelRed™. Mediante la intensidad de la banda se determinó la presencia o ausencia de los genes de interés durante el proceso de ES.

2.2.9 Condiciones de reacción de q-RT-PCR

Para la determinación cuantitativa de la expresión de los genes GH3 se utilizó la técnica de qPCR. Se llevó a cabo utilizando 150 ng μL^{-1} de ADNc. Se adicionó 1 μL de ADNc a 5 μL del Kit Express Sybr® Greener™ QPCR SuperMix whit Premixed ROX (INVITROGEN) y a esta reacción se le agregaron un μL de cada cebador. Se ajustó a un volumen final de 10 μL con agua DEPC. La reacción se llevó a cabo en un equipo para PCR en tiempo Real time PCR system ECO PIXO HELIXIS (Illumina, EC-900-1001) en las siguientes condiciones: 95°C durante 10 min, 40 ciclos de 95°C durante 15s, 60°C durante 45s y tres etapas para la curva de fusión (95 ° C durante 15 segundos, 55 ° C durante 15 segundos y 95 ° C durante 15 segundos), utilizando como normalizador de los niveles de transcritos correspondientes al gen actina. El análisis se realizó con el software EcoStudy (Illumina, versión 5.0.4890). Los niveles de transcritos correspondientes a los genes *GH3.1*, *GH3.3*, *GH3.5*, *GH3.6*, *GH3.9* y *GH3.17* en las muestras fueron normalizadas al nivel de expresión del gen de actina y los datos fueron expresados como el nivel de expresión relativa mediante el método de la $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ (Livak y Schmittgen, 2001) utilizando los datos de la expresión de los genes blanco en relación con el gen utilizado como testigo. Los datos fueron analizados en una hoja de cálculo de Excel tomando los datos resultantes de los Ct de cada gen, introduciendo la media de las repeticiones de cada día de muestreo en la ecuación $\Delta\Delta\text{Ct}$, en la que $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct, Target} - \text{C, Actina}) \text{Time x} - (\text{Ct, Target} - \text{C, Actina})$

Time 0 y los datos normalizados obtenidos se usaron para construir las gráficas con el programa Origin© 2012 (OriginLab Corporation).

2.2.10 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron y procesaron utilizando un programa para análisis de variancia (ANOVA). El grado de significancia entre la media de los valores se determinó usando la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas a $P \leq 0.05$. Los datos se analizaron con el programa Origin versión 8 (OriginLab Corporation).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Inducción de la ES en *Coffea canephora*

Durante la inducción de la ES en *C. canephora*, tanto las auxinas exógenas, como las auxinas endógenas, mantienen una importante relación entre ellas. Las plántulas, fueron sembradas en medio MS semisólido complementado con 0.54 μM de ácido naftalén acético (ANA) (Sigma, N-1145) y 2.32 μM de kinetina (KIN) (Sigma, K0753) por 14 días. Las muestras se obtuvieron con ayuda de un sacabocado de 10 mm de diámetro de los primeros dos pares de hojas verdaderas. Se depositaron cinco explantes en matraces de 250 mL con 50 mL de medio líquido de Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985) y adicionado con 5 μM de BA (PhytoTechnology Laboratories, B800) (Quiroz-Figueroa et al., 2006b). Los matraces fueron mantenidos en agitación (55 rpm) y en condiciones de oscuridad a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, durante un período de 56 días. Los días de colecta de las muestras se señalaron en la estrategia experimental.

Las primeras estructuras embriogénicas se pueden observar pasados los 21 días de la inducción de la ES (Figura 2.1). Una vez que aparecen las primeras estructuras, el proceso se vuelve exponencial. Se produce una gran cantidad de embriones en forma asincrónica, por lo que 56 días posteriores a la inducción de la ES se pueden observar

todos los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos al mismo tiempo (Figura 2.1).



Figura 2.1 Inducción de la ES en *Coffea canephora*. El proceso de ES fue inducido como fue reportado previamente (Quiroz-Figueroa et al., 2006), cada fotografía fue tomada a los 7, 14, 21 y 56 días después de la inducción de la ES. Las plántulas fueron cultivadas *in vitro* en un medio MS suplementando con 0.54 μM de ácido naftalen acético (ANA) y 2.32 Mm de Kinetina (KIN) por dos semanas antes de la inducción de la ES. Después del periodo de pre-acondicionamiento, los explantes fueron incubados en un medio de Yasuda modificado líquido suplementado con 5 μM de benciladenina (BA). Páneles superiores, de izquierda a derecha se tienen desde los explantes iniciales, hasta 56 días después de la inducción de la ES.

Con el fin de determinar la presencia de cualquier anomalía en los embriones somáticos, se procedió a aislarlos de la masa pro-embriogénica y fueron observados en el microscopio. Después de analizar cientos de estructuras no se observó ningún tipo de malformación en los embriones, por el contrario siempre se observaron estructuras perfectamente formadas. Finalmente, para demostrar que los embriones somáticos que se producen son viables, se procedió a su germinación. Para ello, los embriones somáticos se colocaron en medio de Murashige y Skoog sin RCV. Los embriones somáticos germinaron al poco tiempo y las plantas se desarrollaron de manera vigorosa. Estos resultados muestran que los embriones somáticos obtenidos son perfectamente normales (Figura 2.2).

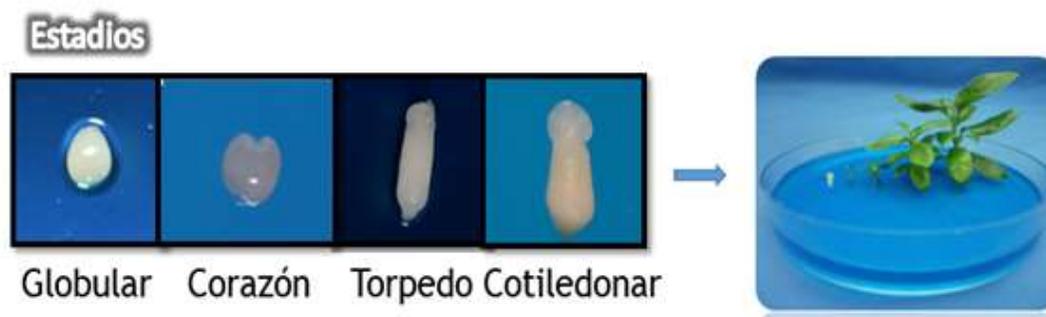


Figura 2.2 Germinación de los embriones somáticos. De izquierda a derecha, se muestra los diferentes estadios de los embriones somáticos: globular, corazón torpedo y cotiledonar; los embriones cotiledonares fueron germinados en un medio MS y prácticamente cada embrión se desarrolla en una planta sana y vigorosa.

2.3.2 Detección de auxina libre y conjugada

En primera instancia se determinaron las condiciones de separación de los conjugados de AIA. Todas las condiciones fueron iguales tanto para la separación de las auxinas libres así como de los conjugados, en el laboratorio se cuenta con una metodología de extracción y detección de auxinas (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). En la Figura 2.3 se muestra el cromatograma de los estándares de AIA-Glu, AIA-Ala y AIA-Leu, así como el estándar del AIA. Los tiempos de retención para los conjugados fueron de 3.86 min para el AIA-Glu, 4.29 min para el AIA-Ala, 5.58 para el AIA-Leu y de 5.0 min para el AIA.

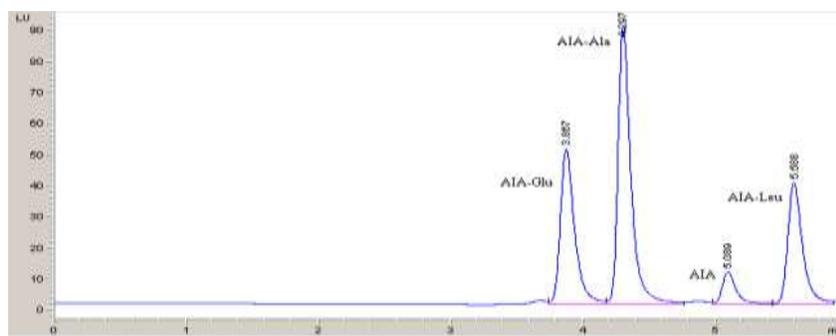


Figura 2.3 Cromatograma en el que se muestra la separación y detección del AIA y de sus conjugados. Indicando en el eje de las abscisas el tiempo de retención (min) y en el eje de las ordenadas las unidades de luminancia (LU).

