



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis de la biosíntesis del ácido-3-indolacético
en la embriogénesis somática de *Coffea canephora***

Tesis que presenta

Cleyre Ariana Pérez 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 Cleyre Ariana Pérez Hernández titulado Análisis de la biosíntesis del ácido-3-indolacético en la embriogénesis somática de *Coffea canephora* fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Morfogénesis y Regulación Génica, Laboratorio 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, a 21 de Septiembre del 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Cleyre Ariana Pérez 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

Agradezco a mi asesor de tesis el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas por haberme aceptado en su laboratorio y formar parte de su grupo y por su tiempo y dedicación.

De la misma manera agradezco a la M. C. Rosa María Galaz Ávalos por su apoyo técnico durante el desarrollo de este proyecto.

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, el Dr. Neftalí Ochoa Alejo y el Dr. Enrique Castaño de la Serna, cuyas observaciones, consejos y revisiones hicieron posible la conclusión de este trabajo.

A los revisores de la tesis, que incluye al comité tutorial.

Al M.C. José Ermenegildo Cetz Chel y al Dr. Geovanny Nic Can por sus comentarios y consejos referentes al transcriptoma.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), al Posgrado en Ciencias, a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas (UBBMP), por las instalaciones y el apoyo para la realización de este trabajo y de la tesis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca (No. 337945) otorgada para los estudios de Maestría.

Al grupo de laboratorio 24 de la UBBMP: Rosita, Ruth, Hugo, Johny, Osvaldo, Erika, José Cetz, por su apoyo, comentarios, amistad, y compañerismo durante mi estancia en la maestría.

A mis padres y hermanos por su comprensión.

DEDICATORIAS

Les dedico este trabajo a Dios y a mi familia, a mis padres Bruno y Norma, a quienes solamente admiro y que me han sabido formar con buenos sentimientos y valores, a ustedes que me dieron la vida. Sin su apoyo, comprensión, educación y ejemplo no habría sido posible continuar, fueron y continúan siendo los que me motivan a seguir en donde estoy que desde niña me alentaron para ser quien soy, con su sacrificio me dieron estudio aun cuando continuaban en ese camino. A ustedes mis héroes les dedico y les debo este logro más en la vida.

A mis hermanitos Bruno y Mireyly, aunque son los más insoportables hicieron soportable cada día lejos del hogar.

A mi novio y mejor amigo Bartolomé por su paciencia, quien me apoyó y alentó para continuar a distancia soplando parte de la niebla que en ocasiones me cubría.

También a mis abuelos, quienes antes de cada retorno a esta ciudad me dieron su bendición.

A mis amigos que hice aquí en esta calurosa y temperamental ciudad, Ruth, Rosita, Hugo, Johny, Osvaldo, José y a la Dra. Erika quienes con su convivencia y compañerismo hicieron más divertida mi estancia.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	3
1.2 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL	4
1.3 AUXINAS.....	5
1.4 BIOSÍNTESIS DE LAS AUXINAS.....	8
1.5 LA RESPUESTA DE ELONGACIÓN DEL HIPOCOTILO PRODUCIDA POR LA ABUNDANCIA DE SOMBRA REQUIERE A <i>TAA1</i>	12
1.6 PARTICIPACIÓN DE <i>YUCCA</i> EN LA CONVERSIÓN DE AIP A AIA.....	13
1.7 DESCUBRIMIENTO DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE AIA INDEPENDIENTE DE TRP. ...	15
1.8 CONTENIDO ENDÓGENO DE AUXINAS ANTES Y DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA ES DE <i>COFFEA CANEPHORA</i>	22
1.9 EXPRESIÓN DE <i>TAA1</i> , <i>YUC1</i> , <i>YUC3</i> DURANTE EL PRE-ACONDICIONAMIENTO Y LA INDUCCIÓN DE LA ES	23
1.10 JUSTIFICACIÓN	25
1.11 HIPÓTESIS	25
1.12 OBJETIVO GENERAL.....	25
1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
1.14 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26

CAPÍTULO II.....	29
INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO-3-INDOLACÉTICO EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>COFFEA CANEPHORA</i>	29
2.1 INTRODUCCIÓN.....	29
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS	30
2.2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	30
2.2.2 Inducción de la embriogénesis somática	30
2.2.3 Extracción de auxinas y sus conjugados	30
2.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	31
2.2.5 Preparación de las plántulas en presencia de ¹⁴ C ₃ -Trp	31
2.3 RESULTADOS	32
2.4 DISCUSIÓN.....	47
CAPÍTULO III.....	51
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	51
3.1 CONCLUSIONES.....	51
3.2 PERSPECTIVAS	52

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Diagrama sobre la embriogénesis somática.....	4
Figura 1.2 Reguladores de crecimiento vegetal que regulan todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas.	5
Figura 1.3 Factores que regulan los niveles de auxinas en las plantas	6
Figura 1.4 Auxinas naturales (A) y sus análogos sintéticos (B)	7
Figura 1.5 Rutas descritas para el metabolismo de las auxinas	10
Figura 1.6 Las mutantes <i>SAV3</i> son defectuosas en la biosíntesis de auxina	13
Figura 1.7 Regulación de la embriogénesis de <i>Arabidopsis</i> por los genes <i>YUC</i>	14
Figura 1.8 Nivel de AIP en plantas de <i>A. thaliana</i>	15
Figura 1.9 Cantidades totales de AIA y Trp libre en plántulas de <i>Zea mays</i>	16
Figura 1.10 INS es un componente clave en la ruta biosintética del AIA independiente de Trp.....	16
Figura 1.11 Efecto de diferentes inhibidores sobre los niveles endógenos de AIA en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
Figura 1.12 Inhibición de la biosíntesis de AIA usando Kyn en plántulas de <i>A. thaliana</i> ..	20
Figura 1.13 La Kyn inhibe la formación de pelo radicular inducida por etileno así como la expresión de EBS:GUS en las raíces	20
Figura 1.14 Productos químicos que afectan la biosíntesis de AIA en coleoptilos de maíz	21

Figura 1.15 El co-tratamiento de los inhibidores yucasina, Kyn y auxinol produce efectos severos relacionados con las auxinas durante el desarrollo de la planta	22
Figura 1.16 Contenido endógeno de auxinas antes y durante la inducción de la ES de <i>Coffea canephora</i>	23
Figura 1.17 Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes <i>CcYUC1</i> (barras vacías), <i>CcYUC1</i> (barras azules), y <i>CcYUC3</i> (barras verdes).....	24
Figura 1.18 Estrategia experimental.....	26
Figura 2.1 Análisis de AIA mediante TLC del extracto de las hojas de las plántulas de <i>Coffea canephora</i> durante el pre-acondicionamiento.	33
Figura 2.2 Inducción de la ES de <i>C. canephora</i> en presencia del inhibidor Kyn.....	37
Figura 2.3 TLC del extracto de hojas de plántulas de <i>C. canephora</i> en pre-acondicionamiento en presencia de ¹⁴ C ₃ -Trp y el inhibidor Kyn.	39
Figura 2.4 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en <i>C. canephora</i>	41
Figura 2.5 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en <i>C. canephora</i> en presencia de DMSO..	42
Figura 2.6 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en <i>C. canephora</i> en presencia de 0.1 μM Kyn.....	43
Figura 2.7 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en <i>C. canephora</i> en presencia de 1 μM Kyn.....	44
Figura 2.8 Metabolismo del triptofano en <i>C. canephora</i>	45
Figura 2.9 Expresión de genes implicados en la biosíntesis de auxina..	47

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Conversión del triptofano a auxina en hojas de espinaca 8

Cuadro 1.2 Genes que participan en las cuatro rutas de biosíntesis del AIA dependientes de triptofano..... 11

Cuadro 2.1 Radiactividad total presente en cada muestra de plántulas de *C. canephora* analizada34

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ACC	Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico
ABA	Ácido abscísico
AIA	Ácido indol-3-acético
AIP	Ácido indol-3-pirúvico
ANA	Ácido naftalén acético
AVG	Aminoetoxivinilglicina
BA	Benciladenina
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
DMSO	Dimetil sulfóxido
ES	Embriogénesis somática
YUC / YUCCA	Flavina monooxigenasa
IAOx	Indol-3-acetaldoxima
AIAd	Indol-3-acetaldehído
IAN	Indol-3-acetonitrilo
IGP	Indol-3-glicerol fosfato
IAM	Indolacetamida
INS	Indol sintasa
KIN	Kinetina
Kyn	L-quinurenina
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
TAM	Triptamina

TAA1	Triptofano aminotransferasa de Arabidopsis 1
TRAs	Triptofano aminotransferasas relacionadas
Trp	Triptofano
Yucasina	5-(4-clorofenil)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) permite la regeneración de plantas *in vitro*. En la gran mayoría de los casos es necesaria la presencia de una auxina exógena en el medio de cultivo, antes o durante la inducción de la ES. Nuestro grupo ha determinado que la presencia de una auxina en forma exógena durante el pre-tratamiento de las plantas que darán origen a los explantes aumenta la concentración de la auxina endógena. También hemos determinado que hay un aumento en la expresión de algunos de los genes involucrados en su biosíntesis, sugiriendo que el aumento observado en la concentración de auxina proviene de la síntesis *de novo*. Asimismo hay un aumento notable en la acumulación de conjugados del ácido-3-indólico (AIA) con los aminoácidos, ácido glutámico y ácido aspártico. Con base en los antecedentes mencionados, en este proyecto determinamos que el aumento en la concentración del AIA proviene de la síntesis *de novo*. Para ello se utilizaron tres estrategias experimentales. En la primera de ellas se usó un inhibidor de la triptofano aminotransferasa, la L-quinurenina. Este inhibidor disminuye notablemente la cantidad endógena de AIA, así como el proceso embriogénico. En la segunda se usó triptofano marcado radiactivamente y se determinó que el AIA producido lleva la marca radiactiva. En la tercera se realizó el análisis del transcriptoma que nuestro grupo generó recientemente y se determinó que existe una importante expresión de los genes que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis del AIA.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) leads to plant regeneration during the *in vitro* process. In most cases, the presence of an exogenous auxin in the culture medium is necessary, before, during or after the induction of SE. In our lab it has been determined that the presence of an exogenous auxin during the pre-treatment of the plants, used as a source of the explants for the induction of the SE, produces an increase in the endogenous auxin. At the same time, there is also expression of some genes involved in the indole-3-acetic acid (IAA) biosynthesis suggesting that this expression is due to *de novo* biosynthesis. Moreover, there is a marked increase in the accumulation of the conjugated IAA with glutamic and aspartic acids. Based on the above background, in this project, I found that the increased concentration of IAA comes from *de novo* synthesis. This fact has three approaches. The first one is that the inhibitor of the tryptophan aminotransferase, the L-kynurenine, decreases significantly the endogenous amount of IAA, as well the embryogenic process. The second approach involved the use of radioactively-labeled tryptophan, and we found that the synthesized IAA has the incorporated radioactive label. The third approach was transcriptome analysis that our group recently conducted and it was determined that there is an important expression of genes encoding enzymes involved in the biosynthesis of IAA.

INTRODUCCIÓN

El café que se consume en el mundo proviene de dos especies, *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. En términos generales, *C. arabica* es muy susceptible a enfermedades en comparación con *C. canephora*; sin embargo, produce un café de mucha mejor calidad y contiene menos cafeína. Por lo anterior, se buscan alternativas para mejorar genéticamente a ambas especies. En el caso de *C. arabica* es importante que sea más resistente a las plagas y enfermedades, en tanto que el caso de *C. canephora* es deseable que produzca menos cafeína y un café de mejor calidad. Dado que se trata de una planta perenne, una de las alternativas para poder llevar a cabo dicho mejoramiento pasa por las técnicas de selección *in vitro* y de reproducción vegetativa.

En el cafeto hay dos vías de multiplicación, vegetativa y por semilla. En el caso de la reproducción vegetativa, ésta puede ser por propagación o por embriogénesis somática (ES). El primer caso de ES en el género *Coffea* fue reportado por Staritsky (1970) a partir de explantes de ramas ortotrópicas jóvenes de *C. canephora*. Desde entonces se han desarrollado investigaciones sobre la ES en el género *Coffea* por diversos grupos de investigación alrededor del mundo (Santana-Buzzy et al., 2007; Santana-Buzzy et al., 2004; Dublin, 1991).

El éxito de la propagación mediante ES depende del manejo adecuado de los medios de cultivo, especialmente los reguladores del crecimiento vegetal (RCV), considerados como los mensajeros químicos responsables de la formación y el crecimiento de los diferentes órganos vegetales (Taiz y Zeiger, 1991). De entre los once RCV conocidos, las auxinas juegan un papel central en el proceso de la ES.

La auxina es una pequeña molécula que influye en casi todos los aspectos de la vida de una planta. La respuesta a auxina es modulada en múltiples niveles, incluyendo su biosíntesis, conjugación, transporte y la interacción con otros RCV. Los mecanismos moleculares que impulsan estos procesos se han empezado a dilucidar en las últimas décadas (Oliva et al., 2013; Saini et al., 2013; Santner et al., 2009). Uno de ellos es su participación en la embriogénesis cigótica (Petrásek y Friml, 2009). En el grupo de trabajo del Dr. Loyola-Vargas se ha obtenido evidencia que sugiere que la biosíntesis del AIA es

INTRODUCCIÓN

esencial para que se lleve a cabo la inducción de la ES (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Por lo que en este trabajo se propuso determinar si el aumento en la concentración del AIA se debe a su biosíntesis *de novo* durante la inducción de la ES. Para ello se utilizó una estrategia farmacológica, así como el uso de sustratos marcados.

Existen compuestos que inhiben a algunas de las enzimas involucradas en la biosíntesis del AIA a partir de triptofano, entre los cuales se encuentra la L-quinurenina (Kyn), el cual es un inhibidor competitivo de la triptofano aminotransferasa (TAA1), una enzima clave en la ruta de biosíntesis del AIA a través del ácido-3-indol pirúvico (AIP), con una K_i de 11.52 μM (He et al., 2011).

Otro inhibidor es la 5-(4-clorofenil)-4H-1,2,4-triazol-3-tiol (yucasina). Este compuesto inhibe la biosíntesis del AIA en los meristemos de coleoptilos de maíz (Nishimura et al., 2014). La yucasina inhibe competitivamente, *in vitro*, la decarboxilación oxidativa del AIP catalizada por la YUC flavina monooxigenasa (YUCCA). Combinadas, la Kyn y la yucasina, inhiben sinérgicamente la biosíntesis de auxina y el crecimiento de las plantas (Nishimura et al., 2014).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La ES es el proceso por el cual las células somáticas son inducidas a generar células embriogénicas, las cuales pasan por una serie de cambios celulares, bioquímicos, moleculares y morfológicos que resultan en la formación de un embrión. Este proceso fue descubierto en los años 50s y se ha visto como una promisorio herramienta para la propagación masiva de la generación F1 de híbridos de cultivares de interés económico y como un modelo para el estudio de la diferenciación celular.

Para su estudio la ES ha sido abordada desde diferentes campos como los fisiológico, celular, bioquímico y molecular; sin embargo, aún se está lejos de describir y entender en su totalidad dicho proceso. La mayor parte de la información disponible ha sido obtenida en cultivos celulares de zanahoria (*Daucus carota*) (Steward et al., 1975) y alfalfa (*Medicago sativa*) (Stuart y Strickland, 1984). No obstante, en diversos casos las conclusiones obtenidas a partir de una especie no pueden ser extrapoladas a otra, por lo que es necesario desarrollar sistemas embriogénicos eficientes en la producción de embriones somáticos que sirvan como sistemas modelos para realizar estudios tanto a nivel básico como biotecnológico (Fig. 1.1).

Entre los diversos factores que afectan los procesos de la ES se tiene la fuente del explante, el medio de cultivo, los RCV empleados, las condiciones ambientales en las cuales se cultivan los explantes. La fuente de nitrógeno del medio de cultivo es un factor que modifica de manera importante la respuesta embriogénica de los explantes (Fuentes-Cerda et al., 2001).

El primero en iniciar estudios sobre la ES fue Harry Warris en 1957, utilizando *Oenanthe aquatica* como modelo de estudio. En *C. canephora* Staritsky (Staritsky, 1970) fue el primero en reportar el desarrollo de embriones somáticos. Söndahl y Sharp (Söndahl y Sharp, 1977) describieron un procedimiento para obtener un callo embriogénico de alta

frecuencia a partir de explantes foliares de *C. arabica*. Después de los trabajos iniciales de inducción de la ES en café, se ha publicado una gran cantidad de investigaciones sobre la ES de esta especie (Bieysse et al., 1993; Neuenschwander y Baumann, 1992; Hatanaka et al., 1991; Yasuda et al., 1985; Pierson et al., 1983; Dublin, 1981).

