



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Determinación del patrón de expresión de genes  
que codifican para amidohidrolasas de conjugados  
del AIA durante la inducción de la ES en *Coffea  
canephora***

Tesis que presenta

**RANDY NOÉ AVILEZ MONTALVO**

En opción al título de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2015





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 titulado **Determinación del patrón de expresión de genes que codifican para amidohidrolasas de conjugados del AIA durante la inducción de la ES en *Coffea canephora***, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas 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, febrero del 2015.



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

Firma:  \_\_\_\_\_

Nombre: RANDY NOÉ AVILEZ MONTALVO



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 Estudio de la homeostasis del ácido indol acético durante la embriogénesis somática en plantas superiores bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y con financiamiento del CONACyT, número 157014.





## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por haberme permitido trabajar en su laboratorio y por la grandiosa formación que le ofrece a cada estudiante, especialmente en los seminarios. Fue un gusto haber pertenecido a su laboratorio.

A mi comité tutorial y revisor, por sus valiosas preguntas, comentarios, sugerencias y correcciones.

A la M. en C. Rosa María Galaz Ávalos, por ser la mejor técnica de todo el CICY, por el apoyo incondicional, por las charlas, por las risas y por su grandiosa amistad.

A todos los compañeros que conocí en mi paso por el Laboratorio 24 y CICY, especialmente a Hugo Alejandro Méndez Hernández (el dúo de la historia, los líderes de la ES). Mantén el camino amigo mío.

A todo compañero que me apoyó con el desarrollo de alguna técnica, el cuidado del autoclave, préstamo de reactivo y material, etc.

Al CONACYT, por el apoyo económico otorgado durante la realización de esta investigación. Número de becario: **471483**.

Al CICY, por permitirme el uso de sus instalaciones.

Mil gracias a todos.



## DEDICATORIAS

*A mi madre, Maria Isabel Montalvo Navarrete, con todo mi amor. Gracias por heredarme esas ganas de salir adelante siempre. Mi mayor ejemplo de vida eres tú. Nunca dejes de sonreír, esa luz en tu carita es el mejor regalo para mi alma.*

*A mi hermano, Johny Rafael Avílez Montalvo, con todo mi amor. Siempre contarás con mi apoyo. Cuida bien a tu familia.*

*A mi mejor amiga y compañera de vida, Jaqueline Guadalupe Carrillo Navarrete, gracias por tu existencia y por todo el ánimo que me das cada día. Somos el mejor equipo del mundo mundial. Soy tu fan # 1. Te amo.*

*A mi demás familia, que siempre ha estado al pendiente de mis avances académicos y personales.*

*A mis amigos, a brindar por el aguante.*



---

## ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO I.....	3
ANTECEDENTES .....	3
1.1 CAFETO.....	3
1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES) .....	4
1.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL .....	6
1.5 AUXINAS.....	7
1.5.1 BIOSÍNTESIS DEL ÁCIDO INDOL-3-ACÉTICO .....	8
1.5.2 TRANSPORTE DEL AIA .....	10
1.5.3 CONJUGACIÓN Y DEGRADACIÓN: UNA MANERA DE MANTENER CONSTANTE LOS NIVELES DE AIA LIBRE.....	11
1.5.4 CONJUGACIÓN.....	14
1.5.5 DEGRADACIÓN .....	14
1.5.6 AMIDOHIDROLASAS DE CONJUGADOS DE AUXINA: OTRA VÍA PARA LA OBTENCIÓN DE AIA LIBRE Y OTROS RCV.....	15
1.5.7 RECAPITULACIÓN DE ANTECEDENTES .....	20
HIPOTESIS .....	21
OBJETIVO GENERAL .....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	21
JUSTIFICACIÓN .....	21