En relación con el contenido del AIA y sus conjugados se pudo determinar que en los explantes iniciales (día -14) el contenido de AIA fue de 0.221 nmoles g^{-1} PF. Este contenido aumentó de manera importante durante los siguientes 14 días de pre-tratamiento, alcanzando un máximo de 2.13 nmoles g^{-1} PF en el día cero (Figura 2.4). Esta determinación muestra que el contenido de AIA aumentó 6 veces en relación con su contenido inicial. Catorce días después de la inducción de la ES, el contenido de AIA disminuyó a 0.422 nmoles g^{-1} PF y a 0.324 nmoles g^{-1} PF después de 21 días de la inducción de la ES. Este último valor es prácticamente el valor inicial en la cantidad de AIA presente en los explantes (Figura 2.4). Este dato de la dinámica en la cantidad de AIA durante el proceso de pre-tratamiento y la inducción de la ES son muy interesantes y comprueban los datos previamente reportados por nuestro grupo (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

Los datos de la cantidad de conjugados de AIA presentes durante el proceso de pre-tratamiento y de la inducción de la ES también muestran un importante dinamismo. El contenido del conjugado AIA-Glu se encuentra en una concentración de más de 85 nmoles g^{-1} PF en el día -14, esto es al momento que las plantas se colocan en el medio de pre-acondicionamiento. La concentración de esta conjugado aumenta cerca de 20 % catorce días después del inicio de la pre-incubación. Este conjugado, que junto con el conjugado de AIA-Asp son el inicio de la ruta de degradación del AIA, desaparece totalmente durante la inducción de la ES. El conjugado de AIA-Ala tiene un destino completamente diferente al del conjugado AIA-Glu. El contenido de AIA-Ala inicial es de 2.49 nmoles g^{-1} PF, aumenta a 6.33 nmoles g^{-1} PF en el día -7 de la pre-incubación y a 8.17 nmoles g^{-1} PF 14 días después de iniciada la pre-incubación (Figura 2.4). Cuando los explantes son incubados en el medio de inducción de la ES, el contenido de AIA-Ala disminuye 50 % después de 14 días de incubación en el medio de inducción de la ES, y alcanza una concentración de 2.56 nmoles g^{-1} PF.

Cuando aparecen las primeras estructuras embriogénicas, alrededor del día 21 de incubación en el medio de inducción de la ES, la concentración del AIA-Ala aumenta alrededor de 10 veces de la concentración que se tenía el día 7. En cuanto al contenido endógeno del conjugado AIA- leucina se puede decir que en el día -14, se observa un contenido de 4.43 nmoles g^{-1} PF y registra su mayor contenido (4.71 nmoles g^{-1} PF) en el

día 7 de la inducción de la ES. Es posible que durante la etapa en la que prácticamente desaparecen los conjugados, estén participando genes de la familia de las amino hidrolasas. Después de este punto se observa un repunte en la concentración de estos conjugados, posiblemente porque se sintetiza AIA y se empieza a convertir en sus diferentes conjugados.

Es importante hacer la diferencia en el destino de los conjugados del AIA, mientras que el conjugado AIA-Glu desaparece por completo durante la inducción de la ES, los conjugados AIA-Ala y AIA-Leu aumentan de manera importante. Este comportamiento refleja la función de cada uno de estos compuestos. Mientras que el AIA-Glu lleva al AIA a su degradación, los conjugados AIA-Ala y AIA-Leu son almacenados, de tal forma que el AIA puede ser recuperado más tarde mediante la acción de un conjunto de enzimas, de la familia de las amidohidrolasas, que son capaces de hidrolizar el enlace amida y liberar al AIA. Este mecanismo de conjugación del AIA permite una regulación muy precisa en la concentración del AIA, lo cual se necesita para mantener la homeostasis del AIA y controlar el proceso de diferenciación celular (Bajguz y Piotrowska, 2009).

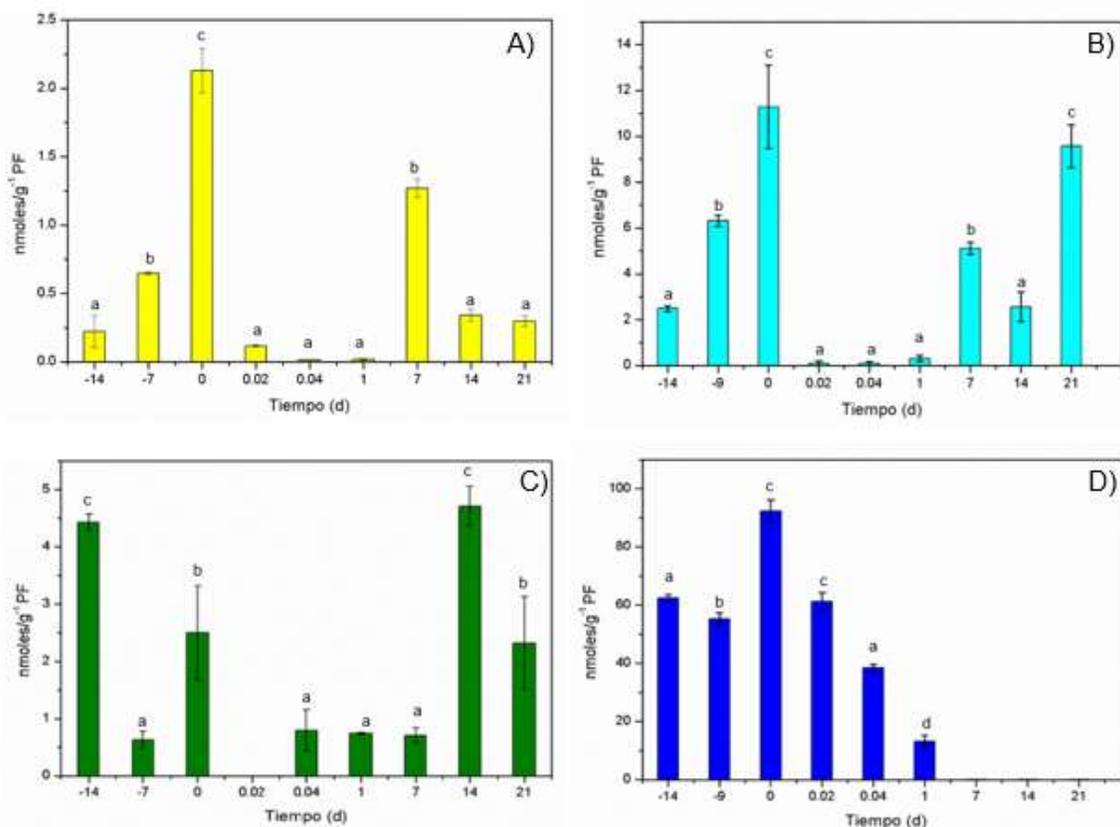


Figura 2.4 Cantidad de ácido indol-3-acético (AIA) y sus conjugados, antes y durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (A) AIA; (B) AIA-alanina; (C) AIA-leucina y (D) AIA-glutámico. Se colectaron 100 mg de tejido foliar a partir del inicio del pre-tratamiento de las plántulas (días -14 y -7) y hasta el día de inducción de la ES (día 0). También fueron colectadas muestras días posteriores a la inducción de la ES (0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21). Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis fueron llevados a cabo con tres replicas biológicas de diferentes experimentos. Todos los datos se analizaron y procesaron utilizando un programa para análisis de variancia (ANOVA). Letras diferentes en las barras representan el nivel de significancia de la diferencia de las medias entre cada una de las determinaciones de los tiempos estudiados mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

2.3.3 Extracción de ARN total

Se estandarizó la técnica de extracción de ARN utilizando el kit Direct-zol RNA MiniPrep, como se describe en materiales y métodos. Primeramente se utilizaron 50 mg de tejido

foliar provenientes de los explantes de hojas de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* en un medio MS sin RCV, utilizando muestra del día -14 (testigo). Una vez estandarizada la extracción de ARN se procedió a realizar la extracción de las muestras de los días -7, 0, 7, 14 y 21 días provenientes del pre- tratamiento e inducción de la ES. En la figura 2.5 se puede apreciar que la calidad del ARN total extraído fue buena para los días de muestreo ya que se pueden ver claramente demarcadas las bandas de los ARN ribosomales.