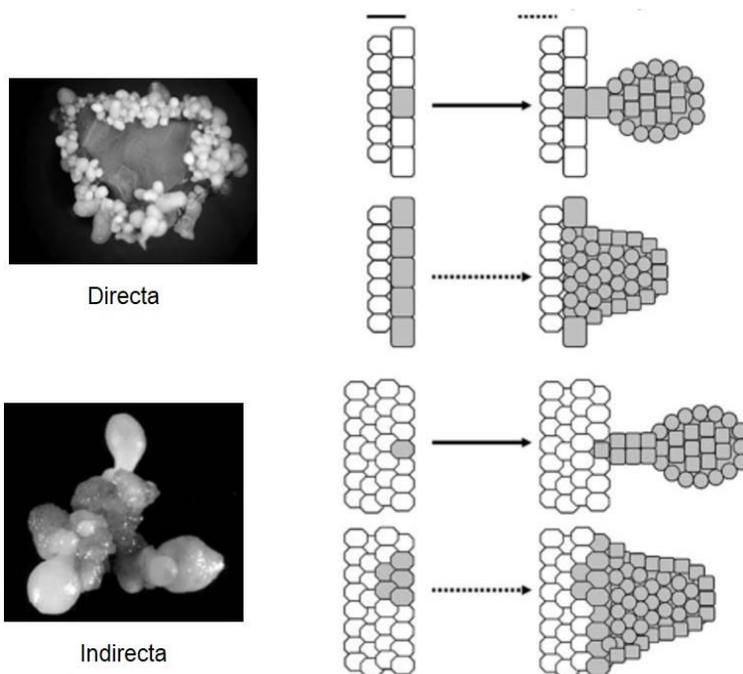


Figura 1.1 Diagrama sobre la embriogénesis somática (Möller y Weijers, 2009; Quiroz-Figueroa et al., 2006b).

1.2 REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

El desarrollo natural de una planta depende en gran parte de la interacción de factores externos (luz, nutrientes, agua, temperatura, etc.) con factores internos (RCV, etc.). Los RCV son sustancias sintetizadas en un determinado lugar de la planta y que se transportan a otro en donde actúan a muy bajas concentraciones, regulando el crecimiento, desarrollo, reproducción y otras funciones de las plantas. Existen once grupos de RCV (Jones et al., 2013). Estos son, auxinas, citocininas, giberelinas, brasionoesteroides, salicilatos, jasmonatos, poliaminas, estrigolactonas, etileno, ácido abscísico y óxido nítrico (Fig. 1.2).

A cada grupo se le ha asignado un efecto dominante, pero es común encontrar que existen efectos entre ellos y en la respuesta fisiológica asociada a cada etapa de desarrollo (vegetativa y/o reproductiva). En el momento de optar por la propagación vegetativa la regulación por RCV dependerá de cada especie (genotipo), del ambiente (estímulos físicos) y la respuesta se verá afectada por la concentración y proporción de cada uno de estos compuestos (Rojas, 1972).

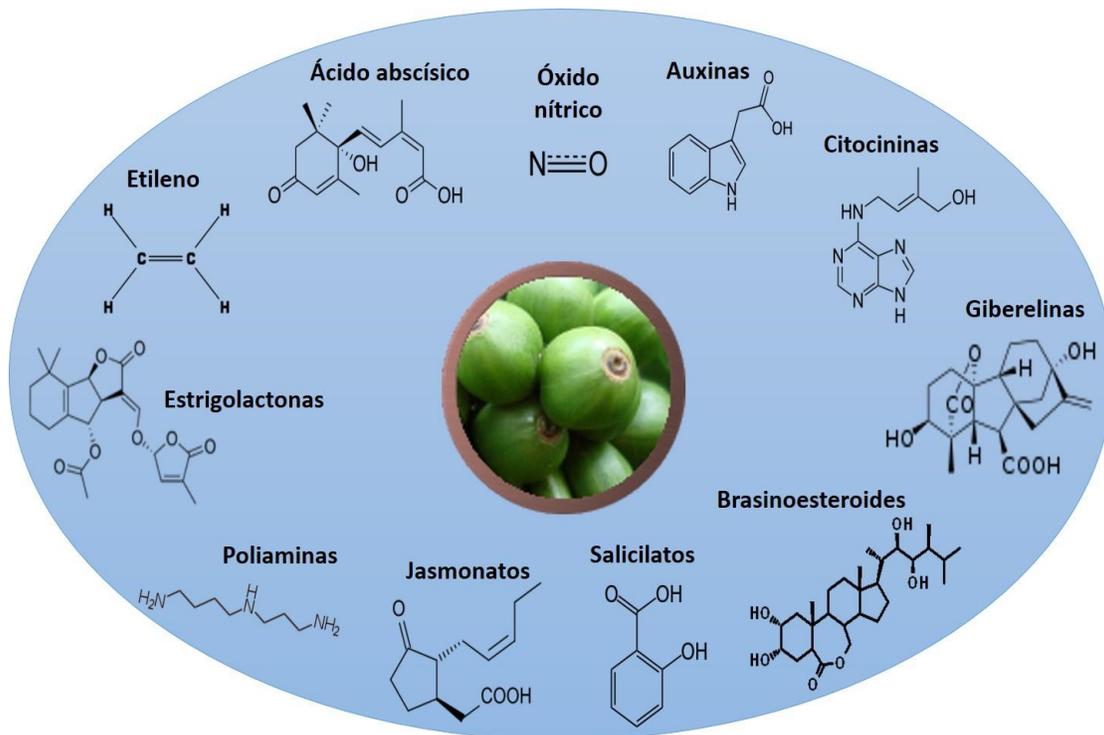


Figura 1.2 Reguladores de crecimiento vegetal que regulan todos los aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas (Santner et al., 2009).

1.3 AUXINAS

Las auxinas fueron los primeros reguladores del crecimiento descubiertos. Desde la antigüedad, los naturalistas notaron que las plantas tienen capacidad de moverse en respuesta a la luz. Las auxinas participan en una gran cantidad de procesos fisiológicos.

Para regular los niveles de auxina en la planta, su respuesta está modulada por su

biosíntesis, degradación, conjugación, transporte e interacción con otros RCV (Fig. 1.3).

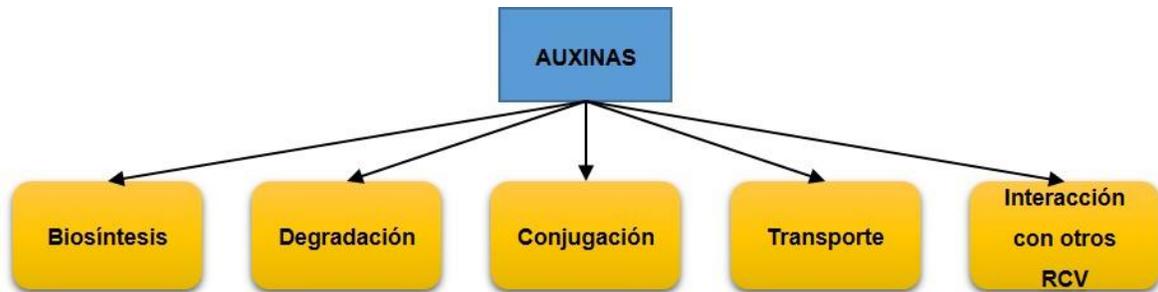


Figura 1.3 Factores que regulan los niveles de auxinas en las plantas.

Desde que se descubrió la primera auxina, se han identificado otros compuestos con actividad análoga a la del AIA a partir de tejidos vegetales e incluso se han sintetizado en el laboratorio. Todos ellos se agrupan bajo el nombre genérico de auxinas (Fig. 1.4).

Las auxinas se sintetizan, principalmente, en los meristemos apicales de las plantas y circulan dentro de la planta en una sola dirección, desde el ápice del tallo a la raíz o desde el ápice de la raíz hacia la base de la planta (Curtis, 1985).

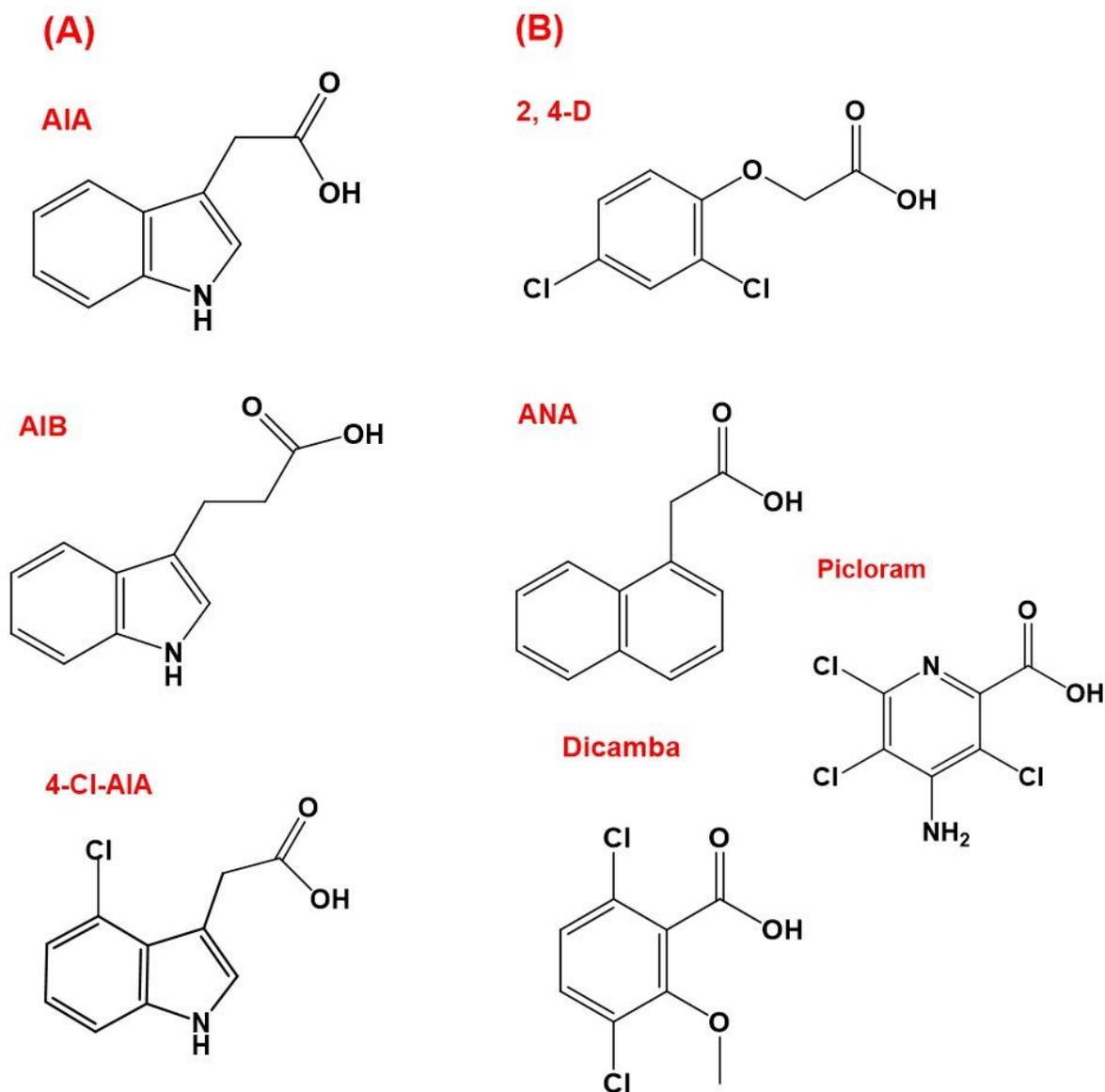


Figura 1.4 Auxinas naturales (A) y sus análogos sintéticos (B). AIA = ácido-3-indol acético; AIB = ácido-3-indol butírico; 4-Cl-AIA = ácido 4-cloroindol acético; AFA = ácido fenilacético; 2, 4-D = ácido 2,4-diclorofenoxi acético; ANA = ácido 1-naftalén acético; dicamba = ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico; picloram = ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

1.4 BIOSÍNTESIS DE LAS AUXINAS

Aunque el AIA fue el primer RCV identificado, su ruta biosintética no está del todo clara. Se ha postulado que existen diversas rutas de biosíntesis del AIA. Cuatro de ellas son dependientes de triptofano (Trp), y la otra es independiente de Trp e inicia con el indol-3-glicerol fosfato (IGP) (Wang et al., 2015).

La primera evidencia reportada de la participación del Trp como precursor de la biosíntesis de AIA fue en un estudio realizado en hojas de espinaca en las que se produjo auxina en presencia de Trp. Este experimento se llevó a cabo en discos foliares, los cuales se cortaron a la mitad. Una de las mitades se colocó en 10 ml de amortiguador de fosfato y la otra mitad se colocó en el mismo volumen de amortiguador y se le añadieron 10 mg de Trp. Las hojas que fueron infiltradas con Trp contenían 10 veces más auxina que los explantes testigo que no fueron expuestos a la presencia de Trp. Este resultado sugiere que las hojas de espinaca contienen un mecanismo para producir auxina en presencia de este aminoácido (Cuadro 1.1) (Wildman et al., 1947).

Cuadro 1.1 Conversión del triptofano a auxina en hojas de espinaca (Wildman et al., 1947). El experimento fue desarrollado en 10 ml de 0.1 M de amortiguador $\text{KH}_2\text{-HPO}_4$, pH 7.0; a una temperatura de 22 °C. Las hojas se infiltraron mediante vacío por 20 minutos y se realizó la incubación en aire.

Medio de infiltración	Tiempo en h	Peso seco de hojas en mg	Curvatura en °C	Agar en ml	AIA x 10 ⁻⁶ mg / 100 mg hojas secas
Amortiguador	3.5	95	6.6±0.5	0.80	2.5
Amortiguador + 10 mg. triptófano	3.5	89	13.6±1.4	3.20	27.5
Amortiguador	5	64	3.5±0.4	0.80	3.7
Amortiguador + 2.5 mg. triptófano	5	63	9.0±1.1	6.40	39.4

Se han postulado cinco vías de biosíntesis para el AIA (Fig. 1.5). En la primera vía el Trp es convertido en indolacetamida (IAM) mediante la Trp monooxigenasa y la IAM es convertida en AIA mediante la IAM hidrolasa. En una segunda vía el Trp es convertido en indol-3-acetaldoxima (IAOx) por cualquiera de dos citocromo P450 monooxigenasa (CYP79B2/CYP79B3); la IAOx es convertida en indol-3-acetonitrilo (IAN) y transformado en AIA por una nitrilasa. En la tercera vía, la que hasta ahora parece ser la más abundante y común en las plantas terrestres, el Trp es convertido en ácido indol-3-pirúvico (AIP) por una aminotransferasa, para a continuación ser convertido en AIA por una enzima de la familia YUCCA (YUC). En la cuarta vía el Trp es convertido en triptamina (TAM) por medio de una Trp descarboxilasa. A continuación la TAM es transformada en indol-3-acetaldeido (AIAd) y finalmente convertido en AIA por una deshidrogenasa (Sugawara et al., 2009; Woodward y Bartel, 2005).

También se ha descrito una vía independiente del triptofano. Utilizando precursores marcados (Prinsen et al., 1994) se determinó que la conversión del AIA (en ausencia de Trp) en diferentes cepas de *Azospirillum brasilense* seguía una distribución del 0.1, 10 y 90 % para las vías de IAM, AIP y la independiente del Trp respectivamente. Uno de los precursores de esta vía es el indol, si bien poco se conoce sobre esta vía y los genes involucrados en ella.

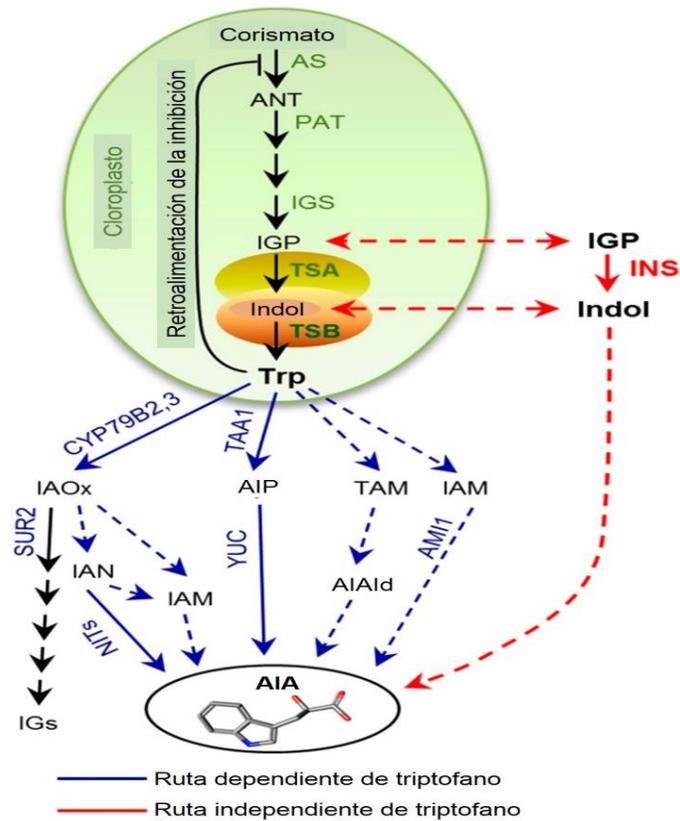


Figura 1.5 Rutas descritas para el metabolismo de las auxinas. Redibujado de Wang et al. (Wang et al., 2015). Las flechas sólidas se refieren a rutas con enzimas identificadas y las flechas punteadas se refieren a rutas sin identificar. ANT, antranilato; AS, antranilato sintasa; CHA, ácido corísmico; IAAlid, indol-3-acetaldehido; IAM, indol-3-acetamida; IAN, indol-3-acetonitrilo; IAOx, indol-3-acetaldoxima; IGP, indol-3-glicerol fosfato; IGS, indol glucosinolatos; IGS, indol-3-glicerol fosfato sintasa; IPyA, ácido indol-3-pirúvico; PAT, fosforibosilantranilato transferasa; TAA1, triptofano aminotransferasa de Arabidopsis1; TAM, triptamina; TSA, triptofano sintasa α ; TSB, triptofano sintasa β ; YUC, YUCCA.