---

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22
CAPÍTULO II.....	31
ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y PARTICIPACIÓN DE AMIDOHIDROLASAS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>Coffea canephora</i> . ....	31
2.1 INTRODUCCIÓN .....	31
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	31
2.2.1 MATERIAL VEGETAL .....	31
2.2.2.1 INDUCCIÓN A EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA .....	32
2.2.3 RELACIÓN FILOGENÉTICA .....	32
2.2.4 DISEÑO DE CEBADORES .....	34
2.2.5 MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSCRITOS .....	34
2.2.6 PCR DE LOS GENES ILR1 Cc., ILL6 Cc., IAR3 Cc. ILL3 Cc., ILL2 Cc. ....	36
2.2.6 SECUENCIACIÓN .....	37
2.3 RESULTADOS .....	39
2.3.1 PROCESO DE ES EN <i>COFFEA CANEPHORA</i> .....	39
2.3.2 AISLAMIENTO DE ESTADIOS EMBRIOGÉNICOS.....	40
2.3.3 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	40
2.3.4 CEBADORES.....	53
2.3.5 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL.....	54
2.3.6 SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO.....	56
2.3.7 PERFILES DE EXPRESIÓN DE LOS GENES ILR1 Cc., ILL2 Cc., CcIAR3 Cc., ILL6 Cc. E ILL3 Cc. ....	

---

.....	57
2.3.8 SECUENCIACIÓN.....	63
2.4. DISCUSIÓN.....	68
CAPÍTULO III.....	77
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	77
3.1 CONCLUSIONES.....	77
3.2. PERSPECTIVAS.....	78





---

## LISTADO DE FIGURAS

<b>Figura. 1.1</b> Embriogénesis somática directa e indirecta. Modificado de Quiroz-Figueroa et al. (2006). .....	5
<b>Figura. 1.2</b> Los once diferentes reguladores del crecimiento vegetal. Modificado de Satner et al. (2009). .....	7
<b>Figura. 1.3</b> A. Biosíntesis del precursor del AIA vía la ruta del ácido shikímico. B. Vías biosintéticas del AIA. C. Vías para la conjugación y degradación. Modificado de Ljung (2013). .....	9
<b>Figura. 1.4</b> Esquema del proceso de transporte polar del AIA célula a célula. Modificado de Robert y Friml (2009). .....	10
<b>Figura. 1.5</b> Esquema representativo de las vías conocidas de conjugación y almacenamiento para AIA. Modificado de Chandler (2009). .....	12
<b>Figura. 1.6</b> Familia completa de genes <i>GH3</i> presentes en <i>Arabidopsis thaliana</i> . (Modificado de Wang et al. (2008)). .....	13
<b>Figura. 1.7</b> Descripción de actividades de la primera y segunda parte de la estrategia experimental. ....	23
<b>Figura. 2.1</b> Bases de datos utilizadas para el análisis bioinformático de los genes reportados en esta investigación. ....	34
<b>Figura. 2.2</b> Proceso de ES en <i>C. canephora</i> . .....	39
<b>Figura. 2.3</b> Estadios embriogénicos de <i>C. canephora</i> . .....	40
<b>Figura. 2.4</b> Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 1 de <i>C. canephora</i> mediante el método del vecino más cercano. ....	47
<b>Figura. 2.5</b> Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 2 de <i>C. canephora</i> mediante el método del vecino más cercano. ....	48
<b>Figura. 2.6</b> Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen IAR3 de <i>C. canephora</i> mediante el método del vecino más cercano. ....	49

---

<b>Figura. 2.7</b> Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 5 de <i>C. canephora</i> mediante el método del vecino más cercano.....	50
<b>Figura. 2.8</b> Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 6 de <i>C. canephora</i> mediante el método del vecino más cercano.....	51
<b>Figura. 2.9</b> Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 7 de <i>C. canephora</i> mediante el método del vecino más cercano.....	52
<b>Figura. 2.10</b> Extracción de ARN de los explantes foliares de <i>C. canephora</i> durante el proceso de inducción de la ES.....	55
<b>Figura. 2.11</b> Extracción de ARN de explante foliar de <i>C. canephora</i> durante el proceso de inducción de la ES.....	55
<b>Figura. 2.12</b> Producto de PCR del gen constitutivo de actina y de los días -14 dai, -7 dai y 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi y 21 dpi.....	56
<b>Figura. 2.13</b> Condiciones de PCR para los diversos templados de ADNc con el gen constitutivo que codifica al gen de la actina.....	57
<b>Figura. 2.14</b> Perfil de expresión del gen ILR1 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, día 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi.....	58
<b>Figura. 2.15</b> Perfil de expresión ILL2 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi.....	59
<b>Figura. 2.16</b> Perfil de expresión de IAR3 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi.....	60
<b>Figura. 2.17</b> Perfil de expresión del gen ILL6 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi.....	61
<b>Figura. 2.18</b> Perfil de expresión de ILL3 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi.....	62
<b>Figura. 2.19</b> Alineación del gen completo de <i>C. canephora</i> ILR1 con el resultado de la muestra secuenciada ILR1 y la secuencia ILR1 de la base de datos Sol Genomics Network.....	64