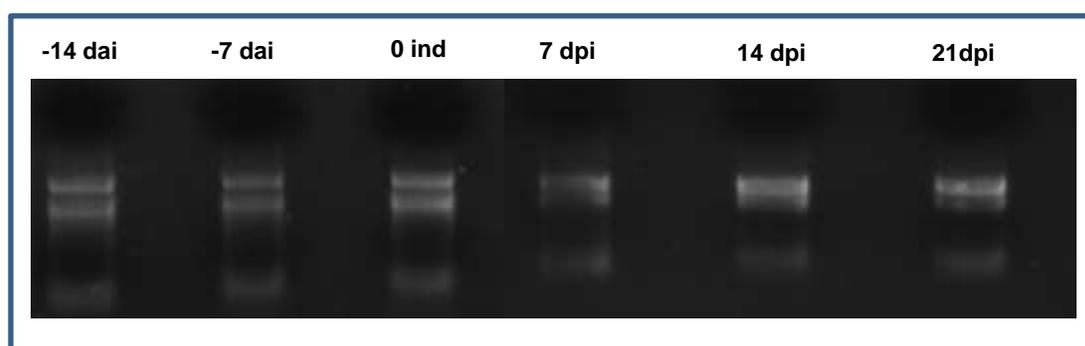


Figura 2.5 Integridad del ARN total aislado de los días (-14, -7 y 0) anteriores a la inducción (dai) de la embriogénesis somática, el día 0 de la inducción (ind) y los días (7, 14 y 21) posteriores a la inducción (dpi). En cada pozo de un gel de agarosa al 1.5 % se cargó 1 μL de la muestra. Las bandas se visualizaron utilizando Red Gel como colorante.

2.3.4 Producto de PCR del gen constitutivo actina

Posterior a la estandarización y extracción del ARN para cada uno de los días de muestreo, se realizó la síntesis de ADNc a partir 1 μg de ARN como se describe en materiales y métodos. Posterior a la síntesis, las muestras fueron normalizadas a 150 ng μL^{-1} utilizando el gen constitutivo que codifica para actina como un testigo positivo endógeno, esto con la finalidad de probar que el ADNc es de buena calidad y que la ausencia del gen durante los días de muestreo no se debe a una mala síntesis del ADNc. La electroforesis fue realizada en un gel de agarosa al 1.5 %. Como se puede apreciar la banda para el gen de actina es muy clara y homogénea, indicando que todo el procedimiento está correcto (Figura 2.6).

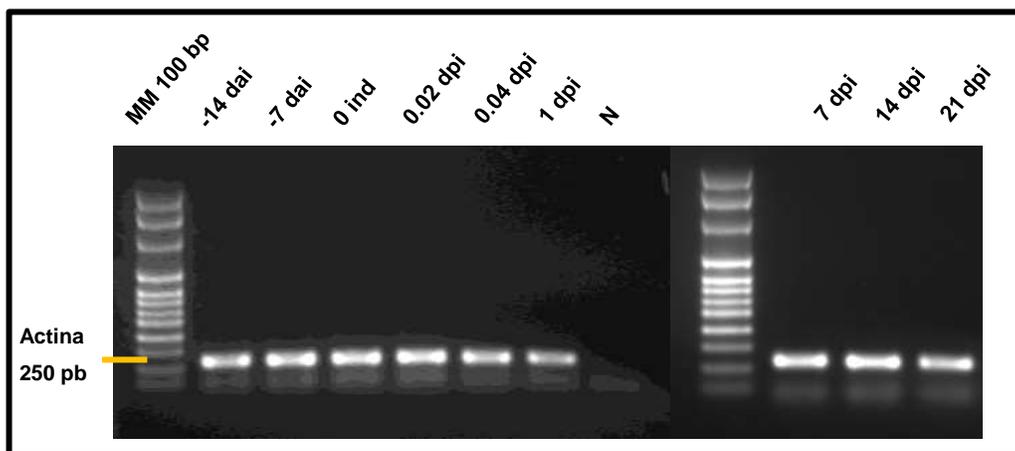


Figura 2.6 Análisis de la expresión del gen de actina sintetizado a partir del ARN total extraído de explantes foliares de *C. canephora*. En el primer carril se muestra el marcador molecular (MM) de 100 pb. Los días anteriores a la inducción (dai) de la embriogénesis somática (-14 y -7), el día 0 de inducción (ind) y los días (0.02, 0.04, 1, 7 14 y 21) posteriores a la inducción (dpi). Control negativo (N).

2.3.5 Determinación de los niveles de expresión de los genes GH3 durante el proceso de ES

Durante el proceso de ES existen mecanismos que posiblemente regulen las etapas que dan lugar a la diferenciación de una célula somática en una célula embriogénica, tales procesos son regulados por la expresión de diferentes genes que responden a los estímulos o en respuesta a la presencia de una auxina. Estos genes codifican para proteínas que disparan diferentes vías o cascadas de señalización. Previamente en nuestro grupo de trabajo se ha sugerido que algunos de los genes como *LEC*, *BBM*, *SERK*, *WUSCHEL*, *YUC1*, *TAA1* y *GH3* están involucrados con el disparo de la señal que provoca la diferenciación celular (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). La expresión de varios de ellos produce un aumento en la respuesta morfológica. En este proyecto se estudió la expresión de genes de la familia GH3, tanto durante el pre-acondicionamiento de las plantas, como durante la inducción del proceso embriogénico.

La presencia de los transcritos de los genes GH3 se determinó al detectar la banda correspondiente al producto de PCR para cada juego de cebadores ensayados. Los resultados se muestran en la figura 2.7. Se puede observar que los genes GH3.1, GH3.3 y GH3.9 prácticamente no se expresan durante los primeros días del precondicionamiento, sin embargo, justo en el día cero, cuando los explantes son depositados en el medio de inducción, los niveles de estos transcritos incrementan. El gen GH3.1, después de alcanzar su máxima expresión una hora después de la inducción de la ES, empieza a disminuir y para el día 14 después de la inducción de la ES casi ha dejado de expresarse. En el caso de la expresión del gen GH3.3 la máxima expresión se da a partir de los 14 días después de la inducción de la ES. El gen GH3.9 se expresa intensamente durante la primera hora de la inducción de la ES y después disminuye de manera importante.