Utilizando enfoques tanto moleculares como genéticos se han podido identificar parte de los genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis del AIA (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2 Genes que participan en las cuatro rutas de biosíntesis del AIA dependientes de triptofano (Mano y Nemoto, 2012; véase Figura 1.5).

RUTA (GEN)	ORTÓLOGO	PRODUCTO DEL GEN (LOCALIZACIÓN)		ESPECIE	REFERENCIA
1. Ruta IAM					
AMI1	AtAMI1	Hidrolasa	indol-3-acetamida	<i>A. thaliana</i>	(Neu et al., 2007; Pollmann et al., 2003)
	NtAMI1	(citoplasma)		<i>Nicotiana tabacum</i>	
		Hidrolasa	indol-3-acetamida		(Mano et al., 2010; Nemoto et al., 2009)
		(citoplasma)			
2. Ruta IPA					
TAA1	TAA1	Triptofano	aminotransferasa	<i>A. thaliana</i>	(Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008)
	TIR2	(citoplasma)		<i>A. thaliana</i>	
	TAR1	Triptofano aminotransferasa		<i>A. thaliana</i>	(Yamada et al., 2009)
AAO1		Triptofano aminotransferasa			(Stepanova et al., 2008)
	ZmA0-1			<i>Zea mays</i>	
	AtAO-1	Aldehído oxidasa (citoplasma)		<i>A. thaliana</i>	(Sekimoto et al., 1997)
YUC		Aldehído oxidasa (citoplasma)			(Sekimoto et al., 1998)
	AtYUC1,2,4,6	Flavin monooxigenasa		<i>A. thaliana</i>	(Mashiguchi et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Won et al., 2011)
				<i>Catharanthus roseus</i>	
3. Ruta TAM					
TDC	TDC	Triptofano	descarboxilasa	<i>Camptotheca</i>	(De Luca et al., 1989)
	TDC	(citoplasma)		<i>acuminata</i>	(López-Meyer y Nessler, 1997)
	OpTDC	Triptofano descarboxilasa		<i>Ophiorrhiza pumila</i>	(Yamazaki et al., 2003)
	TDC	Triptofano descarboxilasa		<i>Oriza sativa</i>	(Kang et al., 2007; Ueno et al., 2003)
	TDC	Triptofano descarboxilasa		<i>O. sativa</i>	
		Triptofano descarboxilasa			
YUC	AtYUC1			<i>A. thaliana</i>	(Zhao et al., 2001)
(YUCCA)	FZC	Flavin monooxigenasa		<i>Petunia hybrida</i>	(Tobeña-Santamaria et al., 2002)
	OsYUC1	Flavin monooxigenasa		<i>O. sativa</i>	(Yamamoto et al., 2007)
	Spi1	Flavin monooxigenasa		<i>Z. mays</i>	(Gallavotti et al., 2008)
	SIFZY	YUCCA-Flavin monooxigenasa		<i>Solanum</i>	(Tivendale et al., 2010)
	ToFZY	No conversión de TAM a N-hidroxiTAM		<i>lycopersicum</i>	(Expósito-Rodríguez et al., 2011)
	PsYUC	Flavin monooxigenasa		<i>S. lycopersicum</i>	(Tivendale et al., 2010)
		Flavin monooxigenasa		<i>Pisum sativum</i>	
		No conversión de TAM a N-hidroxiTAM			
4. Ruta AOX1					
CYP79B2/B3	CYP79B2/B3	Monooxigenasa 450 específica a triptofano		<i>A. thaliana</i>	(Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000)
NIT1/2	AtNIT1,2	(cloroplasto)		<i>A. thaliana</i>	
	Zmnit1,2	Nitrilasa (membrana)		<i>Z. mays</i>	(Bartel y Fink, 1994; Bartling et al., 1992)
		Nitrilasa			(Park et al., 2003)

1.5 LA RESPUESTA DE ELONGACIÓN DEL HIPOCOTILO PRODUCIDA POR LA ABUNDANCIA DE SOMBRA REQUIERE A TAA1.

Hasta ahora se ha dilucidado una vía dependiente de Trp completa en plantas de *Arabidopsis thaliana*. En esta vía, la auxina es sintetizada a través de dos pasos. El primero consiste en la eliminación del grupo amino por la *TAA1* para producir AIP. El segundo paso es la descarboxilación oxidativa del AIP por enzimas de la familia *YUC* para generar AIA (Zhao, 2014).

Para esto Tao et al. (Tao et al., 2008) aislaron una serie de mutantes que no podían alargarse cuando eran expuestas a luz roja/roja lejana (R/FR) y mostraron que la inactivación del gen *SAV3* es responsable del fenotipo mutante. Este estudio fue para tratar de entender por qué las plantas tienden a alargarse para evitar la sombra. Un ejemplo de esto es el síndrome de evitación a la sombra, el cual se desencadena por reducción en la cantidad de luz. En este trabajo se determinó que las condiciones que simulan a la sombra indujeron rápidamente la biosíntesis del AIA y la cantidad de AIA libre en las plántulas silvestres. Por el contrario, en las plántulas *-Taa1* se determinó una menor cantidad de AIA en la luz blanca y fueron incapaces de adaptarse a la sombra y responder como las plantas silvestres, esto se debe a que estas mutantes carecen de *TAA1*, lo que indica que esta enzima es requerida para el aumento del AIA (Fig. 1.6B). En relación con el fenotipo, un ambiente enriquecido con luz roja lejana (la cual simula la sombra producida por otras plantas), promueve la elongación de los hipocotilos, pero no en las mutantes bloqueadas en su síntesis de auxinas (Fig. 1.6A)

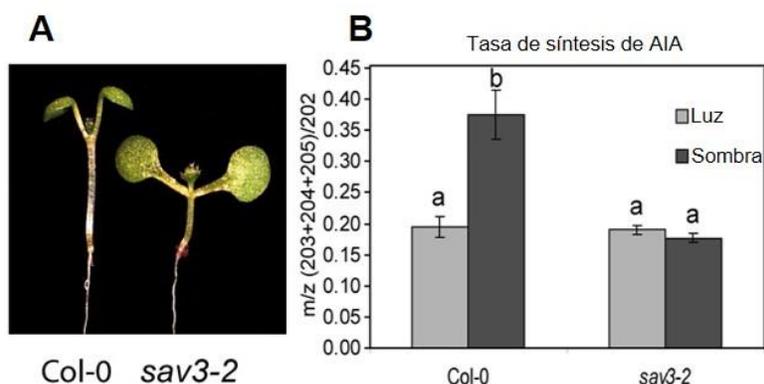


Figura 1.6 Las mutantes *SAV3* son defectuosas en la biosíntesis de auxina. (A) Caracterización fenotípica de Col-0 y *sav3*. (B) Biosíntesis de AIA en condiciones de luz y sombra (Tao et al., 2008).

1.6 PARTICIPACIÓN DE *YUCCA* EN LA CONVERSIÓN DE AIP A AIA.

La auxina sintetizada por las flavin monooxigenasas *YUC* es una fuente de auxina esencial para la embriogénesis en *A. thaliana* y la formación de órganos postembrionarios (Cheng et al., 2007). El análisis de la expresión de *YUC1* y *YUC4* mostró que ambos genes se expresan similarmente a lo largo de la embriogénesis en *A. thaliana* y son redundantes en la formación de la flor y el desarrollo vascular. Por otro lado, la expresión de *YUC10* y *YUC11* se superpone con la de *YUC1* y *YUC4*, lo que sugiere que también desempeñan un papel en la biosíntesis de auxina. En la cuádruple mutante, *yuc1 yuc4 yuc10 yuc11*, al perder la función de los cuatro genes *YUCCA* se obtuvieron notables defectos de desarrollo, carecían de hipocotilo o raíces y la mayoría solo tenían un cotiledón con poco tejido vascular (Fig. 1.7) (Cheng et al., 2007).

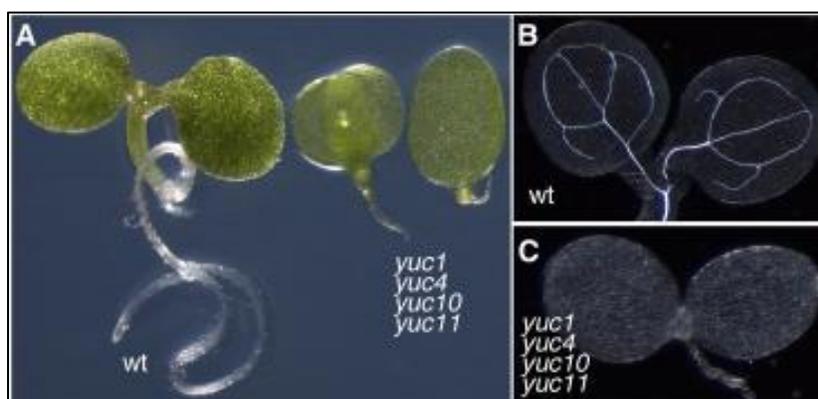


Figura 1.7 Regulación de la embriogénesis de *Arabidopsis* por los genes *YUC*. (A) Defectos en el desarrollo de la cuádruple mutante *yuc4 yuc1 yuc10 yuc11*. La plántula a la izquierda es la silvestre (WT), las dos a la derecha son las mutantes. Nótese que éstas carecen de hipocotilo y raíz. (B y C) Fotografías del sistema vascular observado por la técnica de microscopía de campo oscuro; (B) Plántula de tipo silvestre. (C) Vista de la cuádruple mutante *yuc4 yuc1 yuc10 yuc11* en la que se nota la ausencia de tejido vascular (Cheng et al., 2007).

Para examinar si la familia de los *YUCCA* actúa en la conversión de AIP a AIA se analizaron los niveles de AIP en los brotes de mutantes cuádruples *yuc1 yuc2 yuc4 yuc6* y se determinó que los niveles de AIP en estas plántulas aumentó 1.5 veces en comparación con las silvestres y 2.7 veces en relación con las mutantes *wei8-1* y *tar2-1* que carecen de *TAA1*. También se analizaron los niveles de AIP en las yemas de las triples mutantes *yuc1 yuc2 yuc5* y se determinó una mayor cantidad de AIP en estas mutantes que en las silvestres y en las mutantes *wei8-1* y *tar2-1*. Estos datos muestran que la familia *YUCCA* participa en la conversión de AIP a AIA en *A. thaliana*. (Fig. 1.8) (Mashiguchi et al., 2011).

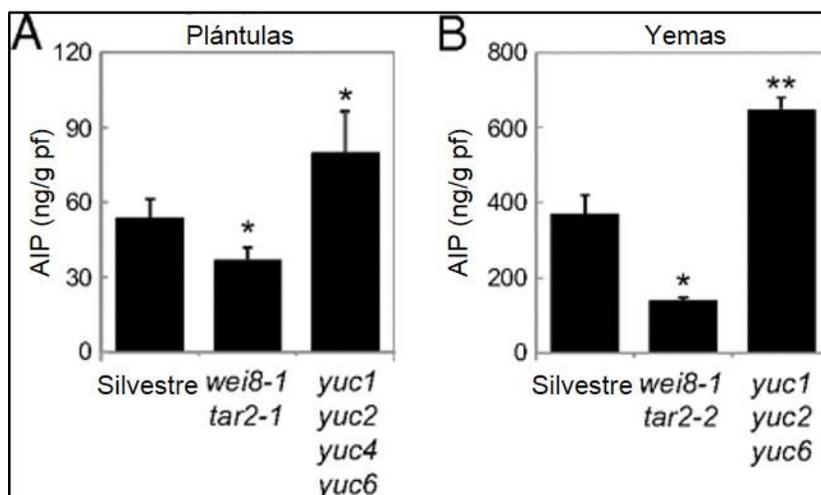


Figura 1.8 Nivel de AIP en plantas de *A. thaliana*. Plantas silvestres de *A. thaliana* (WT), cuádruple mutantes *yuc1 yuc2 yuc4 yuc6* y triple mutantes *yuc1 yuc2 yuc6*, y deficientes en *TAA* y *YUC*, respectivamente (Mashiguchi et al., 2011).

1.7 DESCUBRIMIENTO DE LA RUTA DE SÍNTESIS DE AIA INDEPENDIENTE DE TRP.

En 1991 se descubrió la ruta independiente de Trp en un experimento en maíz (Wright et al., 1991). Se usaron plántulas mutantes *orp* que no producen Trp y plántulas silvestres, y se cuantificó el contenido de AIA total. Después se les añadió Trp y se cuantificó el contenido de AIA total. Se determinó que el nivel de AIA aumentó en las plantas silvestres y no en las mutantes, por lo que se concluyó que éstas no necesitan de Trp para sintetizar AIA y lo sintetizan por una vía independiente de este aminoácido. El contenido de Trp libre fue mayor en las plantas silvestres que en las plantas mutantes (Fig. 1.9).

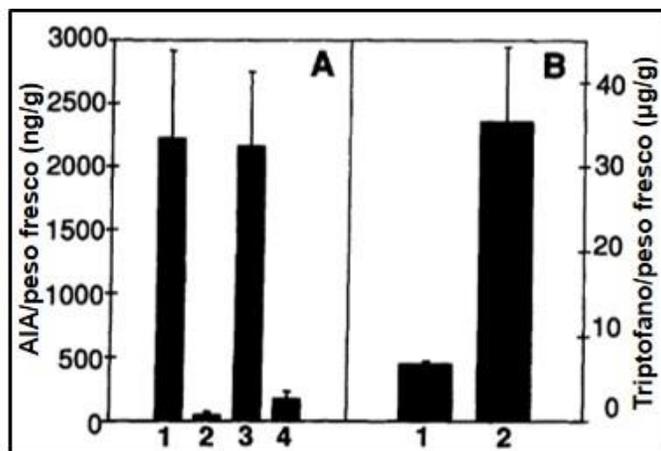


Figura 1.9 Cantidades totales de AIA y Trp libre en plántulas de *Zea mays*. (A) AIA total, línea 1, plántulas *orp*; línea 2, plántulas normales; línea 3, plántulas *orp* + Trp; línea 4, plántulas normales + Trp. (B) Trp libre, línea 1, plántulas *orp*; línea 2, plántulas normales (Wright et al., 1991).

Recientemente (Wang et al., 2015) se reportó que la indol sintasa (INS), localizada en el citosol, es un componente clave en la ruta biosintética independiente de Trp en la biosíntesis del AIA (Fig. 1.10).

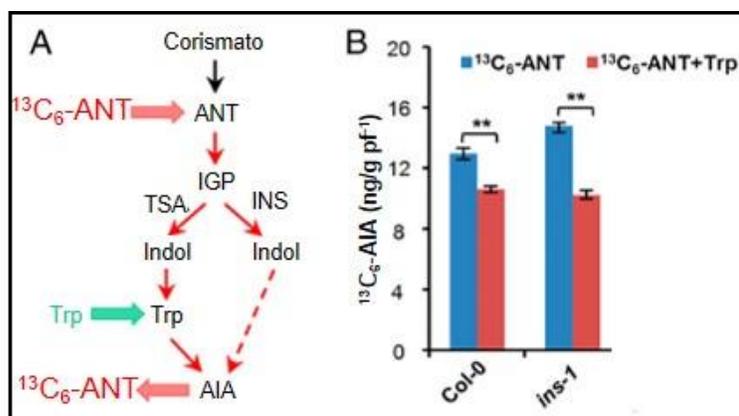


Figura 1.10 INS es un componente clave en la ruta biosintética del AIA independiente de Trp. (A) Diagrama esquemático del destino del $^{13}\text{C}_6$ ácido-antranílico ($^{13}\text{C}_6\text{-ant}$). Las plántulas se transfirieron a medio de Murashige y Skoog líquido (MS) que contiene $^{13}\text{C}_6\text{-ant}$ y se incubaron durante 24 h. En un

ensayo paralelo, el medio MS contenía $^{13}\text{C}_6$ -ant y Trp sin marcar, que debería aumentar el tamaño de la posa de Trp y disminuir la biosíntesis de $^{13}\text{C}_6$ -AIA sólo a través de la vía Trp-dependiente. (B) Contenidos de $^{13}\text{C}_6$ -AIA en plántulas de 12-d de edad de tipo silvestre (Col-0) y mutantes *ins-1* (Wang et al., 2015).

En la Fig. 1.11 se muestra el efectos que tuvieron diferentes inhibidores sobre los niveles de AIA endógeno, en el tratamiento con aminoetoxivinilglicina (AVG) reduce el contenido endógeno de AIA en una forma dependiente de la dosis en plántulas de *A. thaliana* (Fig. 1.11A). Las plántulas fueron tratadas con 30 μM de AVG y Ácido L-aminoxifenil propiónico (L-AOPP) por una hora y se encontró que en presencia de ambos inhibidores el con tenido de AIA endógeno fue menor que en aquellas plántulas que no fueron tratadas con los inhibidores (Fig. 1.11B). Al tratar plántulas silvestres y mutantes con ambos inhibidores se encontró que el AVG aún en la dosis más baja de 3 μM disminuyó más el contenido de AIA que L-AOPP (Soeno et al., 2010).