---

<b>Figura. 2.20</b> Alineación del gen completo de <i>C. canephora</i> ILL2 con el resultado de la muestra secuenciada ILL2 y la secuencia ILL2 de la base de datos Sol Genomics Network.....	65
<b>Figura. 2.21</b> Alineación del gen completo de <i>C. canephora</i> IAR3 con el resultado de la muestra secuenciada IAR3 y la secuencia IAR3 de la base de datos Sol Genomics Network.....	66
<b>Figura. 2.22</b> Alineación del gen completo de <i>C. canephora</i> ILL6 con el resultado de la muestra secuenciada ILL6 y la secuencia ILL6 de la base de datos Sol Genomics Network.....	67
<b>Figura. 2.23</b> Participación de las amidohidrolasas en el proceso de preacondicionamiento (color rosa) e inducción a ES en <i>C. canephora</i> (color verde claro). .....	70
<b>Figura. 2.24</b> Modelo representativo de las regulaciones endógenas de AIA mediada por su conjugación y la posible hidrólisis de conjugados durante la embriogénesis somática en <i>C. canephora</i> . Proceso de pre-acondicionamiento (rojo claro) y proceso de inducción (verde claro)..	72



---

## LISTADO DE CUADROS

<b>Cuadro 1. 1</b> Hidrolasas y especificidad de sustrato en <i>Arabidopsis thaliana</i> y otras especies.....	16
<b>Cuadro 1. 2</b> Amidohidrolasas presentes en <i>Brassica rapa</i> y su especificidad de sustrato. ....	19
<b>Cuadro 1.3</b> Amidohidrolasas presentes en <i>Medicago truncatula</i> y su especificidad de sustrato....	20
<b>Cuadro 2. 1</b> Búsqueda de ortólogos de los genes que codifican a las hidrolasas de los conjugados del AIA.....	41
<b>Cuadro 2. 2</b> Número total de posibles hidrolasas en las especies utilizadas en este trabajo. ....	43
<b>Cuadro 2. 3</b> Especies y números de accesoión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-1. ....	43
<b>Cuadro 2. 4</b> Especies y números de accesoión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-2. ....	44
<b>Cuadro 2. 5</b> Especies y números de accesoión de las secuencias utilizadas para el árbol <i>ILR1</i> like-4. ....	44
<b>Cuadro 2. 6</b> Especies y números de accesoión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-5. ....	45
<b>Cuadro 2. 7</b> Especies y números de accesoión de las secuencias utilizadas para el árbol <i>ILR1</i> like-6. ....	45
<b>Cuadro 2. 8</b> Especies y números de accesoión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-7. ....	46
<b>Cuadro 2. 9</b> Cebadores para los genes <i>ILR1</i> , <i>ILL2</i> , <i>ILL3</i> , <i>IAR3</i> e <i>ILL6</i> . ....	53



---

## ABREVIATURAS

ANA	Ácido naftalén-1-acético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AIA	Ácido indol-3-acético
AIA-Ala	Ácido indol-3-acético-alanina
AIA-Asn	Ácido indol-3-acético-asparagina
AIA-Asp	Ácido indol-3-acético-ácido aspártico
AIA-Glu	Ácido indol-3-acético-ácido glutámico
AIA-Gly	Ácido indol-3-acético-glicina
AIA-Leu	Ácido indol-3-acético-leucina
AIA-Tyr	Ácido indol-3-acético-tirosina
AIA-Val	Ácido indol-3-acético-valina
AIB	Ácido indol-3-butírico
AIB-Ala	Ácido indol-3-butírico-alanina
AIB-Gly	ácido indol-3-butírico-glicina
AIP	Ácido indol-3-pirúvico
ARN	Ácido ribonucleico
BA	Benciladenina
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
DEPC	Dietilpirocarbonato
dpi	Días posteriores a la inducción
dai	Días anteriores a la inducción
EC	Embriogénesis cigótica
ES	Embriogénesis somática
EST	Expressed Sequence Tag
GH3	Gretchen Hagen-3
IAR3	Indol 3-acetic acid alanine resistant
ILL1	Indol 3-acetic acid leucine resistant like-1
ILL2	Indol 3-acetic acid leucine resistant-like 2
ILL3	Indol 3-acetic acid leucine-resistant-like 3
ILL5	Indol 3-acetic acid leucine-resistant-like 5
ILR1	Indol 3-acetic acid leucine-resistant 1
IAOx	Indol-3- acetaldoxima
IPA-Ala	Ácido indol-3-propiónico-alanina
AJ	Ácido jasmónico
KIN	Cinetina
MS	Murashige & Skoog
NCBI	National Center for Biotechnology