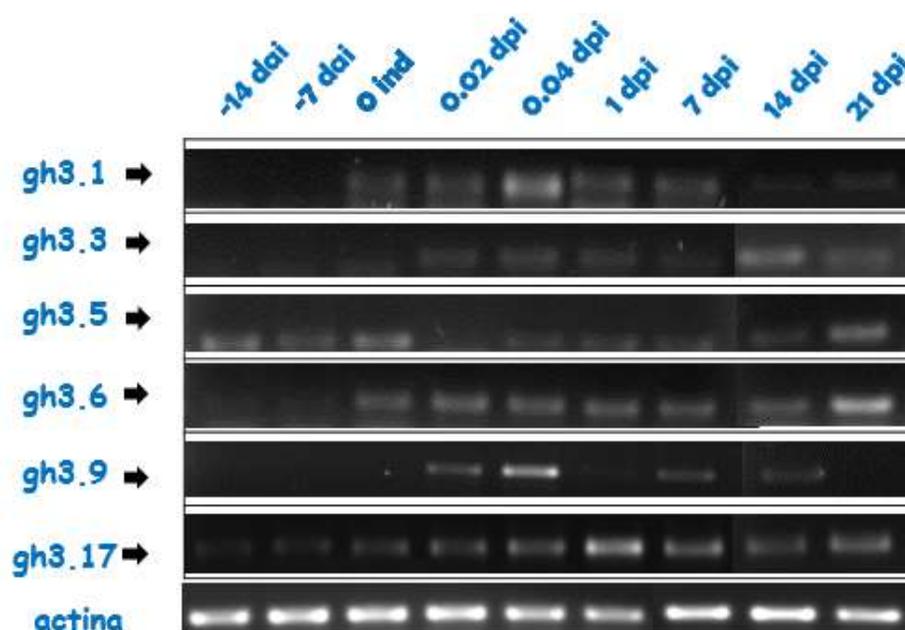


Figura 2.7 Determinación de la expresión de los genes que se encuentran involucrados en el proceso de conjugación del AIA con diferentes aminoácidos en *C. canephora* por medio de la técnica de PCR punto final. Fue utilizado como gen testigo la expresión del gen que codifica para actina. En la columna de la izquierda se enlistan los 6 genes gh3 de *C. canephora*. Los días anteriores a la inducción (dai) de la embriogénesis somática (-14 y -7), el día 0 de inducción (ind) y los días (0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21) posteriores a la inducción de la ES (dpi).

En el caso de los genes GH3.5, GH3.6 y GH3.17 su patrón de expresión fue diferente. Estos genes se expresan durante todo el proceso, desde el pre-acondicionamiento hasta la inducción de la ES, es decir desde el día -14 hasta el día 21.

Un aspecto muy interesante es que el GH3.5 no se expresa durante los primeros 30 minutos después de la inducción de la ES (Figura 2.7). Sin embargo, se vuelve a expresar 60 minutos después de la inducción de la ES y aumenta su expresión hacia los 21 días después de la inducción de la ES. Estos niveles de expresión elevada coinciden con los mayores niveles de AIA-Ala y AIA-Leu (Figura 2.4). El gen GH3.17 se expresa muy poco al inicio del pre-tratamiento y alcanza su máxima expresión un día después de la inducción de la ES. El patrón de expresión del gen GH3.6 muestra que empieza a expresarse al momento de la inducción de la ES, su expresión se mantiene constante hasta el día 14, y entonces aumenta su expresión de forma sustancial. De hecho es el gen que más se expresa de los seis genes GH3 en el día 21.

2.3.6 Expresión de los genes GH3 por medio de qRT-PCR, durante el proceso embriogénico

El PCR de punto final nos da una idea del nivel de expresión de un gen bajo un cierto conjunto de condiciones, sin embargo, no nos proporciona un valor cuantitativo. Por esa razón procedimos a determinar mediante PCR cuantitativo el nivel de expresión de los genes GH3 durante el proceso embriogénico.

Un aumento en el contenido del AIA conjugado implica un aumento en la actividad de las amido sintetasas, producto de los genes GH3, o un incremento en la transcripción de estos genes. Como se mencionó previamente, en *C. canephora* determinamos 6 miembros de la familia GH3, los genes GH3.1, GH3.3, GH3.5, GH3.6, GH3.9 y GH3.17, nombrados así por analogía con los miembros GH3 en *A. thaliana*.

Se determinó que la expresión del gen GH3.1 mostró cambios significativos en los primeros 7 días de pre-acondicionamiento con un aumento de 4 veces. Su expresión volvió a los niveles iniciales después de 14 días de pre-tratamiento. Treinta minutos después de la inducción de la ES la expresión del gen GH3.1 aumentó un poco más de 7 veces comparada con su expresión al momento de la inducción. Este aumento disminuye a sólo 4.5 veces una hora después de la inducción de la ES y a dos veces después de la

inducción de la ES (Figura 2.8). Después de 7 y 14 días de la inducción de la ES la expresión del gen GH3.1 volvió a aumentar hasta 8.5 veces de su nivel de expresión al inicio de la inducción de la ES. Veinte y un días después de la inducción de la ES, cuando se empiezan a observar las primeras estructuras pro-embriogénicas, ha disminuido a 3.5 veces de sobre-expresión de este gen. En general, el gen GH3.1 se sobre expresa durante los primeros 21 días después de la inducción de la ES.

La expresión del gen GH3.3 disminuyó durante los 14 días del pre-tratamiento. Sin embargo, 30 minutos después de la inducción de la ES la expresión de este gen aumenta de forma muy importante en los primeros treinta minutos después de la inducción de la ES. Su expresión disminuye a la mitad el primer días y su expresión prácticamente desaparece 7 días después de la inducción de la ES. Catorce días después de la inducción de la ES la expresión del gen GH3.3 disminuyó a casi cero. Siete días después la expresión de este gen volvió a los niveles de expresión del inicio de la inducción de la ES y a los 21 días después de la inducción de la ES volvió a sus niveles originales (Figura 2.8).

La expresión del gen GH3.5 se mantiene en los mismos niveles de expresión durante todo el periodo de pre-tratamiento. De igual manera, la expresión del gen GH3.5 no mostró ninguna diferencia estadísticamente significativa durante la inducción de la ES (Figura 2.8).

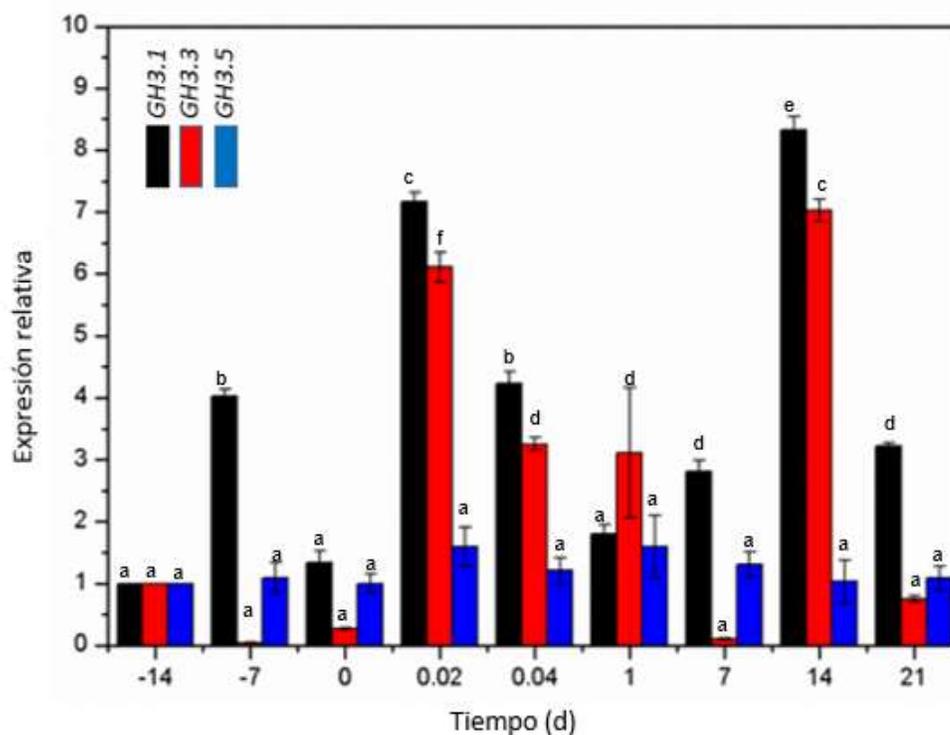


Figura 2.8 Análisis mediante qPCR para la expresión de los genes *GH3.1* (barras negras), *GH3.3* (barras rojas) y *GH3.5* (barras azules) durante el pre-tratamiento e inducción de la ES. Se colectaron 50 mg de tejido desde el principio del pre-tratamiento de las plántulas (días -14, -7) y hasta el día de la inducción (día cero). También se colectaron muestras a los 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis fueron llevados a cabo con tres replicas biológicas de diferentes experimentos. Los datos se analizaron y procesaron utilizando un programa para análisis de variancia (ANOVA). Letras diferentes en las barras representan el nivel de significancia de la diferencia de las medias entre cada una de las determinaciones con respecto al día -14 de cada uno de los tiempos estudiados, mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

La expresión del gen *GH3.6* disminuye de forma sustancial durante los 14 días de pre-tratamiento. Sin embargo, Aumenta de forma muy importante, hasta tres, cuatro, y tres veces más, 30 minutos, 60 minutos y un día después de la inducción de la ES, respectivamente. Siete días después de la inducción de la ES el nivel de expresión vuelve a su nivel basal y aumenta tres y cinco veces, 14 y 21 días después de la inducción de la ES (Figura 2.9).