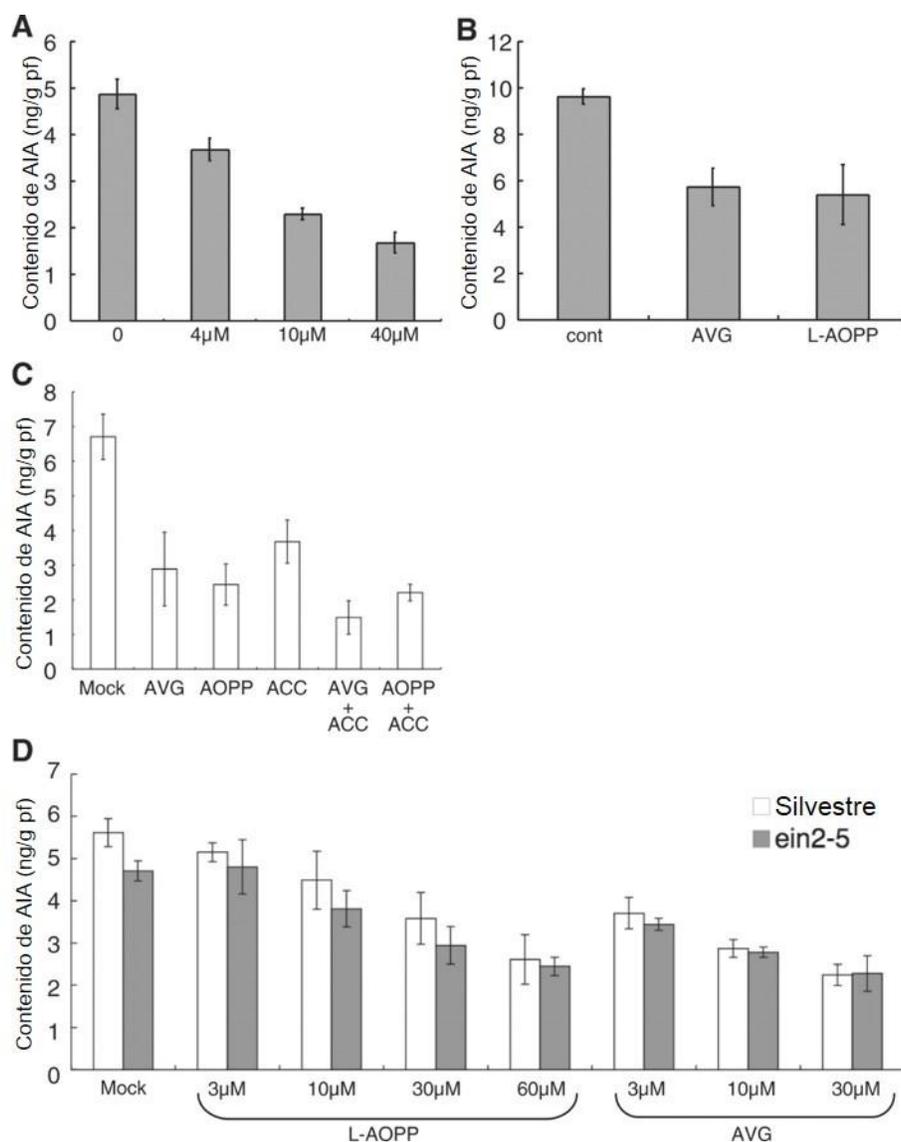


Figura 1.11 Efecto de diferentes inhibidores sobre los niveles endógenos de AIA en plántulas de *Arabidopsis thaliana* (Soeno et al., 2010). Las semillas fueron germinadas y las plántulas cultivadas por 6 d en el medio MS a la mitad de fuerza iónica, transferidos a medio líquido y cultivadas por un día más antes del tratamiento con los inhibidores. Los datos representan la media \pm ES ($n = 3$). A) GC-MS análisis de los niveles endógenos de AIA de las plántulas tratadas con AVG por 24 h. Las plántulas fueron cultivadas por 7 d antes de los tratamientos con el inhibidor. B) LC-MS/MS análisis de los niveles endógenos de AIA en plántulas tratadas con AVG o L-AOPP 30 μ M por una hora. C) LC-MS/MS análisis de los niveles endógenos de AIA en plántulas tratadas con 10 μ M de ACC por 3 h en presencia o ausencia de 30 μ M AVG o 10 μ M L-AOPP. D) LC-MS/MS

análisis de los niveles endógenos de AIA en las plántulas silvestres (WT) o en las plántulas *ein2* tratadas con AVG o L-AOPP. (Soeno et al., 2010).

En estudios anteriores se identificó a la Kyn como un inhibidor competitivo de la enzima TAA1, y se determinó que inhibe la biosíntesis de AIA inducida por etileno en las raíces. El análisis del crecimiento de plántulas de *A. thaliana* Col 0, en presencia del inhibidor Kyn en medio MS, permitió determinar que el crecimiento, tanto del hipocotilo como de la raíz, fue menor que en el testigo.

Por otro lado, el análisis de las mutantes *ctr1-1* y *eto1-2*, las cuales sobreproducen etileno, y por lo tanto se inhibe el crecimiento de la raíz y del hipocotilo, en presencia de Kyn, permitió determinar que se suprimió el fenotipo de ambas mutantes, ya que la Kyn inhibe la biosíntesis del AIA, permitiendo que el hipocotilo y la raíz crezcan (Fig. 1.12) (He et al., 2011).

La biosíntesis de auxina inducida por etileno es inhibida por Kyn. Se determinó que al aplicar Kyn la expresión de GUS se redujo en los meristemos de las raíces y la reducción fue mayor cuando la señalización se activó mediante ACC. Además, la Kyn revierte el efecto inhibitor del crecimiento de la raíz por el tratamiento de ACC exógeno sobre las plántulas de tipo silvestre y suprime la formación del pelo radicular inducido por el tratamiento de ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) (Fig. 1.13). La Kyn también influye en la función del factor de transcripción *ETHYLENE INSENSITIVE3* (*EIN3*). Utilizando una construcción de *EIN3* fusionado al reportero GUS en presencia de Kyn, se determinó que esta última reprime la tinción GUS aun en presencia de ACC (He et al., 2011).

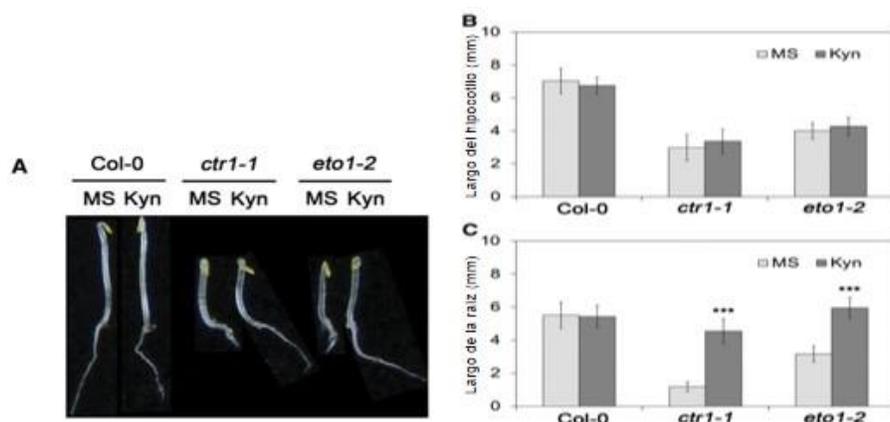


Figura 1.12 Inhibición de la biosíntesis de AIA usando Kyn en plántulas de *A. thaliana*. (A y C) Kyn invierte el fenotipo corto de la raíz en plántulas etioladas *eto1-2* y *ctr1-1*. (A y B) Kyn tuvo poco efecto sobre la longitud del hipocotilo y la curvatura del gancho apical a 1 μ M Kyn. Bajas concentraciones de Kyn suprimen el fenotipo específico de *ctr1-1* y *eto1-2*. (A) Plántulas etioladas de tres días de *A. thaliana* Col-0, *ctr-1* y *eto 1-2* cultivadas en medio MS suplementado con 1 μ M de Kyn. (B) y (C) Cuantificación de la longitud del hipocotilo (B) y raíz (C) de las plántulas mostradas en (A). Las barras representan la longitud promedio ($6 \pm$) de por lo menos 20 plántulas (prueba t de Student entre el tratamiento con Kyn y las plántulas no tratadas ***P < 0.001 (He et al., 2011).

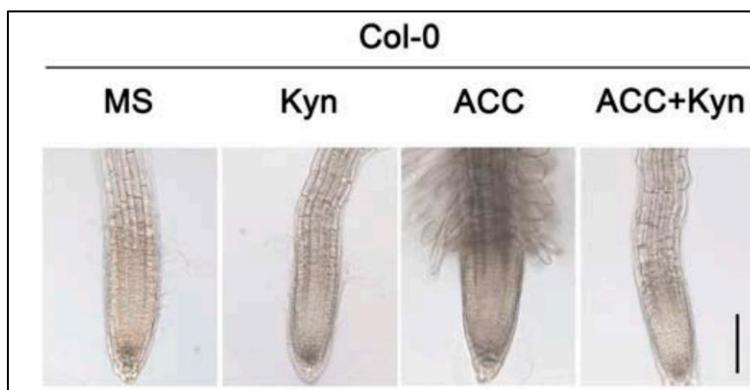


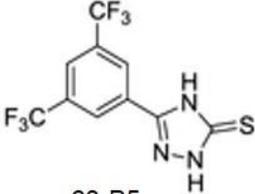
Figura 1.13 La Kyn inhibe la formación de pelo radicular inducida por etileno así como la expresión de EBS:GUS en las raíces. En la figura se muestran las raíces de plántulas etioladas de cuatro días cultivadas en medio MS suplementado con Kyn (1.5 μ M) y/o ACC (10 μ M). La escala de la barra es de 100 μ m (He et al., 2011).

Se han identificado tres compuestos que afectan la biosíntesis del AIA, disminuyendo la cantidad de AIA en los coleoptilos de maíz. Se determinó el efecto de estos compuestos sobre el contenido de AIA endógeno, el transporte de AIA desde el meristemo hasta un bloque de agar, el total de AIA y el gravitropismo del coleoptilo. De los compuestos ensayados, la yucasina mostró el efecto inhibitor más fuerte sobre la producción de AIA en secciones de meristemo de coleoptilo de 3 mm (Fig. 1.14) (Nishimura et al., 2014).

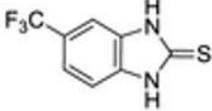
(a)

Químico (100 μ M)	Cantidad de AIA después de 1.5 h de tratamiento			(iv) Inhibición de la curvatura gravitrópica
	(i) pg en la punta a la punta (%)	(ii) pg transportados por la punta por 1.5 h	(iii) Total de pg (%)	
Testigo	196 (100)	780 (100)	976 (100)	-
Yucasina	330 (15)	284 (36)	314 (32)	+
79-H8	45 (23)	262 (34)	307 (31)	+
63-B5	51 (26)	478 (61)	529 (54)	+

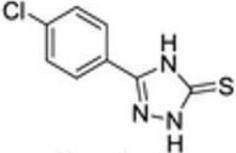
(b)



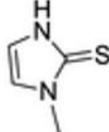
63-B5



79-H8



Yucasina



Metimazol

Figura 1.14 Productos químicos que afectan la biosíntesis de AIA en coleoptilos de maíz. Se analizaron compuestos que disminuyen la cantidad de AIA en el coleoptilo. (a) El análisis permitió identificar tres compuestos, 63-B5, 79-H8 y yucasina. Se determinó el efecto de estos compuestos en el contenido endógeno del AIA en los coleoptilos de maíz, el transporte del AIA desde el meristemo hasta un bloque de agar, así como el gravitropismo del coleoptilo. (b) Estructura química de 63-B5, 79-H8 y yucasina (Nishimura et al., 2014).

En un co-tratamiento de yucasina con Kyn se inhibió la biosíntesis de auxina, así como el desarrollo y crecimiento de las plantas (Nishimura et al., 2014).

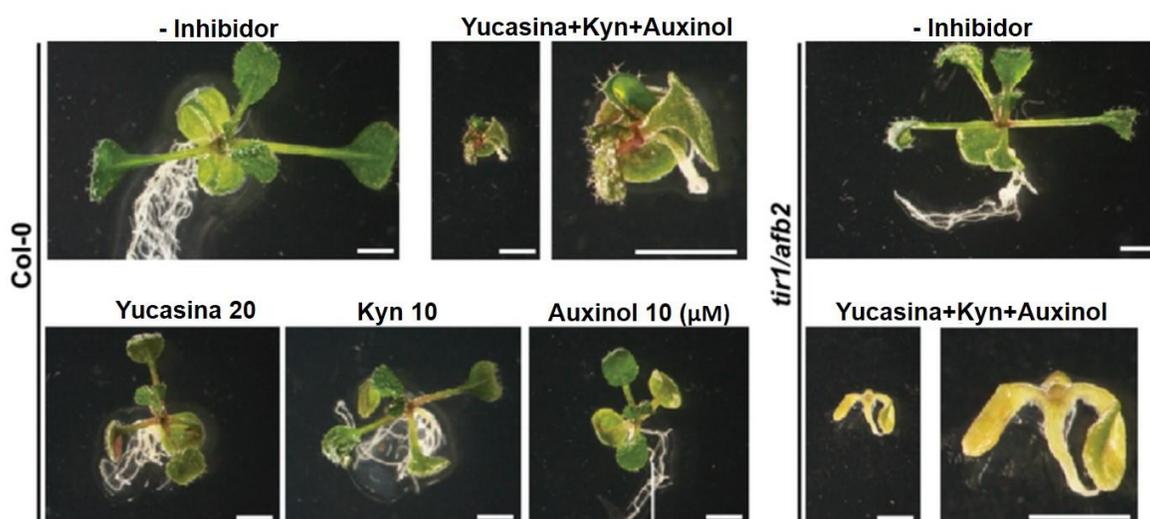


Figura 1.15 El co-tratamiento de los inhibidores yucasina, Kyn y auxinol produce efectos severos relacionados con las auxinas durante el desarrollo de la planta. El tratamiento combinado con 10 μM Kyn, 10 μM auxinol (un bloqueador de TIR1/AFB) y 20 μM de yucasina produce el fenotipo “auxin-null”. La doble mutante *tir1 afb2* mostró hipersensibilidad a la combinación de los inhibidores de la síntesis de auxina y muere después de que abren los cotiledones. La barra de la escala es igual a un cm (Nishimura et al., 2014).

1.8 CONTENIDO ENDÓGENO DE AUXINAS ANTES Y DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA ES DE *COFFEA CANEPHORA*

La auxina solo es necesaria para la formación de grupos de células meristemáticas y es inhibitoria para el desarrollo de la ES (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). También se ha determinado que la presencia de auxina exógena en el medio de cultivo actúa de manera directa en la síntesis de la auxina endógena (Michalczuk et al., 1992). En nuestro laboratorio se ha determinado que el pre-tratamiento de las plántulas de *C. canephora* con ANA y Kin produce un aumento en el contenido endógeno de AIA, el cual alcanza un máximo 14 días después de iniciado el pre-tratamiento. Cuando los explantes de las plantas pre-tratadas

son colocados en el medio de inducción de la ES en presencia de BA y ausencia de auxina el contenido de la auxina endógena disminuye rápidamente (Fig. 1.16) (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

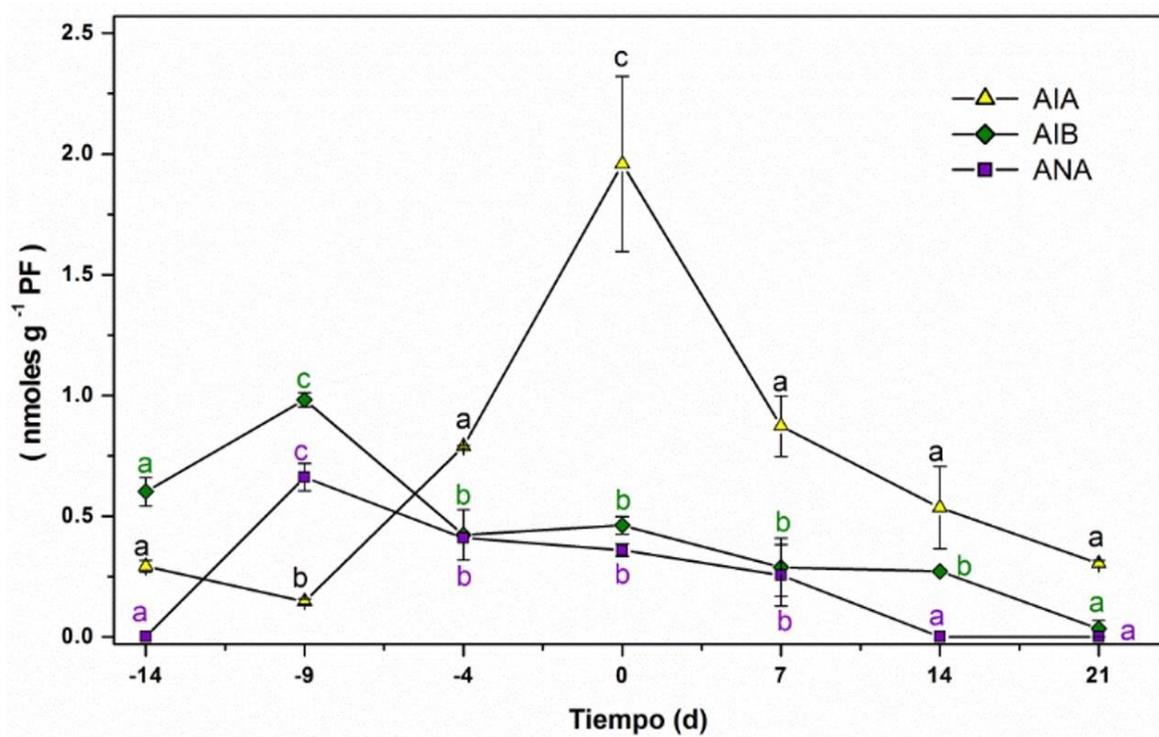


Figura 1.16 Contenido endógeno de auxinas antes y durante la inducción de la ES de *Coffea canephora*. AIA endógeno (▲), IBA (◆), ANA (■) (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