---

PCR	Information
RCV	Polymerase Chain Reaction
rpm	Reguladores del crecimiento vegetal
	Revoluciones por minuto



---

## RESUMEN

El almacenamiento de AIA a través de su conjugación reversible con aminoácidos es uno de los procesos que orquestan su homeostasis. De acuerdo con los diversos requerimientos fisiológicos, puede recuperarse AIA libre a partir de sus conjugados. Esta recuperación es mediada por miembros de la familia ILR de amidohidrolasas. Para este estudio se utilizó el sistema de embriogénesis somática en *Coffea canephora*, analizando desde la etapa de precondicionamiento hasta la de inducción. En este trabajo se determinó la participación de por lo menos cuatro amidohidrolasas. Cada integrante presenta una expresión de transcritos en particular, su expresión aumenta durante las primeras horas y días posteriores al proceso de inducción de la embriogénesis somática. También se realizó el análisis filogenético de los seis genes de la familia de amidohidrolasas presentes en el genoma de *C. canephora*. Se determinó que el gen *IAR3* es el miembro más conservado de esta familia comparado con los demás miembros de esta familia de amidohidrolasas en diversas especies de plantas eudicotiledóneas y *O. sativa*. Los resultados de este estudio sugieren que la participación de las amidohidrolasas, durante el proceso de embriogénesis somática en *C. canephora*, es esencial para recuperar la homeostasis del AIA desde el precondicionamiento hasta la inducción.

---



---

## ABSTRACT

The storage of indole-3-acetic acid (IAA) through its reversible conjugation with amino acids is one of the processes that orchestrate its IAA homeostasis. According to the plant physiological requirements, IAA can be recovered from IAA-amino acid conjugates. This recovery is mediated by members of the ILR amidohydrolases family. We used the system of somatic embryogenesis of *Coffea canephora* as a model, and we analyzed the expression of the ILR genes from the preconditioning to the induction steps. In this work, the participation of at least four amidohydrolases was determined. Each studied gene has a particular expression pattern. Most of them increase its expression during the first hours of induction of the somatic embryogenesis. Phylogenetic analysis of the six amidohydrolases genes present in the *C. canephora* genome was also performed. IAR3 gene is the most conserved member of this family in comparison with the other members of this amidohydrolases family in several eudicot plant species and *O. sativa*. The results of this study suggest that the participation of amidohydrolases in the process of somatic embryogenesis in *C. canephora* is essential to restore the homeostasis of IAA from the preconditioning to the induction process.

---



## INTRODUCCIÓN

El estudio de la homeostasis abarca la comprensión de cuatro grandes procesos (biosíntesis, transporte, almacenamiento y degradación) que actúan conjuntamente, para lograr un correcto funcionamiento del crecimiento y el desarrollo celular. Una alteración en la homeostasis, por pequeña que sea, desencadena una respuesta inmediata para mantener la concentración endógena de la sustancia en cuestión a la concentración requerida.

De acuerdo con estudios previos, aproximadamente el 90% de la concentración endógena del ácido-3-indol acético (AIA) en plantas superiores se encuentra almacenada de forma inactiva, es decir, se encuentra conjugada ya sea a carbohidratos, aminoácidos o proteínas. En diferentes estadios del desarrollo, durante los cuales la planta requiere un aporte en la concentración de AIA, los conjugados del AIA con aminoácido (AIA-aa) son hidrolizados por enzimas que convierten a los conjugados a AIA y amino ácidos libres. Estas proteínas son codificadas por genes de la familia *ILR* (*IAA-Leucine-Resistant*).

El objetivo de esta investigación es aplicar dicho concepto al proceso de embriogénesis somática (ES) en *Coffea canephora*, con el fin de contribuir al conocimiento del papel de la concentración endógena del AIA durante los primeros estadios de desarrollo del proceso embriogénico. Para ello, en este trabajo se determinará el papel de la hidrólisis de dos de los conjugados del AIA, su conjugado con alanina y su conjugado con leucina (AIA-Ala y AIA-Leu).



## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1.1 CAFETO

El cafeto pertenece a la familia *Rubiaceae*, del género *Coffea*, del cual existen al menos 80 especies, y es uno de los productos agrícolas más importantes del mundo. Las economías de algunos países de América, Asia y África dependen de su cultivo, principalmente por sus dos especies más importantes, *Coffea arábica* (Arabica) y *Coffea canephora* (Robusta) (Vinod et al., 2006), que representan un 75 y 25% respectivamente de las ventas en el mercado (Etienne, 2005).

*C. arábica* se cultiva en regiones tropicales de gran altitud (de 500 a 2500 m). Es la única especie tetraploide ( $2n = 4x = 44$  cromosomas) y autógama del género *Coffea*; además, produce un café de alta calidad, con un bajo contenido en cafeína. Por su parte *C. canephora* se le cultiva en regiones bajas (de 0 a 100 m), es un especie diploide ( $2n = 2x = 22$  cromosomas) y alógama que produce un café con alto contenido de cafeína (Etienne, 2005).

El mejoramiento del cafeto, utilizando métodos convencionales conlleva a un proceso que puede tomar aproximadamente de 25 a 35 años para obtener una nueva variedad, lo que resulta en una producción y distribución insuficiente para satisfacer las necesidades de los productores (Vinod et al., 2006).

#### 1.2 CULTIVO DE TEJIDOS

Convencionalmente, el cafeto es propagado por semilla o por esquejes (Vinod et al., 2006). Un método con el cual puede obtenerse un mayor número de plantas es la propagación mediante el cultivo de tejidos vegetales in vitro (Hatanaka et al., 1991).

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un conjunto de técnicas para el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes, bajo condiciones físicas y químicas definidas in vitro y en un ambiente controlado (Loyola-Vargas et al., 2008). Los métodos de cultivo

vegetales permiten la producción relativamente uniforme de plantas a mayor escala y producidas en un menor tiempo (Vinod et al., 2006).

La propagación de plantas se puede llevar a cabo por tres vías: mediante brotes preexistentes o meristemas encaminados a crecer y proliferar, la morfogénesis de los brotes y mediante ES (George, 2008). Varias de estas opciones tienen como base la totipotencialidad de las células vegetales, es decir, la capacidad de generar embriones o plantas completas a partir de células vegetales diferenciadas (Vasil y Vasil, 1972), (Srivastava, 2002).

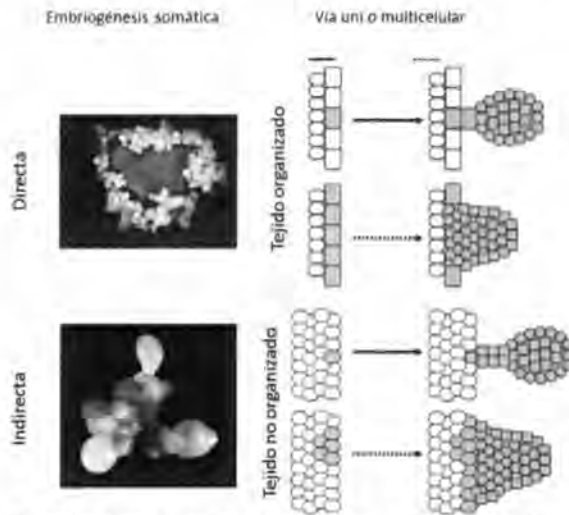
### **1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA (ES)**

La embriogénesis somática describe el desarrollo mediante el cual células somáticas, pasando por una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares resultan en estructuras similares, en apariencia, a las estructuras de embriones cigóticos (Neumann et al., 2009; Quiroz-Figueroa et al., 2006); además, representa de una manera más definida los estadios del ciclo de vida de una planta, mostrando todo el patrón de un organismo maduro establecido en un periodo de tiempo relativamente corto (Vinod et al., 2006). En contraparte, la embriogénesis cigótica (EC) se refiere a las estructuras producidas mediante la fusión de los gametos masculino y femenino. En cierta forma el desarrollo de los embriones somáticos asemeja al desarrollo de embriones cigóticos.

Existen dos vías para la realización de la ES: la ES directa y la ES indirecta (Figura 1.1). La primera se refiere a la formación de embriones somáticos en los explantes sin pasar por la fase de formación de callo, y la segunda se refiere a la generación de los embriones somáticos a partir de tejidos no organizados, tanto callos como suspensiones celulares (George, 2008).