El nivel de expresión del gen GH3.9 disminuye durante los 14 días del pre-tratamiento. Aumenta hasta un poco más de dos veces a los 30 minutos de la inducción de la ES y disminuye a los niveles basales un día después de la inducción de la ES. Se mantiene en el mismo nivel a siete días y vuelve a aumentar a los 14 días después de la inducción de la ES para disminuir a un poco menos que el nivel basal 21 días después de la inducción de la ES (Figura 2.9).

La expresión del gen GH3.17 es muy similar al de la expresión del gen GH3.6, excepto que los niveles de expresión para el gen GH3.17 llega a alcanzar niveles de hasta 60 veces más expresión un día después de la inducción de la ES. El gen que codifica para la GH3.17 es el gen que más se expresa de los seis genes que codifican para GH3. La otra diferencia entre los niveles de expresión de las GH3.6 y GH3.17 es su expresión en el día cero; mientras que la expresión de la GH3.6 es muy pequeña, el de la GH3.17 llega a 25 veces el valor de la expresión inicial.

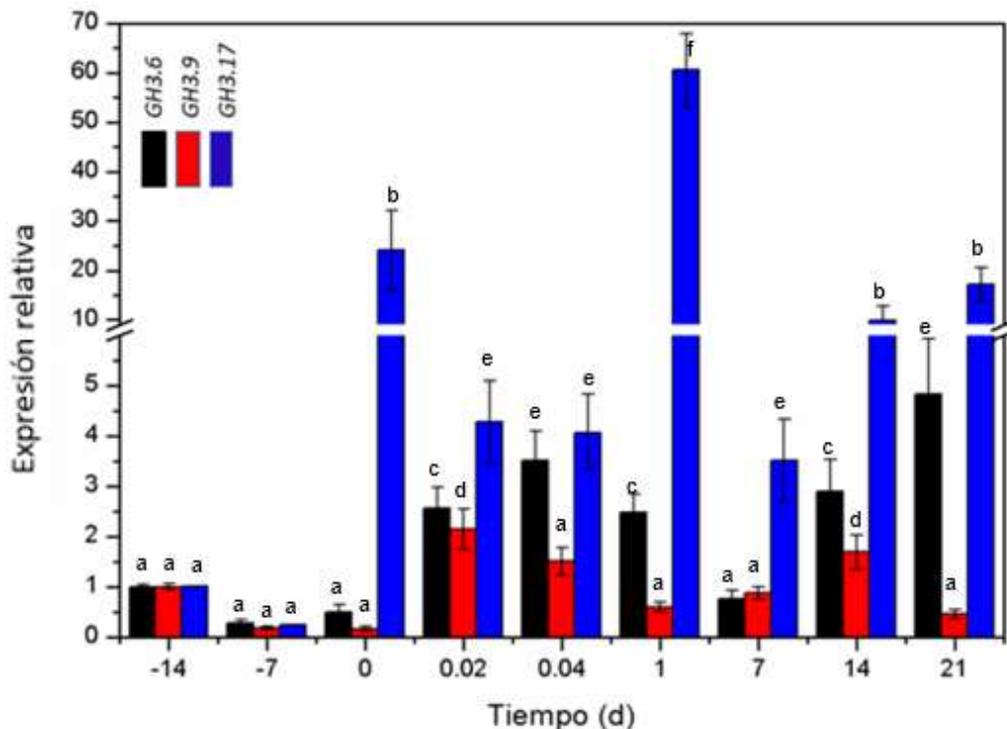


Figura 2.9 Análisis mediante qPCR para la expresión de los genes *GH3.6* (barras negras), *GH3.9* (barras rojas) y *GH3.17* (barras azules) durante el pre-tratamiento e inducción de la ES. Se colectaron 50 mg de tejido desde el principio del pre-tratamiento de las plántulas (días -14, -7) y hasta el día de la inducción (día cero). También se colectaron muestras a los 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis fueron llevados a cabo con tres replicas biológicas de diferentes experimentos. Los datos se analizaron y procesaron utilizando un programa para análisis de variancia (ANOVA). Letras diferentes en las barras representan el nivel de significancia de la diferencia de las medias entre cada una de las determinaciones con respecto al día -14 de cada uno de los tiempos estudiados, mediante la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

2.3.7 Análisis transcriptómico

En esta investigación se utilizaron los datos del transcriptoma realizado por Geovany Nic-Can y José Cetz-Chel (Cetz et al. en preparación). En resumen, se muestrearon seis puntos a lo largo del proceso de inducción de la ES; se muestrearon dos días de la pre-incubación (-14d y -9d), el día de la inducción de la ES (día cero) y tres puntos después de la inducción de la ES (24 h, 4 h y 21 d). Se realizaron un promedio de 46.6 millones de

lectura por muestra. La secuenciación para el transcriptoma se llevó a cabo en Applied Biological Materials Inc. en Richmond, Canadá. Para la secuenciación se usó la plataforma Illumina a través de la tecnología Ion Torrent (Life Technologies). El transcriptoma se realizó con duplicados biológicos para cada punto. Para este trabajo, una vez anotado el transcriptoma se determinó, en primera instancia, la ausencia o presencia de los seis genes GH3 que codifica para las amido sintetasas y que previamente habíamos determinado se encuentran presentes en el genoma del café.

El mapa de calor (Figura 2.10) muestra los genes GH3 que se expresan diferencialmente durante el pre-tratamiento e inducción de la ES. Todas las muestras se compararon con el día -14, ya que este día cuando se inicia el pre-tratamiento y deseamos saber qué cambios se producen a lo largo de los diferentes procesos en relación con el tejido original. En el transcriptoma determinamos la expresión de varias secuencias homólogas a los genes GH3. Los genes GH3.3, GH3.6, GH3.9 se expresan como secuencias únicas, en tanto que determinamos dos variantes del gen GH3.5, de GH3.1 determinamos cuatro variantes, en tanto que de GH3.17 determinamos ocho variantes.

Es muy interesante que en el caso del gen GH3.17 dos de sus variantes aumentan durante la inducción de la ES. Tres de estas no cambian su patrón de expresión y otras tres disminuyen su expresión. Los genes GH3.3 aumenta su expresión durante la inducción de la ES y disminuye durante el pre-tratamiento. La expresión del gen GH3.5 disminuye de forma importante durante la inducción de la ES. La expresión del gen GH3.9, después de mantenerse sin cambio a lo largo de casi todo el proceso, aumenta en el día 21. Este patrón es casi idéntico al patrón de expresión del patrón GH3.6. Dos de las copias de GH3.1 aumentan su expresión de forma importante hasta dos días después de la inducción de la ES y vuelve a los valores iniciales el día 21. La expresión de la otra copia de GH3.1 es exactamente al revés que el de sus homólogas. Lo más importante de los análisis transcriptómicos y de PCR es que sus resultados coinciden, como se esperaba.