1.9 EXPRESIÓN DE *TAA1*, *YUC1*, *YUC3* DURANTE EL PRE-ACONDICIONAMIENTO Y LA INDUCCIÓN DE LA ES

Cuando se evaluó la expresión del gen *TAA1* y de los genes *YUCCA*, ambos involucrados en la biosíntesis de AIA a partir de Trp en *A. thaliana*, mediante PCR cuantitativo durante la pre-incubación e inducción de la ES en *C. canephora* se pudo determinar que existe una correlación muy estrecha entre el aumento en la expresión de los genes que codifican a las enzimas involucradas en la biosíntesis del AIA y el aumento en el contenido endógeno del

AIA y sus conjugados (Fig. 1.17) (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

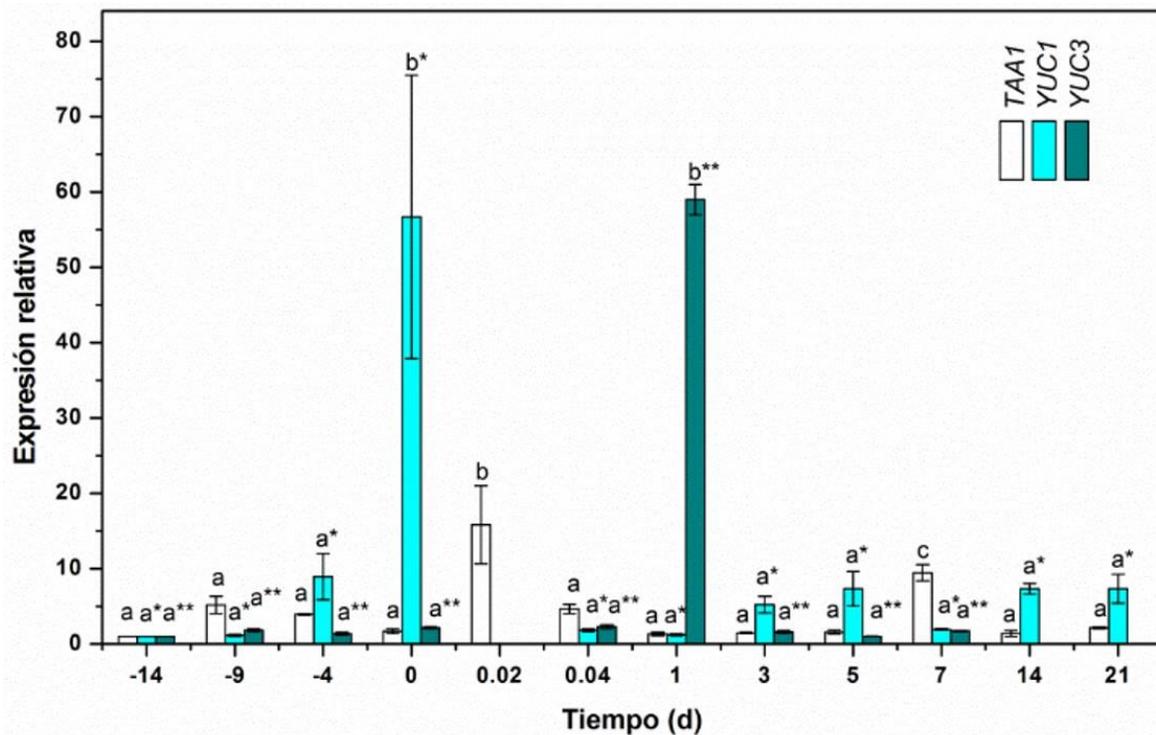


Figura 1.17 Análisis mediante qPCR de la expresión de los genes *CcYUC1* (barras vacías), *CcYUC1* (barras azules), y *CcYUC3* (barras verdes) (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

1.10 JUSTIFICACIÓN

A pesar de los grandes esfuerzos que se han estado realizando para dilucidar y entender los pasos bioquímicos y moleculares que llevan al cambio del programa genético, para que una célula somática se convierta en una masa pro-embriogénica, aún desconocemos una gran parte del proceso. Sabemos que la adición de una auxina exógena al medio de cultivo provoca un aumento en la concentración del AIA endógeno, pero se desconoce si el aumento se debe a su biosíntesis *de novo*, a una hidrólisis de sus conjugados, o a la movilización de auxina desde otros tejidos y si este cambio en su concentración es la acción que desencadena la inducción de la embriogénesis somática.

1.11 HIPÓTESIS

Si el AIA es sintetizado *de novo* durante la pre-incubación de los explantes, entonces modificaciones en su ruta de biosíntesis deberán cambiar su concentración y modificar la respuesta embriogénica.

1.12 OBJETIVO GENERAL

Determinar si el aumento en la concentración de AIA durante la inducción de la embriogénesis somática en *C. canephora* se debe a su biosíntesis.

1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar en qué compuestos aparece la marca del $^{14}\text{C}_3$ -Trp durante el pre-tratamiento de los explantes.

Determinar el efecto de inhibidores de la biosíntesis del AIA en la inducción de la ES.

Determinar qué genes de las diferentes rutas de biosíntesis del AIA se expresan durante la inducción de la ES.

1.14 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Inicialmente se propagarán plántulas de *C. canephora* a partir de explantes de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* de origen somático, sin RCV. Las plántulas serán incubadas en presencia de ANA 0.54 μM y KIN 2.32 μM por 14 días durante el pre-acondicionamiento. Al concluir los 14 días los explantes de hojas serán transferidas al medio líquido de Yasuda modificado que contiene 5 μM de BA. Se colectarán 100 mg de tejido durante los días -14, -9, -7, -4, 0, 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES para los análisis experimentales (se determinarán los niveles de AIA libre y conjugado) (Figura 1.18).

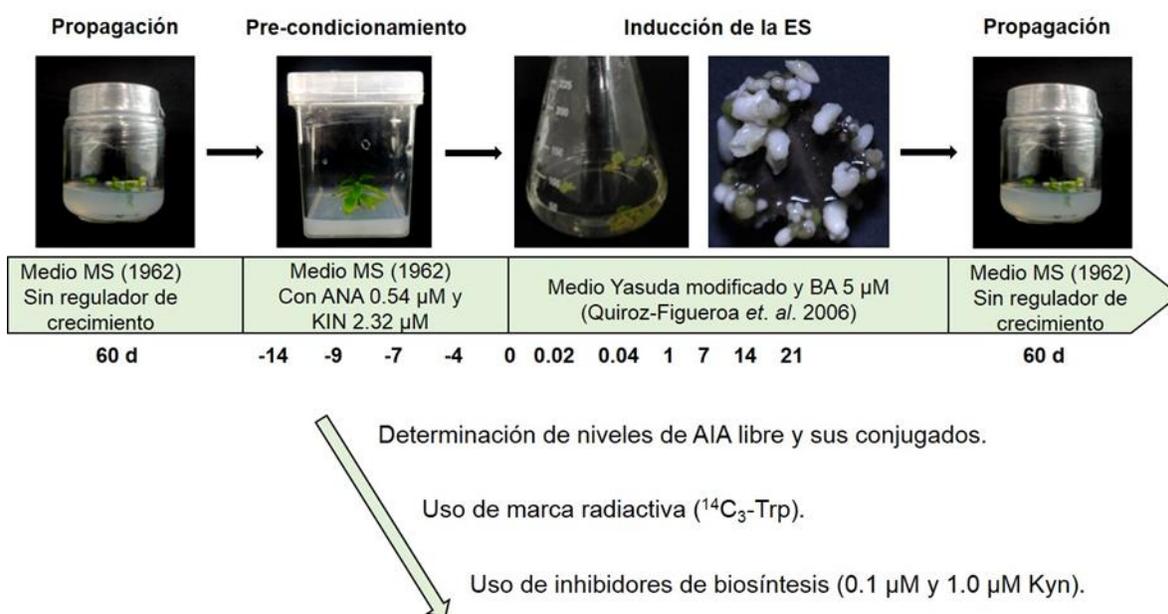


Figura 1.18 Estrategia experimental.

1. Marca radiactiva $^{14}\text{C}_3$ -Trp.

Para el experimento con marca radiactiva las plántulas se incubarán en presencia de $^{14}\text{C}_3$ -Trp durante los 14 días de pre-acondicionamiento y se determinará el contenido de auxinas los días -9, -7, -4 y 0.

2. Uso de inhibidores.

En un segundo experimento se usará una concentración de 1.0 μM Kyn durante el mismo período en presencia de marca radiactiva. En cada uno de estos días se correrá una placa TLC. Seguidamente se identificarán las bandas por el RF de los compuestos, se raspará la sílica, se depositará en viales con líquido de centelleo y se cuantificará la radiactividad de cada fracción en un contador de Centelleo Beckman 6500.

Para llevar a cabo el experimento con el inhibidor, durante el mismo período de 14 días se añadirán dos concentración del inhibidor Kyn (0.1 y 1.0 μM) disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO). Al final del tratamiento de pre-acondicionamiento se colocarán cinco explantes por matraz en 25 ml de medio líquido Yasuda modificado en presencia de BA 5 μM . Durante los días -9, -7, -4, 0, 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES se colectarán 100 mg de tejido para los análisis experimentales (determinación de AIA libre y sus conjugados).

3. Análisis del transcriptoma.

Para determinar cuáles son los genes que se encuentran expresados en la biosíntesis del AIA durante el pre-tratamiento e inducción de la ES se buscarán aquellos transcritos que sean identificados como participantes en la ruta de biosíntesis del AIA usando los datos del transcriptoma generados en la publicación en preparación por Cetz-Chel et al.

CAPÍTULO II

INHIBICIÓN DE LA BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO-3-INDOLACÉTICO EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *COFFEA CANEPHORA*.

2.1 INTRODUCCIÓN

Desde los años 50's se han tenido importantes avances en el desarrollo de diversas tecnologías para obtener embriones somáticos de un número cada vez mayor de especies. Tener embriones somáticos disponibles permite destinarlos a programas de mejoramiento genético o a la propagación a gran escala de genotipos superiores, especialmente en cultivos perennes de alto valor. El uso de la ES para la propagación seguirá aumentando según hayan protocolos más avanzados y refinados, capaces de producir embriones morfológicamente normales, sin variación somaclonal y con capacidad para germinar y convertirse en plantas vigorosas de forma rápida y eficaz (Parrott et al., 1995).

Por otro lado, también se debe tener presente que las auxinas son reguladores clave de casi todos los procesos de crecimiento y desarrollo de la planta, incluyendo la formación de los órganos florales y los tejidos vasculares, el crecimiento de brotes, el fototropismo y el gravitropismo (Ljung et al., 2001). El AIA es una auxina universal en todas las plantas. Se sintetiza en casi todos los tejidos, aunque a velocidades diferentes. En plántulas de *A. thaliana* se produce AIA en sus hojas, lóbulos de semillas y raíces, la mayor síntesis se produce en hojas jóvenes (Ludwig-Muller et al., 2005).

Actualmente se han descrito cinco vías implicadas en la biosíntesis del ácido AIA a partir de Trp, de las cuales cuatro son dependientes de éste aminoácido y una es independiente del mismo (Mano y Nemoto, 2012). Con base en estudios recientes en *C. canephora* se ha sugerido que la ruta de biosíntesis del AIA que tiene como precursor al AIP es la que está involucrada en la síntesis del AIA durante el pre-tratamiento de las plantas usadas como fuente de explante para la inducción de la ES (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las plántulas de *C. canephora* utilizadas en la investigación fueron obtenidas a partir de embriones somáticos. Los embriones somáticos fueron germinados en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) (MS; Phyto Technology Laboratories, M524) y suplementado con tiamina-HCl (29.6 μM ; Sigma, T3902-25G), mio-inositol (550 μM ; Sigma, I5125-500G), cisteína (0.15 μM ; Sigma; C8277), sacarosa (87.64 mM; Sigma, S5391) y gelrite (0.25%, p/v; Sigma, G1910), pH 5.8 y cultivadas a 25 ± 2 °C en fotoperiodo de 16/8h (luz/oscuridad; $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2.2 Inducción de la embriogénesis somática

Después de 40 semanas de cultivo en medio MS, las plántulas se acondicionaron por 14 días en medio MS suplementado con ANA (0.54 μM ; Sigma, N1145) y KIN (2.32 μM ; Sigma, K0753), pH 5.8 y cultivadas a 25 ± 2 °C en fotoperiodo de 16/8h (luz/oscuridad; $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Para el pre-acondicionamiento de las plántulas con el inhibidor, durante el mismo período de 14 días se le añadió Kyn (0.1 y 1.0 μM ; Sigma, K8625-1G), el cual fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, D8418) y esterilizado por filtración a través de un filtro Millipore de 0.22 μm . Al final del tratamiento de pre-acondicionamiento se obtuvieron discos foliares de 10 mm de diámetro con un sacabocado del segundo y tercer par de hojas (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Se colocaron cinco explantes en matraces Erlenmeyer de 250 ml en 50 ml de medio de Yasuda et al. (Yasuda et al., 1985), en presencia de BA (5 μM ; Phyto Technology Laboratories B800) y cultivados a 25 ± 2 °C en la oscuridad a 55 rpm.

2.2.3 Extracción de auxinas y sus conjugados

Los muestreos se llevaron a cabo con la colecta de 100 mg de tejido durante los días -9, -4 del pre-acondicionamiento; el día 0 de la inducción y 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Las muestras se mantuvieron almacenadas a -81 °C hasta su uso. El tejido congelado fue molido con nitrógeno líquido y mezclado con un ml de agua ácida (el pH se ajustó a 2.8 con HCl). La mezcla fue transferida a un tubo de ensayo con un ml

adicional de agua ácida. La mezcla se agitó durante un min con un ml de una solución de hidroxitolueno butilado (Acros Organics, 112992500) y seguidamente se le adicionó un ml de acetato de etilo (CTR Scientific, CTR 00184). Se agitó por un min y se recuperó el sobrenadante. A continuación se adicionaron 2 ml de acetato de etilo, se agitó durante un min, se recuperó el sobrenadante. Esta operación se repitió una vez más. De esta mezcla se tomaron 3 ml de la fase orgánica y se evaporaron con nitrógeno gaseoso. La muestra seca se resuspendió en un ml de la fase móvil con la que se corre la muestra en el HPLC (60% acetonitrilo; J. T. Baker, 9017-03: 40% agua conteniendo 0.5% (v/v) ácido acético; CTR Scientific, 00500) y filtrado a través de un filtro Millipore (0.22 μ M).

2.2.4 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se utilizó un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent Technologies 1200 que consiste de un arreglo cuaternario de bombas (Agilent Technologies G1311A) conectado a un inyector automático (Agilent Technologies G1329A). Se inyectaron 20 μ l del extracto de los tejidos y fueron sometidos a cromatografía en un sistema de elusión isocrático con una velocidad de flujo de 0.6 ml min⁻¹ en una columna de fase reversa C18 (Phenomenex) de 250 mm x 4.6 mm. Las muestras fueron analizadas con un detector de fluorescencia (Agilent Technologies G1321A) y se usó una longitud de emisión de 280 nm y una longitud de excitación de 340 nm. La presencia de los compuestos en las muestras analizadas fue determinada mediante los tiempos de retención del AIA y de los conjugados AIA-Ala, AIA-Leu, AIA-Glu y AIA-Asp, para lo cual se realizaron co-inyecciones de los estándares y de las muestras analizadas, para determinar si coincidían en su elusión. Las curvas de calibración se realizaron con los estándares conjugados, usando el área debajo de cada curva de cada compuesto.

2.2.5 Preparación de las plántulas en presencia de ¹⁴C₃-Trp

Las plántulas se incubaron en presencia de ¹⁴C₃-Trp (NEN-Dupond; 1.85 MBq 55 mC mmol⁻¹) durante los 14 días de pre-tratamiento. Las auxinas se aislaron los días -14, -9, -7, -4 y 0 del pre-acondicionamiento. Para hacer un seguimiento de la incorporación del Trp marcado, el extracto auxínico se corrió en una placa TLC de sílice con indicador fluorescente de alumina (Kieselgel 60 F₂₅₄). Para ello se aplicaron 5 μ L del extracto de hojas incubadas con

$^{14}\text{C}_3$ -Trp y de los estándares Trp (0.25 μL ; Sigma, T0254, 1G), AIP (1 μL ; Sigma, L7017-1G) y AIA (0.25 μL ; Sigma, 45533-250MG) a las placas. Las muestras corrieron 3 cm utilizando una mezcla de cloroformo:acetato de etilo (50:50) como fase móvil y se utilizó el reactivo de Salkowski como revelador. Las bandas se identificaron por el RF de los compuestos. Se raspó la sílica de cada banda, se depositó en viales con líquido de centelleo y se cuantificó la radiactividad de cada una de ellas en un contador de centelleo (Beckman 6500).