El requerimiento esencial, para inducir la ES, es contar con células competentes, que a su vez cuenten con un ambiente adecuado, para que a partir de esto inicie su formación mediante un estímulo. Los embriones somáticos pueden desarrollarse, dependiendo del tipo de investigación, en medio líquido o semi-sólido; algunas especies pueden formar embriones en ambas condiciones (Thorpe y Stasolla, 2001).





**Figura. 1.1** Embriogénesis somática directa e indirecta. Modificado de Quiroz-Figueroa et al. (2006).

La ES obtenida en el café no está limitada al hecho de obtener una rápida y eficaz micropropagación, sino que puede ser utilizada como una herramienta para entender las bases genéticas y moleculares de la formación de los embriones somáticos (Etienne, 2005) (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Así, la ES nos provee de un modelo para el estudio del desarrollo embriogénico en las plantas superiores (Quiroz-Figueroa et al., 2006); sin embargo, los mecanismos bioquímicos y moleculares que regulan la ES permanecen en gran medida desconocidos (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Se sabe que los RCV, tanto endógenos como exógenos, así como el origen del explante, juegan un rol crucial durante el proceso de ES en toda clase de genotipo (Vinod et al., 2006).

La inducción del proceso de ES necesita un medio de cultivo que contenga auxina(s); sin embargo, el desarrollo de los embriones usualmente solo se da cuando la concentración de auxina es reducida o eliminada del medio de cultivo (Machakova et al., 2008; Ribnicky et al., 1996). En nuestro laboratorio, el análisis de la concentración endógena del AIA en el proceso de ES en *C. canephora* exhibe este mismo patrón. Además, se ha determinado que el nivel endógeno del AIA, tanto libre como conjugado a aminoácidos, es crucial para el proceso de la ES (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

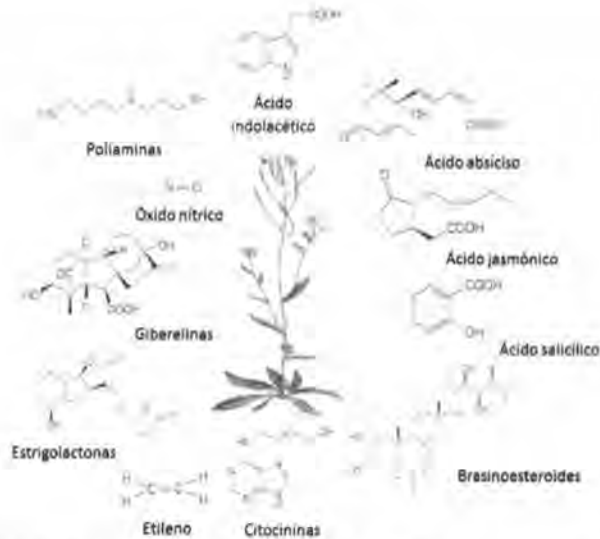
La elección de las auxinas y la concentración empleada depende de:

- El tipo de crecimiento y desarrollo requerido.
- El grado de asimilación y transporte de la auxina aplicada al tejido.
- La inactivación (oxidación/conjugación) de la auxina en el medio y en el explante.
- Los niveles naturales y la síntesis endógena en el explante.
- La sensibilidad del tejido a la auxina (y otros RCV).
- La interacción entre auxinas aplicadas y las sustancias naturales endógenas.

### **1.4. REGULADORES DE CRECIMIENTO VEGETAL**

Para el establecimiento de cultivos vegetales, el medio de cultivo debe contener, por lo general, reguladores del crecimiento vegetal (RCV) (Mroginski et al., 2010). Éstos se pueden definir como compuestos orgánicos (diferentes a los nutrientes) de baja masa molecular que se producen endógenamente y que pueden promover, inhibir o modificar el desarrollo de la planta, teniendo en cuenta su naturaleza o arreglo de su molécula y que son añadidas en pequeñas cantidades que abarcan el orden micromolar o incluso menor.

Estas sustancias se encuentran involucradas en todos los procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta, ya que tienen una función regulatoria en lugar de una función nutricional o de crecimiento (Machakova et al., 2008). Hasta la fecha se encuentran descubiertos once tipos diferentes de RCV vegetal (Figura 1.2).