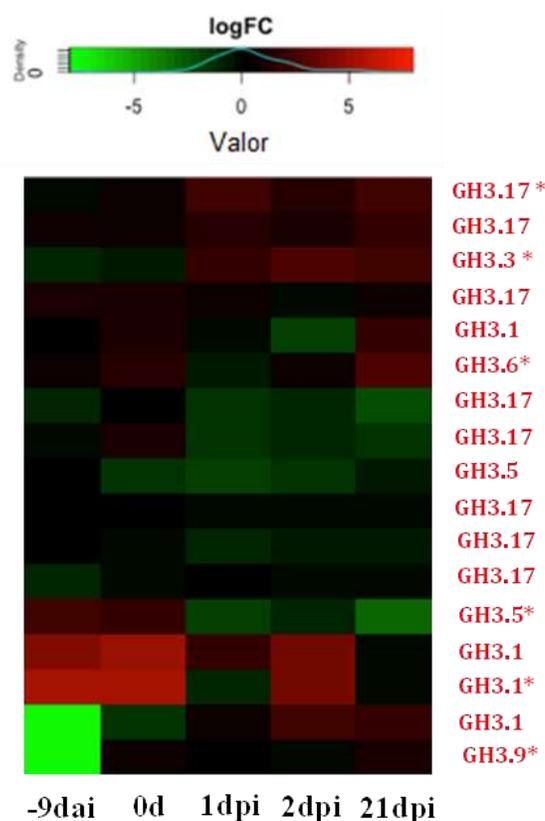


Figura 2.10 Mapa de calor para la expresión de los genes GH3 que son expresados diferencialmente durante algunos puntos del pre-tratamiento (-9), el día cero de inducción (0d) y los días (1, 2 y 21) posteriores a la inducción (dpi). El color verde indica una expresión reducida y el color rojo una expresión inducida de transcritos de los GH3 con respecto al día -14 de acuerdo al log₂ Fold change. Se observan todos los GH3 con sus copias que son responsivos a auxina en las condiciones del proceso embriogénico. *Genes analizados por PCR y qRT-PCR.

2.3.4 DISCUSIÓN

El proceso de ES es una herramienta muy útil para la propagación con fines comerciales, así como estudiar los fenómenos biológicos, bioquímicos y moleculares que están ocurriendo al momento de la formación de un embrión somático. Sin embargo, aún falta mucho por describir e investigar sobre este fenómeno. La ES es un proceso complejo que requiere de la interacción de múltiples señales, la expresión de diferentes genes y su interacción en una compleja red. Si bien se han identificado algunas de las señales y de

los genes que probablemente están involucrados en la red, aún no es posible construir la interacción completa, ya que falta una gran cantidad de información.

Una de las señales principales durante la inducción de la ES es la presencia/ausencia de auxinas. Las auxinas requieren de un complejo sistema de señalización y respuesta a su presencia. También es claro que la inducción de la ES y el desarrollo de los embriones somáticos requieren de un complejo balance de la homeostasis de las auxinas al interior de las células que están participando en el proceso (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). La dinámica de la homeostasis requiere que estén presentes, al mismo tiempo, la síntesis, degradación, transporte y almacenamiento de la auxina.

Durante el pre-tratamiento de las plántulas, de las que se tomarán los explantes, se produjo un aumento en el contenido de AIA y varios de sus conjugados (Figura 2.3). En nuestro laboratorio hemos determinado que la presencia de ANA en el medio de pre-tratamiento es el responsable de este aumento. También se ha determinado que este aumento se debe a la síntesis *de novo* del AIA (Pérez-Hernández et al., en preparación).

Es vital que las plántulas de *C. canephora* pasen por el pre-tratamiento. A los 14 días se detecta una concentración de más de 2 nmoles g PF⁻¹, justo antes de que los explantes sean depositados en el medio de inducción. El uso de inhibidores de la biosíntesis del AIA inhibe la ES. Así es que parece ser que la inducción de la ES requiere de un pulso inicial de auxina, lo que modifica el patrón de expresión de una compleja red de genes, y a continuación es necesario que se produzca una disminución en su contenido endógeno para que las células somáticas respondan al proceso embriogénico. En el caso de *Daucus carota*, sin la eliminación del 2,4-D del medio de cultivo, las células no cambian su programa genético, en cambio sí se retira la auxina del medio de cultivo las células responden al proceso embriogénico (Ribnicky et al., 1996).

En el caso de la ES de *C. canephora*, el AIA se encuentra mayormente en forma conjugada con alanina, leucina o ácido glutámico. Es posible que también esté conjugado con ácido aspártico, ya que el método de cuantificación que empleamos no distingue entre los ácidos glutámico y aspártico. De los tres conjugados que se determinaron en este estudio, el conjugado de AIA-Glu es el que se encuentra en mayor concentración,

forma en la mayoría de los casos más del 80 % del total de la concentración de la auxina en la célula.

La conjugación con los aminoácidos alanina e isoleucina lleva al AIA a ser almacenado en la vacuola. En tanto que la conjugación con los ácidos glutámico y aspártico conduce al AIA a su degradación (Westfall et al., 2010). Así, la conjugación del AIA juega un papel vital en su homeostasis. La hidrólisis de los conjugados AIA-leu y AIA-ala, por medio de un grupo de hidrolasas, produce AIA libre para la señalización (Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010). Este AIA se suma al AIA proveniente de la síntesis *de novo* para iniciar la cadena de señalización que lleva a la respuesta embrionaria.

En nuestro sistema embrionario de *C. canephora* determinamos que hasta el 95 % del total del AIA forma conjugados con los aminoácidos alanina, leucina y glutámico, lo que sugiere una actividad muy importante por parte de las amido sintetasas y de los genes que las codifican. Estas enzimas son codificadas una familia de genes denominada GH3 y conjugan al AIA y al jasmonato con diversos aminoácidos, benzoatos y glucosa (Okrent et al., 2009; Staswick y Tiryaki, 2004). Lo que es interesante es que mientras la conjugación del AIA lo inactiva, la conjugación del jasmonato con el aminoácido isoleucina lo convierte en la molécula activa (Staswick y Tiryaki, 2004).

En nuestro estudio determinamos que el conjugado de AIA-glu se degrada durante el primer día de inducción de la ES. Este dato, junto con la ausencia casi total de AIA libre (Figura 2.4), sugiere que probablemente este es el mecanismo mediante el cual el AIA es eliminado de los tejidos, permitiendo así la inducción de la ES. A las tres semanas de inducción de la ES, prácticamente el total del AIA se encuentra en la forma de conjugados de alanina y de isoleucina y menos del 5 % en forma de auxina libre.

Los datos obtenidos de las pozas de los diferentes conjugados del AIA sugieren que posiblemente también hay una dinámica muy importante en la expresión de los genes que codifican para las correspondientes enzimas. Nuestros resultados muestran, que con la excepción del gen GH3.5, los otros cinco genes GH3 muestran niveles elevados de expresión durante la inducción de la ES, y en algunos momentos del pre-tratamiento niveles por debajo de los valores iniciales (Figuras 2.7 y 2.8).

Tanto la conjugación, como la hidrólisis de los conjugados y la biosíntesis participan para mantener la homeostasis de la auxina en la célula (Bialek et al., 1983). Se sabe que un aumento en la concentración de AIA libre y una disminución o eliminación de auxina, es un factor importante para el desarrollo de embriones somáticos (Ribnicky et al., 1996). En el caso del café, ocurre algo similar en nuestro proceso embriogénico, puesto que a los 21 días después de la inducción de la ES, hay una coincidencia, entre la ausencia de AIA libre y la aparición de las primeras estructuras pro-embriogénicas.