2.3 RESULTADOS

A pesar de los grandes esfuerzos que se están realizando para dilucidar y entender los pasos bioquímicos y moleculares que producen el cambio en el programa genético para que una célula somática se convierta en una masa pro-embriogénica, aún desconocemos una gran parte del proceso. Sabemos que la adición de una auxina exógena al medio de cultivo provoca un aumento en la concentración del AIA endógeno en tejidos de *C. canephora* cultivados *in vitro* (Ayil-Gutiérrez et al., 2013), pero se desconoce si el aumento se debe a su biosíntesis *de novo*, a una hidrólisis de sus conjugados, o a la movilización de auxina desde otros tejidos y si este cambio en su concentración es la acción que desencadena la inducción de la ES.

Para determinar si el aumento en el contenido del AIA que está presente en *C. canephora* se debe a su biosíntesis *de novo*, se usaron dos estrategias. La primera fue el uso de marca radiactiva utilizando $^{14}\text{C}_3$ -Trp como se ha hecho en *A. thaliana* (Sugawara et al., 2009; Zhao et al., 2002; Hull et al., 2000) y *Solanum lycopersicum* (Liu et al., 2012).

Cromatografía de capa fina. Dado que no se deben correr muestras radiactivas en el HPLC, lo primero que se hizo fue estandarizar un método para detectar los intermediarios de la síntesis del AIA mediante cromatografía en placa fina (TLC). Una vez que se realizó la extracción de las auxinas de las plántulas de *C. canephora*, durante el pre-tratamiento de los diferentes días del experimento, tal y como se mencionó en materiales y métodos, se colocaron 5 μl del total de los 100 μl del extracto de la hoja, así como los estándares de Trp, AIP y AIA en una placa cromatográfica. Una vez que se corrió la placa y se reveló con el reactivo de Salkowski (tiñe a los compuestos que contienen un grupo indol), cada mancha

fue raspada de la placa y colocada en un vial de centello para contar la radiactividad presente. Después, con el fin de tener certeza de que no había compuestos radiactivos fuera de los marcados por el revelador, se cortaron las zonas entre las manchas y se determinó la radiactividad. En este último caso no se detectó marca radiactiva en ningún caso.

En la Figura 2.1A se muestran los resultados de la separación cromatográfica de los productos de la reacción de síntesis del AIA. En particular, se puede apreciar la presencia de AIP de manera importante a partir del día -7. En la placa de la Figura 2.1B se puede apreciar el resultado de la incubación en presencia del $^{14}\text{C}_3$ -Trp. Los números en rojo dentro de la placa, en la posición del AIA muestran las cuentas por minuto (cpm) obtenidas para 5 μl del extracto. Conforme avanzan los días del pre-tratamiento se presenta un aumento en las cpm en la banda que corresponde al AIA, lo cual sugiere que el AIA sintetizado proviene del Trp y es *de novo*. Hay un aumento de 7 veces en el contenido de AIA marcado entre el día -9 y el día cero. El Trp marcado sólo empieza a aparecer en los días -4 y 0, posiblemente debido a una acumulación de Trp, cuando ya la célula alcanzó un máximo en la biosíntesis del AIA.

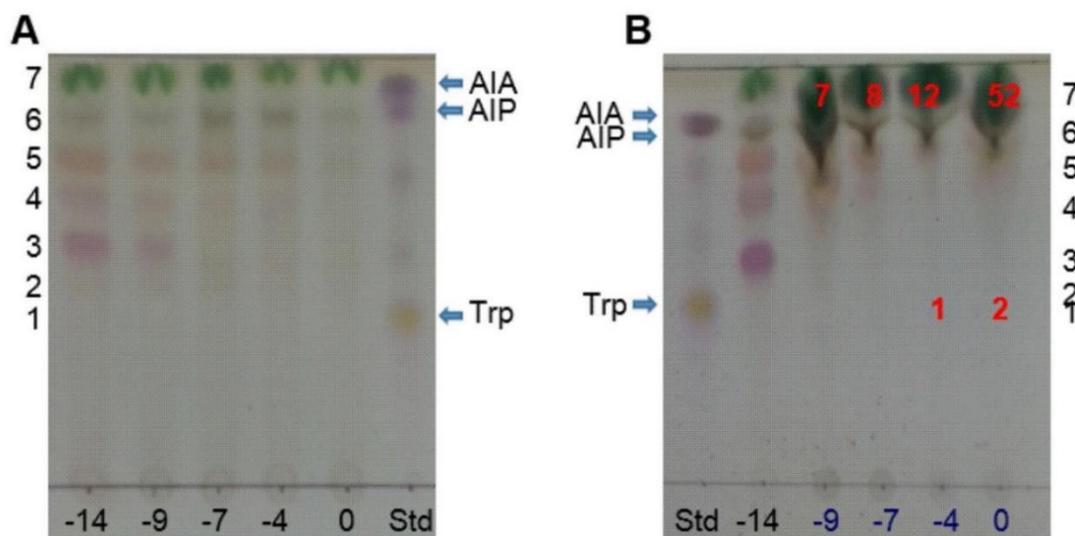


Figura 2.1 Análisis de AIA mediante TLC del extracto de las hojas de las plántulas de *Coffea canephora* durante el pre-acondicionamiento. (A) Placa cromatográfica

del extracto de las muestras durante el pre-tratamiento de las plántulas de *C. canephora* y estándares de los compuestos Trp, AIP y AIA sin $^{14}\text{C}_3\text{-Trp}$. (B) Placa cromatográfica del extracto de las muestras durante el pre-tratamiento de las plántulas de *C. canephora* en presencia de $^{14}\text{C}_3\text{-Trp}$ y estándares de los compuestos Trp, AIP y AIA. Los números rojos dentro de la placa corresponden a las cuentas por minuto por 5 μl de extracto.

Radiactividad total de cada plántula incubada con $^{14}\text{C}_3\text{-Trp}$. Para determinar la distribución de toda la radiactividad presente en cada unidad experimental, se cuantificó la radiactividad del extracto de todas las hojas de la plántula. También se realizó la extracción de las auxinas presentes en el tallo y se midió su radiactividad. De los días -9, -7 y -4 no se realizó la extracción del tallo debido a que éste estaba sumergido en el medio líquido y no iba a ser posible determinar cuánta radiactividad se debía a la auxina presente en el tallo y cuanta radiactividad era contaminación externa. Pero si se realizó del día cero. Dado que las plántulas fueron incubadas en 10 ml de medio de pre-acondicionamiento, en el que se adicionó la radiactividad, se tomaron 10 μl para contar en el centellador. A cada unidad experimental se le adicionaron 2,679,807 cpm (Cuadro 2.1). Como puede apreciarse en el Cuadro 2.1 se pudo determinar el destino de la mayor parte de la radiactividad utilizada en cada unidad experimental.

Cuadro 2.1 Radiactividad total presente en cada muestra de plántulas de *C. canephora* analizada.

Muestra	Días			
	-9	-7	-4	0
Extracto de la hoja	154	174	274	1 093.4
Tejido en agua de la hoja	287.33	764.67	755.7	1 131.33
Medio	2,306,388	1,845,858	1,537,818	2,283,948

Tallo	-	-	-	5,860.4
Raíz	-	-	-	-
Total de cuentas por minuto	2,306,829	1,846,796	1,538,848	2,292,033
Total de cpm iniciales = 2,679,807				

Con los resultados que se obtuvieron con la primera estrategia se puede sugerir que el aumento en el contenido del AIA se debe a su biosíntesis *de novo* durante el pre-tratamiento de las plántulas, previo a la inducción de la ES.

Uso de inhibidores de la biosíntesis del AIA. Para esta parte del estudio se usó el inhibidor Kyn, un inhibidor competitivo de las enzimas TAA. Estas enzimas convierten Trp a AIP. Se usaron dos concentraciones de la Kyn, 0.1 μM y 1 μM . El inhibidor se disolvió en DMSO. El inhibidor se añadió durante el inicio del pre-tratamiento de las plántulas. Se llevaron a cabo cuatro experimentos al mismo tiempo, el testigo (sin ningún tratamiento), el testigo adicionado con DMSO y los dos tratamientos con el inhibidor. Al finalizar los 14 días de pre-incubación se realizó la inducción de la ES en forma normal y se cuantificó el número de embriones somáticos obtenidos en cada tratamiento.

En la figura 2.2A se puede observar en la primera columna la respuesta de los explantes a la inducción de la ES. Se producen cerca de 350 embriones somáticos por explante después de 60 días de inducción. Los 350 embriones obtenidos se distribuyen de la siguiente manera en la muestra, 13.8% de embriones en el estadio globular, 50.3% de embriones en el estadio de corazón, 27.6% en el estadio de torpedo y 8.3% en el estadio cotiledonar. Los embriones cotiledonares se pusieron a germinar en medio MS sin RCV. Todos los embriones produjeron plantas sanas y vigorosas.

En la segunda columna de la Figura 2.2A se observa el efecto del DMSO en la inducción de la ES. La producción de embriones somáticos disminuyó a 50 embriones por explante a

los 60 días de la inducción de la ES. La mayoría de estos embriones se encuentran en el estadio globular. La presencia del inhibidor disminuyó el número de embriones somáticos por explante a un promedio de 5, al final de los 60 días, todos ellos en el estadio globular (Fig. 2.2B). En suma, hubo 5.4 veces más embriones somáticos en el testigo que en la muestra tratada con DMSO, y 28.2 y 47.1 veces más embriones somáticos que en aquellas muestras que fueron tratadas con el inhibidor a 0.1 y 1.0 μM respectivamente. Estos datos sugieren que la vía de síntesis del AIA durante la pre-incubación de los explantes de *C. canephora* es la del AIP. Sin embargo, será importante repetir el experimento usando un disolvente menos agresivo con el proceso de ES.

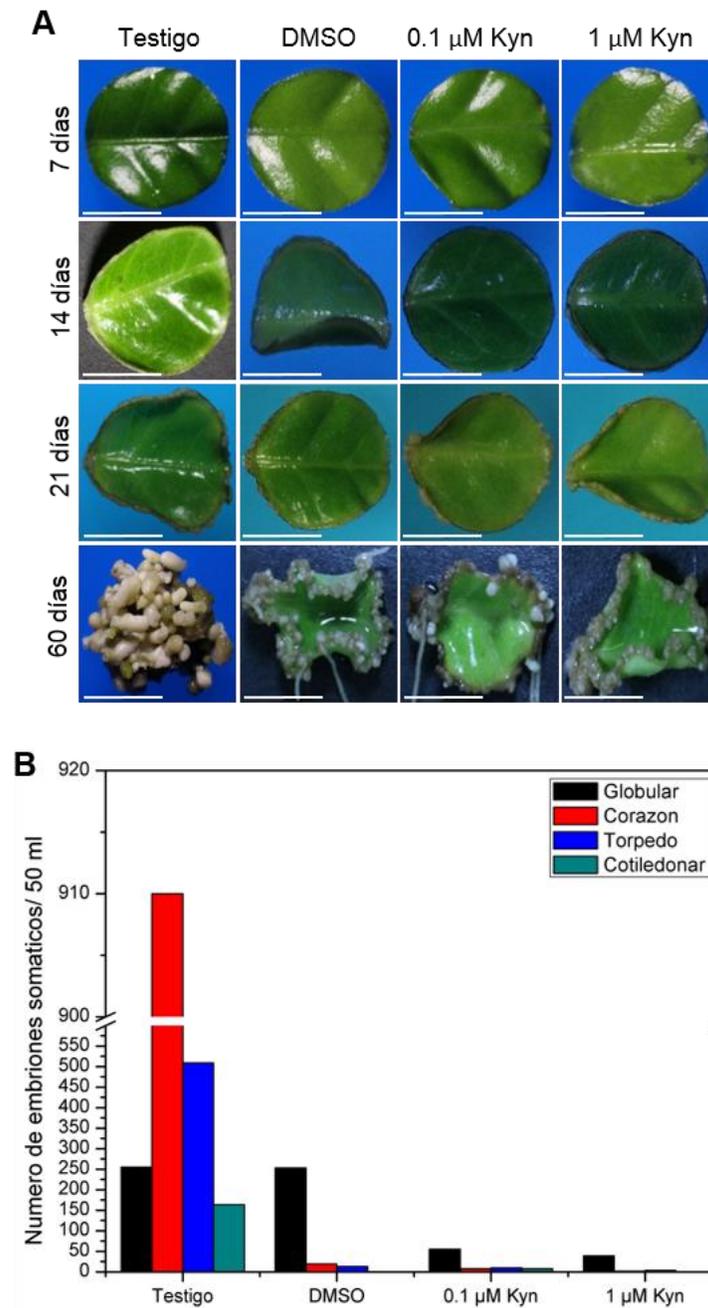


Figura 2.2 Inducción de la ES de *C. canephora* en presencia del inhibidor Kyn. A. Fotografía de los explantes *C. canephora* a lo largo del proceso de inducción de la ES en presencia de DMSO y del inhibidor. Escala: 5 mm. B. Número de embriones somáticos de cinco explantes en 50 ml de medio líquido de inducción

de Yasuda modificado. Embriones en el estadio globular (barras negras); embriones en el estadio corazón (barras rojas); embriones en el estadio torpedo (barras azules); embriones en el estadio cotiledonar (barras verdes).

Efecto de la presencia de L-quinurenina durante el pre-tratamiento de las plántulas de *C. canephora* en presencia de $^{14}\text{C}_3\text{-Trp}$. Los resultados de los dos experimentos anteriores sugieren que la ruta de biosíntesis presente en *C. canephora*, durante el pre-tratamiento, es la ruta mediada por la enzima TAA1. Por ello se decidió realizar un experimento adicional y determinar si el inhibidor elimina la aparición de la marca en el AIA durante el pre-tratamiento de las plántulas. Para ello se incubaron las plántulas en el medio de pre-acondicionamiento durante 14 días en presencia de $^{14}\text{C}_3\text{-Trp}$ y 1 μM de Kyn. Al finalizar los 14 días se llevó a cabo la extracción de las auxinas en cada uno de los días de muestreo.

Los resultados mostrados en la Figura 2.3 revelan que no hubo producción de AIA en presencia del inhibidor y, por lo tanto, tampoco incorporación de marca radiactiva en él. Esta evidencia sugiere que al inhibir la acción de la enzima TAA1 se inhibió la incorporación del aminoácido marcado radiactivamente en el AIA (Fig. 2.3).

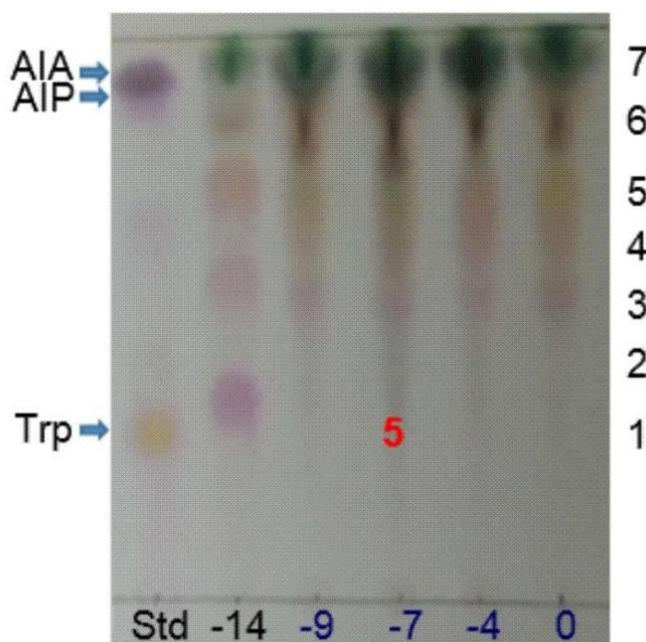


Figura 2.3 TLC del extracto de hojas de plántulas de *C. canephora* en pre-acondicionamiento en presencia de $^{14}\text{C}_3$ -Trp y el inhibidor Kyn. Los números rojos dentro de la placa corresponden a las CPM.

Contenido de AIA libre y AIA conjugado. Debido a que el 95% del AIA se encuentra en forma conjugada (Ayil-Gutiérrez et al., 2013) se decidió llevar a cabo la cuantificación de los conjugados del AIA, además de cuantificar el contenido de AIA libre. También se incluyó el tratamiento que contiene DMSO con el fin de determinar si este solvente modifica la homeostasis del AIA.

El contenido endógeno de AIA libre inicial es de $0.22 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$ y aumenta más de nueve veces durante el pre-acondicionamiento de las plántulas en presencia de ANA y Kin (Fig. 2.4), cuando alcanza un contenido máximo de $2.06 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$ catorce días después de iniciado el pre-tratamiento. Este contenido de AIA libre disminuye rápidamente durante la primera hora de incubación de los explantes en el medio de inducción de la ES y se mantiene en niveles de 0.1 a $0.5 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$ durante los siguientes seis días. Su contenido vuelve a aumentar con la aparición de las primeras estructuras embrionarias.

Los conjugados del AIA son una parte muy importante de su homeostasis, por ello fueron

determinados a lo largo de todo el proceso en estudio. Se midieron los contenidos de los conjugados del AIA con los aminoácidos alanina, leucina, y los ácidos glutámico y aspártico. El conjugado con el ácido glutámico es más del 85% del contenido total de AIA. Catorce días de pre-tratamiento produce un nivel endógeno de 98 nmoles g⁻¹ PF de AIA-Glu. Después de la inducción de la ES, el contenido de AIA-Glu disminuye siete veces en sólo 24 horas, y prácticamente desaparece siete días después de la inducción de la ES.