**Figura. 1.2** Los once diferentes reguladores del crecimiento vegetal. Modificado de Satner et al. (2009).

## 1.5 AUXINAS

Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) más ampliamente estudiados son las auxinas. Una de las características importantes de estos RCV es que se encuentran divididas en dos grandes grupos: las auxinas naturales y las auxinas sintéticas. Solamente existen cuatro auxinas naturales: el AIA, el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 4-cloroindol-3-acético y el ácido fenilacético; entre las auxinas sintéticas podemos encontrar al ácido 2,4-diclorofenoxiacético, al ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico y al ácido naftalén-1-acético (ANA).

A nivel planta, las auxinas se encuentran involucradas en una gran cantidad de funciones fisiológicas y de desarrollo, tales como el gravitropismo y el fototropismo, entre otras. A nivel celular, las auxinas controlan niveles básicos como la división celular, la elongación celular y la ES (Perrot-Rechenmann, 2010). A pesar de todos estos descubrimientos solo se conoce parte del mecanismo de acción de las auxinas, así como su síntesis y distribución dentro de la planta (Ljung et al., 2001). El AIA es la auxina natural endógena mayormente estudiada (Eckardt, 2001).

Con base en la diferente distribución de AIA dentro del tejido, es de suponer que existe una diferencia en la concentración de AIA entre células individuales y las células que las rodean (Vanneste y Friml, 2009). Desde este punto de vista, la concentración celular de AIA puede ser mediada por una serie de ajustes dinámicos y mecanismos regulatorios que mantienen un estado estable en la concentración endógena ante alguna alteración; estos mecanismos son su biosíntesis, transporte, conjugación y degradación, que en conjunto orquestan el desarrollo vegetal y se le describe con la palabra homeostasis (Woodward y Bartel, 2005). La homeostasis del AIA permite el crecimiento, el desarrollo vegetal y la adaptación ante un amplio rango de estímulos ambientales (Perrot-Rechenmann, 2010; Ljung et al., 2002). Estas diferentes vías conllevan a diferentes grados de producción de auxinas, en diferentes especies de plantas y en diferentes estadios de desarrollo (Vanneste y Friml, 2009).

### 1.5.1 Biosíntesis del ácido indol-3-acético

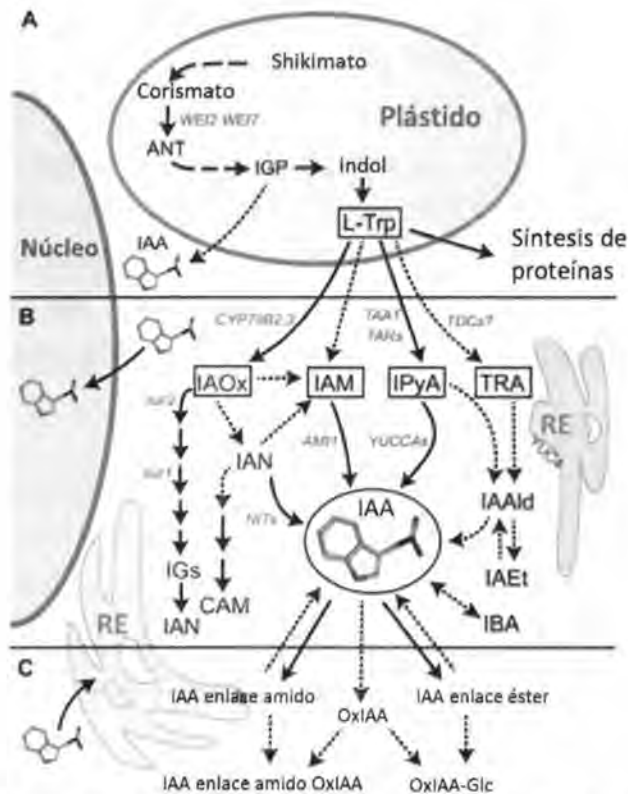
Como se mencionó con anterioridad, uno de los procesos involucrados en la homeostasis del AIA es la biosíntesis. La biosíntesis de novo de las auxinas juega un papel muy importante en varios procesos de desarrollo, y la comprensión de este mecanismo nos puede proveer de herramientas que ayuden a responder varias preguntas relacionadas con el desarrollo, ya que los mecanismos exactos y ubicaciones celulares de la biosíntesis de auxinas permanecen relativamente desconocidos.