En el genoma de *C. canephora* existen seis diferentes genes que codifican a la familia de genes *GH3*. Además, algunos de ellos tienen varias copias (Figura 2.9). Es posible que cada uno de ellos realice una función específica diferente. En *A. thaliana* la familia *GH3* está formada por 19 miembros y para once de ellos se desconocen los sustratos de las reacciones que catalizan (Westfall et al., 2012)

Los seis genes que determinamos que están presentes en el genoma del café, todos se expresan durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES. Para el producto de dos de ellos, *GH3.1* y *GH3.9* no se conoce ninguno de los sustratos de la reacción que catalizan, en tanto que los sustratos para los productos de los otros cuatro genes *GH3*, los *GH3.3*, *GH3.5*, *GH3.6* y *GH3.17* el sustrato de acilación es el AIA, ya que todos ellos pertenecen a la subfamilia II. En tanto que el aminoácido puede variar. Los productos de los genes *GH3.3*, *GH3.5*, *GH3.6* y *GH3.17* pueden usar metionina o triptófano, los tres primeros adicionalmente pueden utilizar ácido aspártico. Además los productos de los genes *GH3.3* y *GH3.5* pueden usar tirosina. El ácido glutámico es el sustrato de las enzimas codificadas por los genes *GH3.5* y *GH3.17*.

En arroz, de los once genes que forman la familia *GH3*, sólo se conoce los sustratos para dos de las enzimas, las *GH3.8* y la *GH3.13*. En ambos casos el sustrato de acilación es el AIA, en tanto que el aminoácido es ácido aspártico en el primer caso y los aminoácidos fenilalanina, alanina, leucina y los ácidos glutámico y aspártico (Terol et al., 2006). Estos datos sugieren que los seis genes *GH3* podrían estar produciendo las enzimas necesarias para los conjugados de los aminoácidos determinados. Adicionalmente, podría ser que la presencia de múltiples copias para un gen determinado le dé posibilidades de producir isoenzimas con diferentes afinidades para los diferentes aminoácidos.

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSIONES

El estudio de los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante la conversión de una célula creciendo vegetativamente a una célula capaz de convertirse en un embrión es complejo. Involucra el estudio de una amplia gama de compuestos, genes y enzimas, así como su interacción. En nuestro grupo de trabajo estamos abordando de forma sistemática el papel de los RCV durante la inducción de la ES.

En la investigación reportada en esta tesis, por primera vez se analiza el comportamiento de una serie de genes, la familia GH3, que codifica para enzimas que participan de forma muy importante en la homeostasis del AIA, la cual juega un papel central en dicho proceso.

Determinamos que hay una dinámica muy importante en la presencia del AIA libre y sus conjugados con los aminoácidos alanina, isoleucina y ácido glutámico. También cuantificamos los niveles de expresión de los seis genes que codifican para las amido sintetasas que sintetizan los conjugados cuantificados. Existe una importante correlación entre los niveles de expresión de los genes de la familia GH3 y los niveles de conjugados.

Determinamos que hay seis genes en el genoma del cafeto. El nivel de expresión de estos genes y el contenido de conjugados y de AIA libre es marcadamente diferente entre las fases de pre-acondicionamiento y la inducción de la ES. El análisis del transcriptoma, en relación con la expresión de los genes de la familia GH3, nos permitió determinar que tres de ellos se encuentran en más de una copia.

Con los datos generados durante la investigación reportada en esta tesis, y los datos generados en nuestro laboratorio, hemos elaborado un modelo que permite explicar los datos obtenidos. En la figura 3.1 se muestra un modelo construido con los datos de la investigación presentada en esta tesis, así como información generada por nuestro grupo de investigación. Hay una participación clara de los genes de la familia GH3 en el

mantenimiento de la homeostasis de las auxinas durante el pre-tratamiento e inducción de la ES en *C. canephora*. En forma conjunta con las hidrolasas, el transporte y la biosíntesis, controlan los niveles de AIA libre. En el caso de las GH3, participan en la formación de los conjugados, principalmente los de AIA-Ala, AIA-Leu y AIA-Glu.

En nuestro modelo de ES, la adición de RCV exógenos al medio de cultivo durante el pre-tratamiento de las plántulas por 14 días, induce la biosíntesis y el aumento de los niveles endógenos de AIA libre. Es posible que el aumento del AIA endógeno, permita el reconocimiento y la degradación de los represores de auxina, induciendo así la transcripción de genes en respuesta a auxinas como los genes GH3 que actúan como reguladores para la reducción de los niveles de la auxina libre inactivándola. El gran incremento en la expresión del gen GH3.17, casi 60 veces de su expresión inicial, un día después de la inducción de la ES puede provocar la disminución en el contenido de auxina libre observado.

Además de su conjugación, es importante la participación del transporte de las auxinas y de las proteínas que lo hacen posible, la familia de proteínas *PIN* y como la auxina se distribuye a lo largo del proceso embriogénico en los diferentes tipos de células que se van formando. Si se inhibe el transporte de la auxina durante el pre-tratamiento, se inhibe la ES (Márquez-López et al., en preparación).

Otro aspecto que no puede dejar de mencionar es el hecho de que si el pre-tratamiento de las plántulas se lleva a cabo en ausencia de KIN no se produce la ES. Es posible que la KIN y las citocininas endógenas también estén jugando una muy importante función durante la inducción de la ES y estén interactuando con las auxinas y que conjuntamente sean las responsables de generar la señal que modifica el programa genético que cambia el destino de una célula somática y la convierte en un nuevo organismo.

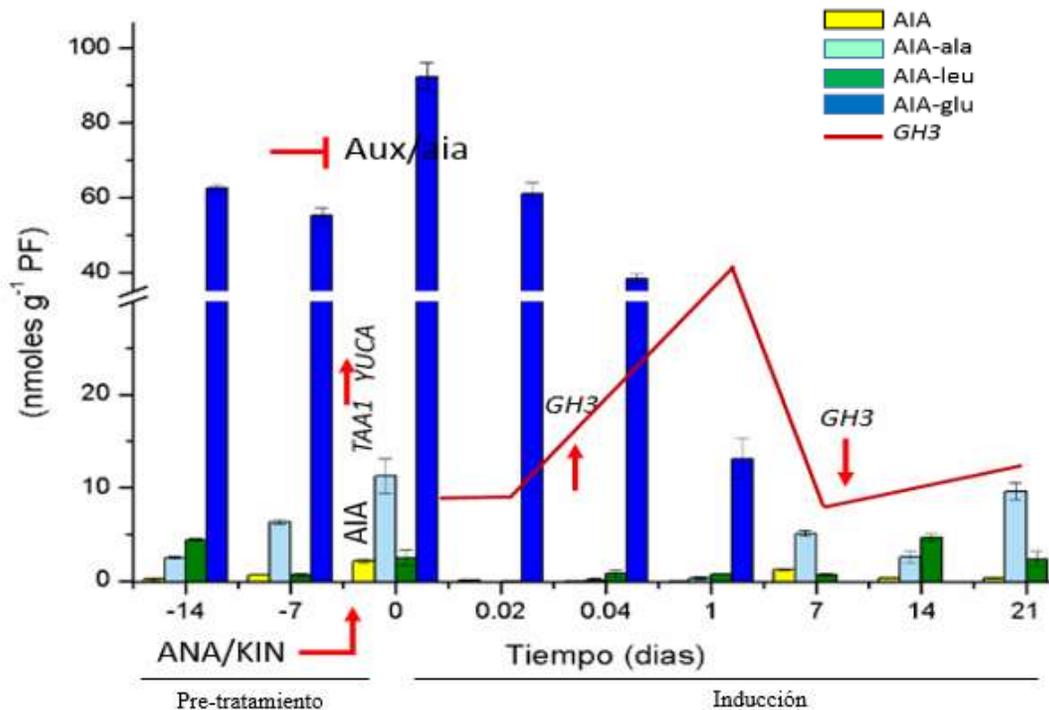


Figura 3. 1 Modelo del comportamiento en la expresión de genes de la familia GH3. Durante la etapa de pre-tratamiento en donde con la adición de un análogo de auxina al medio de cultivo (ANA) actúa como una molécula señal que induce la producción de ácido indol-3-acético endógeno (AIA), durante el aumento del AIA se expresan genes relacionados con la biosíntesis como genes de la familia *YUCA* y *TAA1*. Posteriormente, en respuesta a este nivel endógeno de AIA se promueve la degradación vía proteosoma 26S del represor aux/AIA, en consecuencia resulta la activación de los factores de respuesta a auxina (ARFs), lo que posteriormente incrementa la expresión transcripcional de genes de respuesta a auxina como los miembros de la familia GH3 durante la inducción de la ES los cuales conjugan al AIA con aminoácidos como glutámico llevándolo a su vía oxidativa y posterior degradación la cual provoca una disminución de los genes de biosíntesis a niveles basales por lo cual es activado de nuevo el represor aux/AIA manteniendo a regulada la expresión de los genes de respuesta a auxina.