Los conjugados con alanina y leucina conforman el 12.6% del total del AIA. Estos conjugados son muy importantes para la homeostasis del AIA ya que pueden ser hidrolizados y contribuir con AIA libre. El AIA-Ala aumenta de 2.49 nmoles g⁻¹ PF al inicio del pre-tratamiento a 11 nmoles g⁻¹ PF al momento de la inducción y disminuye, muy rápidamente durante los siguientes 21 días. El conjugado de AIA-Leu disminuye durante los primeros siete días del pre-tratamiento de forma muy importante y para el momento de la inducción de la ES regresa a sus niveles iniciales. Este conjugado disminuye muy rápidamente durante las primeras horas de la inducción de la ES para a continuación empezar a aumentar a niveles de 2.5 a 5.5 nmoles g⁻¹ PF en los siguientes días.

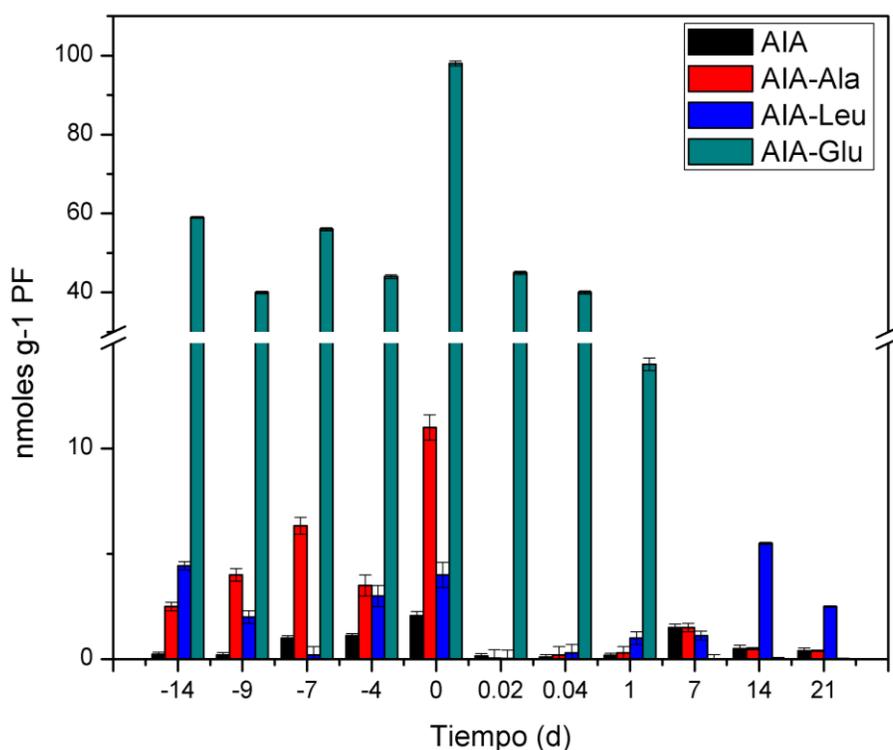


Figura 2.4 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en *C. canephora*. Se colectaron 100 mg de tejido de las plántulas (días -14, -9, y -4). Del día de la inducción (día cero). También se colectaron muestras a los 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres réplicas biológicas a partir de por lo menos dos experimentos diferentes. Las barras representan el error estándar ($n = 3$).

El inhibidor de la TAA se disuelve en DMSO, por ello se evaluó el contenido del AIA y sus conjugados en presencia de este disolvente (Fig. 2.5). La presencia del disolvente disminuye el contenido de AIA libre en 62%. Algo muy interesante que surgió al determinar el contenido del conjugado de AIA-Glu en presencia de DMSO es que si bien el contenido absoluto disminuye en presencia de DMSO, cuando se mide como porcentaje del total de AIA es el mismo 85% del total de AIA tanto para el testigo como para el conjugado

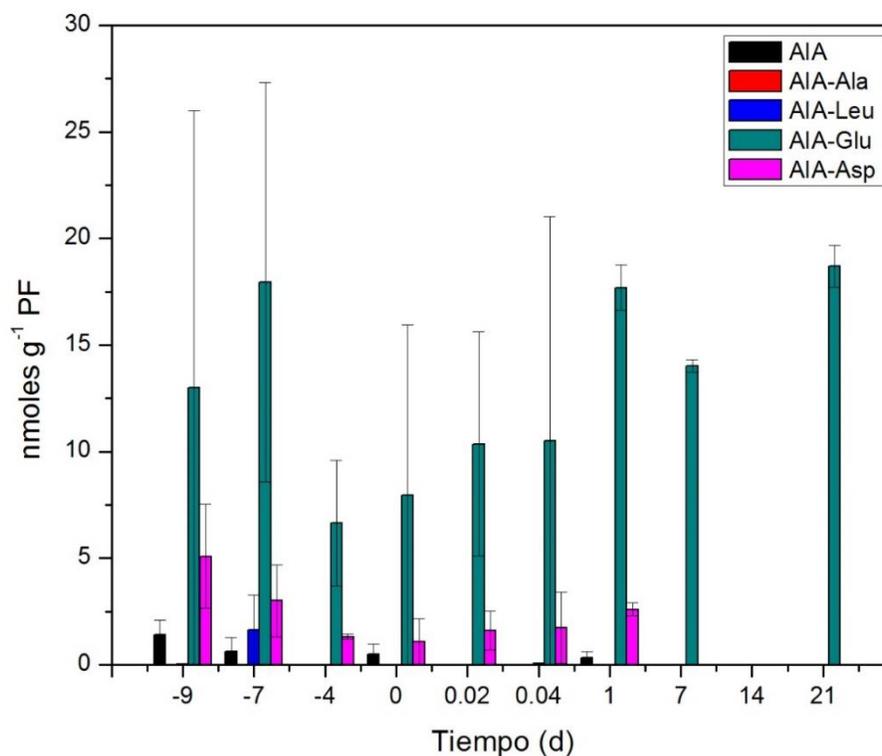


Figura 2.5 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en *C. canephora* en presencia de DMSO. Se colectaron 100 mg de tejido de las plántulas (días -14, -9, y -4). Del día de la inducción (día cero). También se colectaron muestras a los 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres réplicas biológicas a partir de por lo menos dos experimentos diferentes. Las barras representan el error estándar ($n = 3$).

Cuando las muestras fueron tratadas con $0.1 \mu\text{M}$ del inhibidor de la enzima TAA1, el contenido de AIA disminuyó a $1.24 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$, esto es seis veces menos AIA libre que en el testigo y 66% menos que la muestra tratada con DMSO (Fig. 2.6). El tratamiento con el inhibidor a una concentración de $1 \mu\text{M}$ inhibió totalmente la biosíntesis de AIA (Fig. 2.7).

Como consecuencia de la disminución en el contenido de AIA libre por efecto del inhibidor, la concentración de algunos conjugados también disminuyó (Figs. 2.6 y 2.7). El conjugado AIA-Leu disminuyó 42% en presencia de $0.1 \mu\text{M}$ del inhibidor y más del 80% en presencia

de 1 μM del inhibidor.

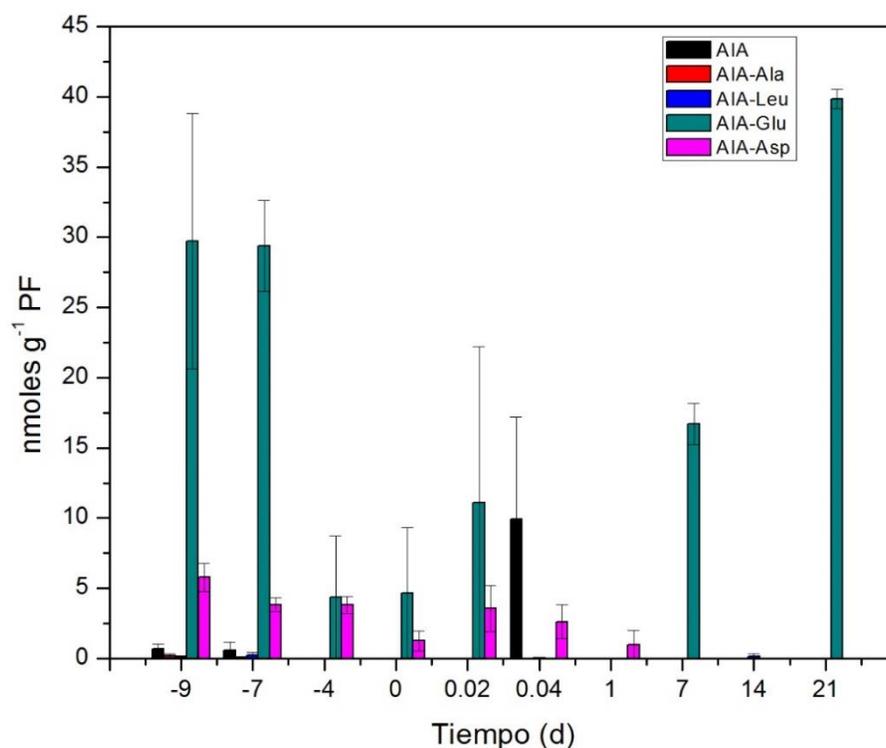


Figura 2.6 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en *C. canephora* en presencia de 0.1 μM Kyn. Se colectaron 100 mg de tejido de las plántulas (días -14, -9, y -4). Del día de la inducción (día cero). También se colectaron muestras 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres réplicas biológicas a partir de por lo menos dos experimentos diferentes. Las barras representan el error estándar ($n = 3$).

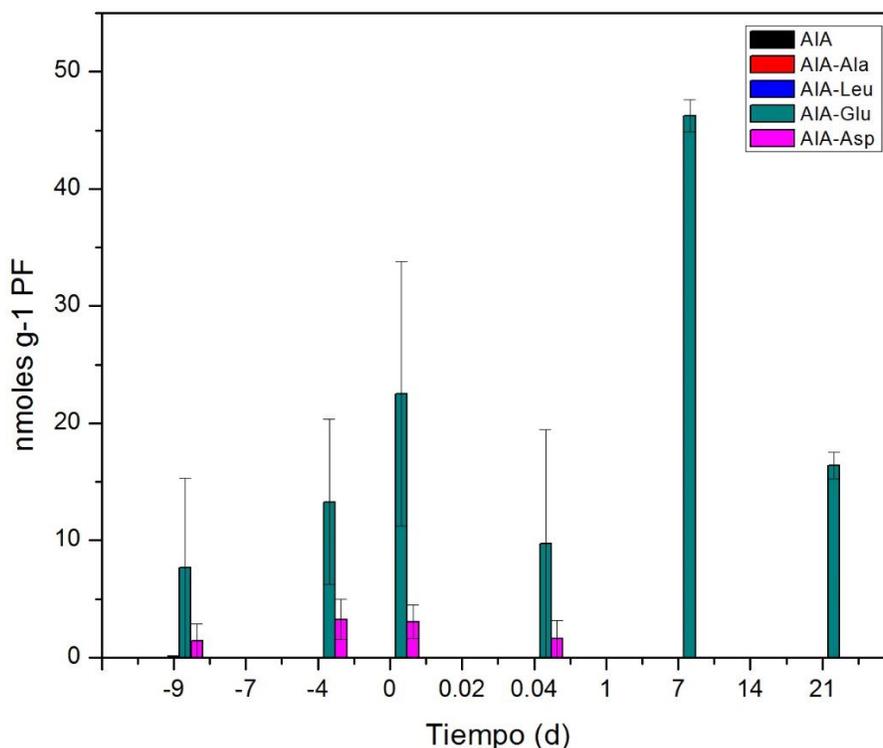


Figura 2.7 Contenido de AIA y sus conjugados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en *C. canephora* en presencia de 1 μ M Kyn. Se colectaron 100 mg de tejido de las plántulas (días -14, -9, y -4). Del día de la inducción (día cero). También se colectaron muestras 0.02, 0.04, 1, 7, 14 y 21 después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres réplicas biológicas a partir de por lo menos dos experimentos diferentes. Las barras representan el error estándar ($n = 3$).

Análisis del transcriptoma. La inducción de la ES está modulada en gran medida por la homeostasis del AIA, y para ello el AIA necesita ser sintetizado, conjugado, almacenado, degradado, y transportado, por lo que es de esperarse que se expresen un número importante de los genes cuyos productos participan de la homeostasis.

En nuestro grupo de trabajo se generó el transcriptoma de la inducción de la ES de *C. canephora*. Se muestrearon seis días del proceso, los días -14 y -9 del pre-tratamiento, y los días 0, 1, 2 y 21 días después de la inducción de la ES. Cada punto se realizó por

duplicado de forma independiente. Puesto que ya se cuenta con la secuencia del genoma de *C. canephora*, se procedió a anotar el transcriptoma (Cetz-Chel et al., en preparación). Esta anotación permitió identificar los genes pertenecientes a la biosíntesis del AIA y que se encuentran expresados durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES.

Los datos del transcriptoma se analizaron con el objeto de saber cuáles genes son los que se están expresando y reprimiendo durante el pre-tratamiento e inducción de la ES en *Coffea canephora*, y de esta manera tener una base de cuáles son los genes de las diferentes rutas de la biosíntesis de AIA que están funcionando al mismo tiempo en los días de muestreo mencionados y posteriormente validarse por medio de qPCR para saber cuáles son los genes que están presentes en cada uno de los días del pretratamiento e inducción de la ES en *C. canephora*.

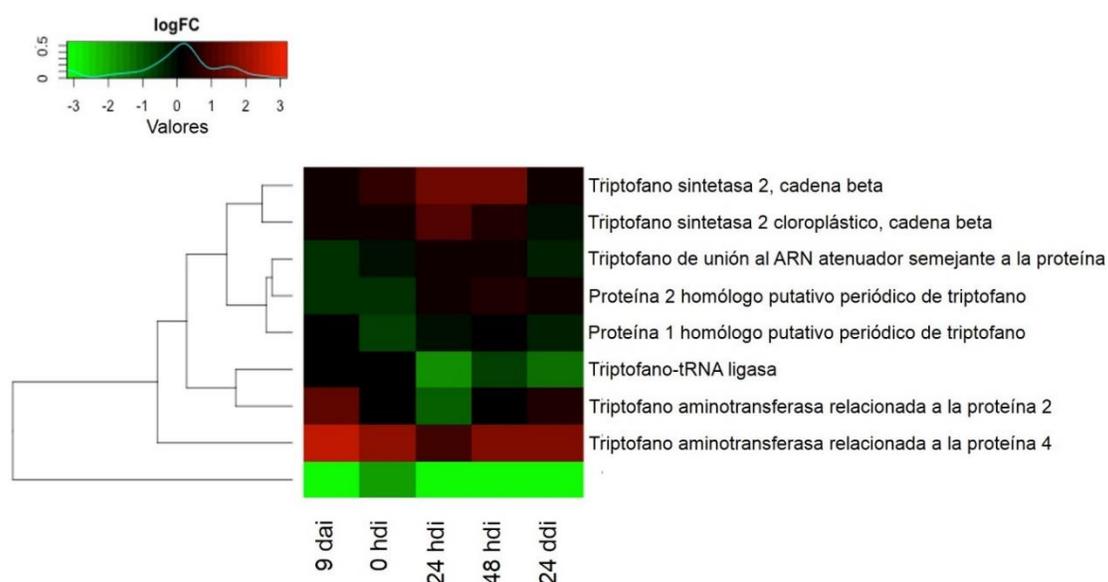


Figura 2.8 Metabolismo del triptofano en *C. canephora*. Expresión diferencial de los genes cuyos productos se encuentran involucrados en la biosíntesis del Trp durante el pre-tratamiento e inducción de la ES. La expresión se comparó con respecto al día -14 (dai = días antes de la inducción; hdi= horas después de la inducción; ddi = días después de la inducción). El color verde representa la represión de los genes en comparación con el día -14. El color negro representa a los genes se encuentran expresados igual que el día -14 y el color rojo representa la sobre-expresión de los genes comparados con el día -14.

Se realizó un mapa de calor en el cual se muestra la expresión de los genes implicados en el metabolismo del Trp durante el pre-tratamiento de las plántulas y durante la inducción de la ES. La expresión de los genes se comparó con el día -14, ya que es cuando las plántulas se encuentran cultivadas en un medio sin RCV justo antes de ser transferidas al pre-tratamiento.

En este estudio se determinó que nueve genes relacionados con el metabolismo de triptofano se expresaron diferencialmente durante la pre-incubación e inducción de la ES (Fig. 2.8). Entre ellos se encuentran los genes de dos triptofano sintetetas localizadas en el cloroplasto, las cuales están involucradas en la síntesis del Trp a partir de corismato. Uno de los genes se mantiene inducido durante el proceso de inducción de la ES, en tanto que el otro se mantiene reprimido a lo largo del proceso de inducción de la ES. También se determinó la expresión de los genes que codifican a dos triptofano aminotransferasas, las cuales están implicadas en la biosíntesis de auxina; el gen relacionado con la proteína 2 se encuentra inducido durante los primeros días del pre-tratamiento y después se expresa al mismo nivel que en el día -14. Por otro lado, el gen que codifica a la triptofano aminotransferasa relacionada a la proteína 4 se encuentra expresado prácticamente durante todo el periodo de estudio. También se determinó la expresión de otros genes involucrados en la biosíntesis del AIA, como son los miembros de la familia *YUCCA* (Fig. 2.9).