3.2. PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas más importantes de este proyecto se proponen las siguientes:

- Determinar el perfil del total de conjugados del AIA que están presentes durante el proceso de ES.
- Realizar pruebas histoquímicas para detectar los perfiles de expresión *in vivo* de los *GH3* durante el proceso de ES.
- Realizar la expresión heteróloga de los *CcGH3* de *C. canephora*, para posteriormente purificar la proteína obtenida y realizar su análisis cinético para determinar la especificidad de sustrato de cada una de las enzimas codificadas por la familia de genes GH3.

BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Bajguz, A. y A. Piotrowska (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70, 957-969.
- Barbón, R., E. Jiménez y W. Preil (2008). Influence of *in-vitro* environment on somatic embryogenesis of *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo: the effects of carbon dioxide on embryogenic cell suspensions. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95, 155-161.
- Bartel, B. (1997). Auxin biosynthesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 51-66.
- Bayer, M. (2014). Patterning cues from the altruistic sibling. *Science*, 344, 158-159.
- Bialek, K., W. J. Meudt y J. D. Cohen (1983). Indole-3-acetic acid (IAA) and IAA conjugates applied to bean stem sections. *Plant Physiology*, 73, 130-134.
- Capron, A., S. Chatfield, N. Provart y T. Berleth (2009). Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*, 7, e10126.
- Chen, Q., C. S. Westfall, L. M. Hicks, S. Wang y J. M. Jez (2010). Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 29780-29786.
- Cohen, J. D. y R. S. Bandursky (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 403-430.
- Costa, L. M., E. Marshall, M. Tesfaye, K. A. T. Silverstein, M. Mori, Y. Umetsu, S. L. Otterbach, R. Papareddy, H. G. Dickinson, K. Boutiller, K. A. VandenBosch, S. Ohki y J. F. Gutierrez-Marcos (2014). Central cell-derived peptides regulate early embryo patterning in flowering plants. *Science*, 344, 168-172.
- Davies, P. J. (1995). *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands. 833 p.
- Denoeud, F., L. Carretero-Paulet, A. Dereeper, G. Droc, R. Guyot, M. Pietrella, C. Zheng, A. Alberti, F. Anthony, G. Aprea, J. M. Aury, P. Bento, M. Bernard, S. Bocs, C. Campa, A. Cenci, M. C. Combes, D. Cruzillat, C. Da Silva, L. Daddiego, F. De Bellis, S. Dussert, O. Garsmeur, T. Gayraud, V. Guignon, K. Jahn, V. Jamilloux, T. Joët, K. Labadie, T. Lan, J. Leclercq, M. Lepelley, T. Leroy, L. T. Li, P. Librado, L. Lopez, A. Muñoz, B. Noel, A. Pallavicini, G. Perrotta, V. Poncet, D. Pot, Priyono, M. Rigoreau, M. Rouard, J. Rozas, C. Tranchant-Dubreuil, R. VanBuren, Q. Zhang, A.

BIBLIOGRAFÍA

- C. Andrade, X. Argout, B. Bertrand, A. De Kochko, G. Graziosi, R. J. Henry, Jayarama, R. Ming, C. Nagai, S. Rounsley, D. Sankoff, G. Giuliano, V. A. Albert, P. Wincker y P. Lashermes (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345, 1181-1184.
- Dodeman, V. L., G. Ducreux y M. Kreis (1997). Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 48, 1493-1509.
- 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.
- 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.
- Goldberg, R. B., G. De Paiva y R. Yadegari (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science*, 266, 605-614.
- Hagen, G., A. Kleinschmidt y T. Guilfoyle (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta*, 162, 147-153.
- Hagen, G. y T. J. Guilfoyle (1985). Rapid induction of selective transcription by auxins. *Molecular and Cellular Biology*, 5, 1197-1203.
- Ikeda, M., M. Umehara y H. Kamada (2006). Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23, 153-161.
- Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47, 91-110.
- Jones, R., H. Ougham, H. Thomas y S. Waaland (2013). *The molecular life of plants*, John Wilry & Sons, Malaysia. 742 p.
- Komamine, A., N. Murata y K. Nomura (2005). Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures - morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 41, 6-10.
- Korasick, D. A., T. A. Enders y L. C. Strader (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2541-2555.
- Kurczynska, E., M. Gaj, A. Ujczak y E. Mazur (2007). Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, 226, 619-628.
- 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.

-
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Ljung, K., A. K. Hull, M. Kowalczyk, A. Marchant, J. Celenza, J. D. Cohen y G. Sandberg (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 50, 309-332.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943-950.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (2012). An introduction to plant cell culture: the future ahead, en: *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 877, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Humana Press. Heidelberg. pp. 1-8.
- Mano, Y. y K. Nemoto (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2853-2872.
- Michalczyk, L., T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis. *Phytochemistry*, 31, 1097-1103.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- 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.
- Nowak, K., B. Wojcikowska, K. Szyrajew y M. D. Gaj (2012). Evaluation of different embryogenic systems for production of true somatic embryos in *Arabidopsis*. *Biologia Plantarum*, 56, 401-408.
- Okrent, R. y M. Wildermuth (2011). Evolutionary history of the GH3 family of acyl adenylases in rosids. *Plant Molecular Biology*, 76, 489-505.
- Okrent, R. A., M. D. Brooks y M. C. Wildermuth (2009). *Arabidopsis* GH3.12 (PBS3) conjugates amino acids to 4-substituted benzoates and is inhibited by salicylate. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 9742-9754.
- 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.
- Pollmann, S., D. Neu y E. W. Weiler (2003). Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry*, 62, 293-300.

BIBLIOGRAFÍA

- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006a). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas, (2006b). 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.
- 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.
- 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.
- Staswick, P. E. y I. Tiryaki (2004). The oxylipin signal jasmonic acid is activated by an enzyme that conjugates it to isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 16, 2117-2127.
- Staswick, P. E., B. Serban, M. Rowe, I. Tiryaki, M. T. Maldonado, M. C. Maldonado y W. Suza (2005). Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, 17, 616-627.
- 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.
- Tam, Y. Y., E. Epstein y J. Normanly (2000). Characterization of auxin conjugates in Arabidopsis. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology*, 123, 589-596.
- Terol, J., C. Domingo y M. Talón (2006). The GH3 family in plants: Genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis. *Gene*, 371, 279-290.
- Tisserat, B., (1985). Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration, en: *Plant Cell Culture. A Practical Approach*, Dixon, R. A., (ed). IRL Press. Oxford. pp. 79-105.
- Tromas, A. y C. Perrot-Rechenmann (2010). Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies*, 333, 297-306.
- Wang, H., C. e. Tian, J. Duan y K. Wu (2008). Research progresses on GH3s, one family of primary auxin-responsive genes. *Plant Growth Regulation*, 56, 225-232.

- Westfall, C. S., J. Herrmann, Q. Chen, S. Wang y J. M. Jez (2010). Modulating plant hormones by enzyme action. The GH3 family of acyl acid amido synthetases. *Plant Signaling & Behavior*, 5, 1607-1612.
- Westfall, C. S., C. Zubieta, J. Herrmann, U. Kapp, M. H. Nanao y J. M. Jez (2012). Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins. *Science*, 336, 1708-1711.
- Wójcikowska, B. y M. D. Gaj, (2016). Somatic embryogenesis in Arabidopsis, en: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Cham. pp. 185-199.
- Woodward, A. W. y B. Bartel (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95, 707-735.
- 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.
- Yang, X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29, 36-57.
- 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.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, 5, 1411-1423.