Los genes para dos proteínas CYP4 se expresan durante el proceso en estudio, uno se encuentra reprimido durante el pre-acondicionamiento, en tanto que se expresa durante la inducción de la ES. El segundo gen se encuentra reprimido durante el pre-acondicionamiento y durante la inducción de la ES alcanza los mismos niveles de expresión que el día -14. También se expresan dos *YUCCA1* y ambas se encuentran sobre-expresadas durante la inducción de la ES. Dos genes *YUCCA10* se sobre-expresan durante el pre-acondicionamiento, de los cuales uno de ellos es reprimido a partir de la inducción de la ES, en tanto que el otro es reprimido durante las primeras horas de la inducción de la ES y luego se vuelve a inducir. El otro gen de la familia *YUC* que se determinó fue *YUCCA6*; este gen se induce durante el pre-acondicionamiento y después es reprimido durante la inducción de la ES. Estos datos sugieren, en una primera instancia que la ruta de biosíntesis del AIA que se encuentra activa es la de $\text{Trp} \rightarrow \text{AIP} \rightarrow \text{AIA}$.

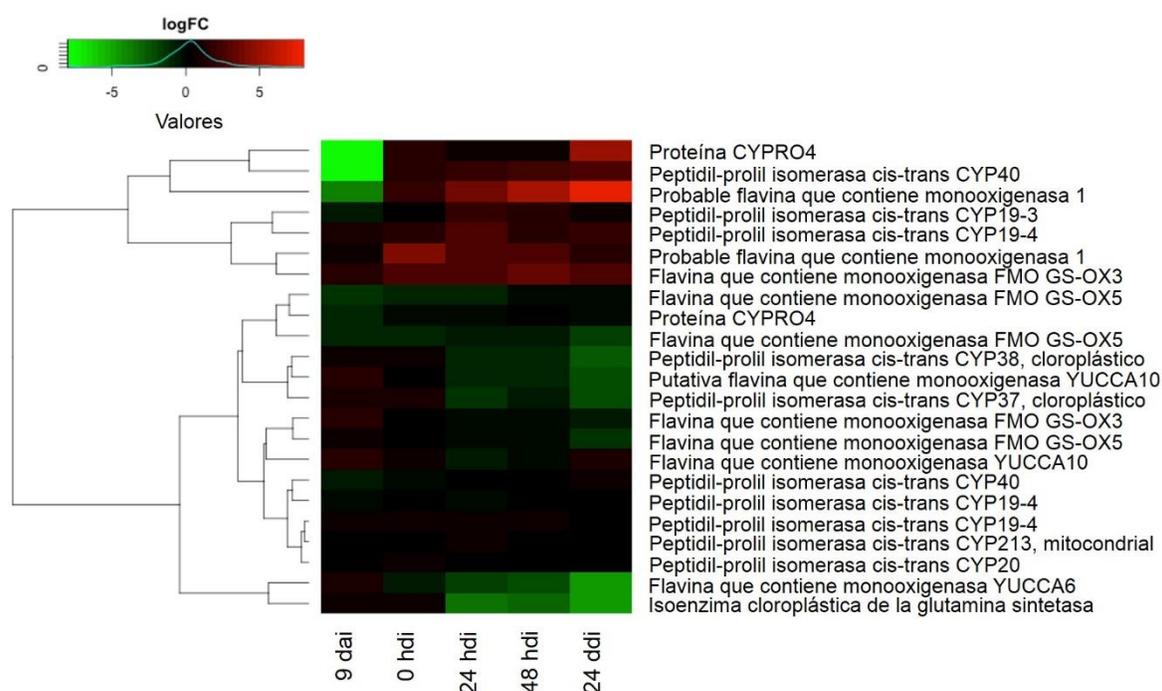


Figura 2.9 Expresión de genes implicados en la biosíntesis de auxina. Expresión diferencial de los genes durante la pre-incubación e inducción de la ES con respecto al día 14 (dai = días antes de la inducción; hdi = horas después de la inducción; ddi = días después de la inducción). El color verde representa la represión de los genes en comparación con el día -14, el color negro representa que los genes se encuentran expresados igual que el día -14 y el color rojo representa la inducción de los genes comparados con el día -14.

2.4 DISCUSIÓN

La ES es un proceso de drásticos cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares por los que tiene que atravesar una célula somática para cambiar su programa genético y desarrollar embriones somáticos. En el caso de *C. canephora*, la inducción de la ES es un proceso que se lleva a cabo en dos pasos. En el primero, las plantas que serán usadas como fuente de explantes, son pre-tratadas en un medio MS adicionando de ANA y KIN. En la segunda etapa, los explantes de las plantas pre-tratadas se colocan en el medio líquido de Yasuda (Yasuda et al., 1985) modificado, en presencia de BA.

En las plantas, la homeostasis del AIA, finalmente la responsable del inicio de la cadena de señalización del AIA es muy compleja, empezando por la biosíntesis del AIA, ya que se conocen cinco rutas para su biosíntesis. Si bien las auxinas fueron el primer RCV identificado, aún se desconoce cuál es la función de cada una de las diferentes vías de su biosíntesis en la fisiología de la planta (Sugawara et al., 2009; Zhao et al., 2002; Hull et al., 2000). Hasta el momento la única vía de biosíntesis del AIA dilucidada en plantas es la del Trp→AIP→AIA en *A. thaliana* (Tao et al., 2008) (Won et al., 2011; Mashiguchi et al., 2011; Stepanova et al., 2011), sugiriendo que los genes *TAA* y *YUC* participan en esta ruta de biosíntesis del AIA.

Es claro que la presencia de ANA durante el pre-tratamiento produce un aumento en el contenido de AIA libre, así como en algunos de sus conjugados (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Nuestros datos muestran claramente que el aumento en la concentración de AIA durante la pre-incubación de las plantas proviene de la biosíntesis *de novo* de este compuesto y que utiliza la ruta que involucra la participación de las enzimas TAA1 y YUCCA.

En esta investigación, mediante el uso de $^{14}\text{C}_3$ -Trp, se obtuvo evidencia que permite sugerir que el AIA que se produce durante el pre-tratamiento en *C. canephora* es por medio de su biosíntesis *de novo* (Fig. 2.1). Claramente la marca radiactiva del Trp aparece en el AIA. Además, el uso de la L-quinurenina, un inhibidor de la TAA1 inhibe la incorporación del Trp en el AIA, sugiriendo que esta enzima está involucrada en la biosíntesis del AIA a partir de Trp (Fig. 2.3). Utilizamos Kyn, porque la evidencia en la literatura muestra que la respuesta a auxina inducida por etileno es reprimida por Kyn.

Por ejemplo, en las mutantes *ctr1-1* y *eto1-2*, las cuales presentaban una sobreproducción de etileno, lo que inhibe el crecimiento de la raíz y el hipocotilo, la Kyn suprime el fenotipo de ambas mutantes, ya que al inhibir la biosíntesis del AIA ahora el hipocotilo y la raíz pueden crecer (Fig. 1.12) (He et al., 2011).

En nuestro experimentos, la Kyn inhibe la ES (Fig. 2.2A). Poniendo en contexto estos tres datos juntos, podemos sugerir que la inducción en la biosíntesis del AIA es inducida por la presencia del ANA y es indispensable para que se lleve a cabo la inducción de la ES.

Por otro lado, el AIA también puede ser liberado de los conjugados con alanina e isoleucina,

contribuyendo de esta manera a la poza de AIA libre. Los datos determinados en esta investigación muestran que una cantidad muy importante del AIA se encuentra conjugado con estos aminoácidos, sugiriendo que en un momento dado pueden contribuir al aumento de la poza total de AIA libre. Sin embargo, la poza mayor de conjugados del AIA es con el ácido glutámico. El AIA que es conjugado con este aminoácido es canalizado a la ruta de degradación.

Los conjugados tienen una homeostasis muy activa durante el pre-tratamiento e inducción de la ES. Su contenido también disminuye en presencia de Kyn, seguramente como consecuencia de la disminución en el contenido de AIA (Figura 2.5 y 2.6). Estos datos sugieren que los conjugados del AIA también están participando de manera muy importante en ambos procesos.

Finalmente, los datos del transcriptoma, en el cual se puede apreciar la dinámica en la expresión de varios genes involucrados, tanto en el metabolismo del triptofano (Figura 2.9) encontrándose 9 genes que se expresan diferencialmente durante la pre-incubación e inducción de la ES. Asimismo se identificaron 23 genes expresados diferencialmente relacionados a la biosíntesis del AIA (Figura 2.10), que confirman el papel central que tiene la concentración endógena del AIA durante el pre-tratamiento y la inducción de la ES en *C. canephora*.

CAPÍTULO III

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSIONES

- La Kyn disminuye de manera importante la ES en *C. canephora* aún en la dosis más baja.
- El DMSO también interfiere en la inducción de la ES en *C. canephora*.
- Se encontró AIA marcado radiactivamente después de incubar las plántulas de *C. canephora* en presencia de $^{14}\text{C}_3\text{-Trp}$.
- No se encontró AIA marcado radiactivamente en presencia de un inhibidor de biosíntesis del AIA en las plántulas incubadas de *C. canephora* en presencia de $^{14}\text{C}_3\text{-Trp}$.
- La síntesis del AIA es necesaria para la inducción de la ES de *C. canephora*.
- En presencia del inhibidor Kyn, no se detectaron conjugados del AIA con leucina y se encontraron niveles bajos del aminoácido alanina en las plántulas de *C. canephora*. Por el contrario, se detectaron niveles elevados de los conjugados del AIA con los ácidos glutámico y aspártico.
- A pesar de la necesidad de la presencia de una auxina exógena para la inducción de la ES, los explantes producen cantidades sustanciales de la auxina endógena, AIA.

3.2 PERSPECTIVAS

- Deberá encontrarse un solvente menos agresivo para repetir los experimentos en presencia del inhibidor.
- Deberá estudiarse el comportamiento de los genes que codifican a las enzimas que conjugan al AIA para saber cuál aminoácido es su sustrato.
- Deberán caracterizarse las enzimas que hidrolizan a los conjugados del AIA con alanina y con leucina para saber el nivel de especificidad de cada una de estas enzimas a los diferentes conjugados de AIA.
- Los datos del transcriptoma deberán validarse por medio de qPCR para saber cuáles son los genes que están presentes en cada uno de los días del pretratamiento e inducción de la ES en *C. canephora*.

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.
- Bieysse, D., A. Gofflot y N. Michaux-Ferrière (1993). Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Canadian Journal of Botany*, 71, 1496-1502.
- Cheng, Y., X. Dai y Y. Zhao (2007). Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19, 2430-2439.
- Curtis, H. (1985). *Biología*, Editorial Medica Panamericana, Argentina. 1255 p.
- Dublin, P. (1981). Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25, 237-242.
- Dublin, P., (1991). Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao, en: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*, Roca, W. M. y L. A. Mroginski, (eds). Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. pp. 577-619.
- Fuentes-Cerda, C. F. J., M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2001). Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by nitrogen source. *Biotechnology Letters*, 23, 1341-1343.
- Hatanaka, T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida y T. Yamaguchi (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Reports*, 10, 179-182.
- He, W., J. Brumos, H. Li, Y. Ji, M. Ke, X. Gong, Q. Zeng, W. Li, X. Zhang, F. An, X. Wen, P. Li, J. Chu, X. Sun, C. Yan, N. Yan, D. Y. Xie, N. Raikhel, Z. Yang, A. N. Stepanova, J. M. Alonso y H. Guo (2011). A small-molecule screen identifies L-kynurenine as

- a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23, 3944-3960.
- Hull, A. K., R. Vij y J. L. Celenza (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 2379-2384.
- Jones, R., H. Ougham, H. Thomas y S. Waaland (2013). *The molecular life of plants*, John Wilry & Sons, Malaysia. 742 p.
- Liu, X., A. Hegeman, G. Gardner y J. Cohen (2012). Protocol: High-throughput and quantitative assays of auxin and auxin precursors from minute tissue samples. *Plant Methods*, 8, 31.
- Ljung, K., R. P. Bhalerao y G. Sandberg (2001). Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28, 465-474.
- Ludwig-Muller, J., A. Vertocnik y C. D. Tow (2005). Analysis of indole-3-butyric-acid induced adventitious root formation on *Arabidopsis* stem segments. *Journal of Experimental Botany*, 56, 2095-2105.
- Mano, Y. y K. Nemoto (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2853-2872.
- Mashiguchi, K., K. Tanaka, T. Sakai, S. Sugawara, H. Kawaide, M. Natsume, A. Hanada, T. Yaeno, K. Shirasu, H. Yao, P. McSteen, Y. Zhao, K.-I. Hayashi, Y. Kamiya y H. Kasahara (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 18512-18517.
- Michalczuk, 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.
- Neuenschwander, B. y T. W. Baumann (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 10, 608-612.
- Nishimura, T., K. i. Hayashi, H. Suzuki, A. Gyohda, C. Takaoka, Y. Sakaguchi, S. Matsumoto, H. Kasahara, T. Sakai, J. i. Kato, Y. Kamiya y T. Koshiba (2014). Yucasin is a potent inhibitor of YUCCA, a key enzyme in auxin biosynthesis. *The Plant Journal*, 77, 352-366.
- Oliva, M., E. Farcot y T. Vernoux (2013). Plant hormone signaling during development: insights from computational models. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 19-24.
- Parrott, W. A., R. E. Durham y M. A. Bailey, (1995). Somatic embryogenesis in legumes, en: *Biotechnology in agriculture and forestry*. Vol. 31. Somatic embryogenesis and synthetic seed II, Bajaj, Y. P. S., (ed). Springer-Verlag. Berlin. pp. 199-227.
- Petrásek, J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136, 2675-2688.
- Pierson, E. S., A. A. M. Van Lammeren, J. H. N. Schel y G. Staritsky (1983). *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 115, 208-216.
- Prinsen, E., D. Chriqui, F. Vilaine, M. Tepfer y H. Van Onckelen (1994). Endogenous phytohormones in tobacco plants transformed with *Agrobacterium rhizogenes* pRi TL-DNA genes. *Journal of Plant Physiology*, 144, 80-85.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas, (2006). 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.
- Rojas, G. M. (1972). *Fisiología Vegetal Aplicada*, McGraw-Hill, México. 252 p.
- Saini, S., I. Sharma, N. Kaur y P. Pati (2013). Auxin: a master regulator in plant root

- development. *Plant Cell Reports*, 32, 741-757.
- Santana-Buzzy, N., M. E. González, M. Valcárcel, A. Canto-Flick, M. L. Barzaga, M. M. Hernández, C. F. J. Fuentes-Cerda, F. Barahona, J. O. Mijangos Cortés y V. M. Loyola-Vargas (2004). Somatic embryogenesis: A valuable alternative to propagate selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 40, 95-101.
- Santana-Buzzy, N., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos, R. Ku-Cauich, J. O. Mijangos Cortés, L. C. Gutiérrez-Pacheco, A. Canto-Flick, F. R. Quiroz-Figueroa y V. M. Loyola-Vargas (2007). Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 507-520.
- 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.
- Soeno, K., H. Goda, T. Ishii, T. Ogura, T. Tachikawa, E. Sasaki, S. Yoshida, S. Fujioka, T. Asami y Y. Shimada (2010). Auxin biosynthesis inhibitors, identified by a genomics-based approach, provide insights into auxin biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 51, 524-536.
- Söndahl, M. R. y W. R. Sharp (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 81, 395-408.
- Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Botanica Neerlandica*, 19, 509-514.
- Stepanova, A. N., J. Yun, L. M. Robles, O. Novak, W. He, H. Guo, K. Ljung y J. M. Alonso (2011). The Arabidopsis YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *The Plant Cell*, 23, 3961-3973.
- Steward, F. C., H. W. Israel, R. L. Mott, H. J. Wilson y A. D. Krikoriam (1975). Observations on growth and morphogenesis in cultured cells of carrot (*Daucus carota* L.). *Proc. R. Soc. Lond. B*, 273, 33-53.

- Stuart, D. A. y S. G. Strickland (1984). Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. I. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Science Letters*, 34, 165-174.
- Sugawara, S., S. Hishiyama, Y. Jikumaru, A. Hanada, T. Nishimura, T. Koshiba, Y. Zhao, Y. Kamiya y H. Kasahara (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 5430-5435.
- Taiz, L. y E. Zeiger (1991). *Plant Physiology*, The Benjamin/Cummings Publishing, California. 559 p.
- Tao, Y., J. L. Ferrer, K. Ljung, F. Pojer, F. Hong, J. A. Long, L. Li, J. E. Moreno, M. E. Bowman, L. J. Ivans, Y. Cheng, J. Lim, Y. Zhao, C. L. Ballaré, G. Sandberg, J. P. Noel y J. Chory (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133, 164-176.
- Wang, B., J. Chu, T. Yu, Q. Xu, X. Sun, J. Yuan, G. Xiong, G. Wang, Y. Wang y J. Li (2015). Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112, 4821-4826.
- Wildman, S. G., M. G. Ferri y J. Bonner (1947). The enzymatic conversion of tryptophan to auxin by spinach leaves. *Archives of Biochemistry*, 13, 131-144.
- Won, C., X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory y Y. Zhao (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of *Arabidopsis* and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 18518-18523.
- 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

BIBLIOGRAFÍA

(1991). Indole-3-acetic acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. *Science*, 254, 998-1000.

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.

Zhao, Y., A. K. Hull, N. R. Gupta, K. A. Goss, J. Alonso, J. R. Ecker, J. Normanly, J. Chory y J. L. Celenza (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & Development*, 16, 3100-3112.

Zhao, Y. (2014). Auxin biosynthesis. *The Arabidopsis Book*, 12, e0173.