El aminoácido indólico, triptofano (Trp), es uno de los dos precursores del AIA. En este caso la biosíntesis puede darse a través de cuatro vías:

A) La vía del ácido indol-3-pirúvico (AIP), la cual inicia con la transaminación de Trp catalizada por la enzima triptofano transaminasa, cuyo producto es el indol piruvato; este compuesto es convertido en indol 3-acetaldehído a través de la AIP descarboxilasa y por último el AIA es producido a partir de este aldehído mediante hidrogenación, una reacción catalizada por la indol 3-acetaldehído deshidrogenasa (Figura 1.3).

Otra vía es la ruta de la indol 3-acetaldoxima (IAOx), que también inicia con el Trp y es mediada por una enzima dependiente de citocromo P450. Posteriormente se produce indol 3-acetonitrilo y por último el AIA es obtenido a través de una hidrólisis mediada por una nitrilasa.

La vía de la triptamina, involucra una descarboxilación de Trp a triptamina por la triptófano descarboxilasa, seguida por su conversión a indol 3-acetaldehído a través de un amino oxidasa. Por acción de la indol-3-acetaldehído deshidrogenasa es convertido en AIA.

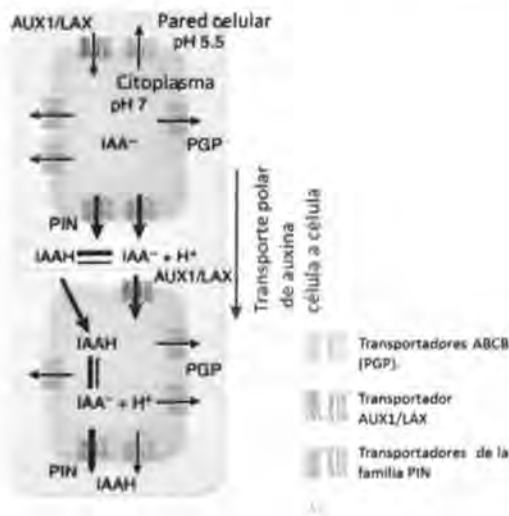


**Figura. 1.3** A. Biosíntesis del precursor del AIA vía la ruta del ácido shikímico. B. Vías biosintéticas del AIA. C. Vías para la conjugación y degradación. Modificado de Ljung (2013).

La vía de la indol 3-acetoamida o la vía del AIP son las principales rutas para la síntesis de AIA en plantas; sin embargo, algunas plantas de las *Brassicaceae* presentan una ruta particular de biosíntesis del AIA (Mano y Nemoto, 2012). A pesar de que diferentes especies vegetales presenten modificaciones y estrategias para llevar a cabo sus rutas metabólicas, es razonable pensar que las plantas compartan una zona conservada en la evolución involucrando el mecanismo de biosíntesis de auxinas, ya que el AIA es fundamental en el ciclo de vida de las plantas (Mano y Nemoto, 2012).

### 1.5.2 Transporte del AIA

Como parte de la homeostasis del AIA, el transporte es un proceso fundamental que durante años, y con base en el transcurrir de descubrimientos, ha ido cambiando del modelo quimiosmótico al mecanismo de transporte activo mediado por los transportadores tipo PIN y los transportadores tipo ABC. En el modelo quimiosmótico se propone que debido a las diferencias de pH entre el citoplasma (7.0) y el espacio intercelular (5.5), y al pKa del AIA (4.76), una parte del AIA (la forma protonada, o sin carga) puede entrar a la célula en forma pasiva a través de la membrana. La parte del AIA desprotonada (base conjugada) requiere un transportador especial. Para salir de la célula, el AIA requiere los transportadores específicos mencionados líneas arriba (Figura 1.4). Los transportadores tipo PIN contribuyen de manera esencial al transporte polar de las auxinas en las plantas.



**Figura. 1.4** Esquema del proceso de transporte polar del AIA célula a célula. Modificado de Robert y Friml (2009).

De acuerdo con esto, se puede dividir este proceso en dos grandes conceptos importantes: el transporte como tal y su distribución. En el primer caso, se debe a que el transporte del AIA se puede dar, tanto en sentido acropetal como basipetal (Friml et al., 2002). En el segundo caso se debe a que la distribución del AIA puede presentarse en diferentes concentraciones, dependiendo de la posición de la célula y de su destino (Ljung et al., 2001).



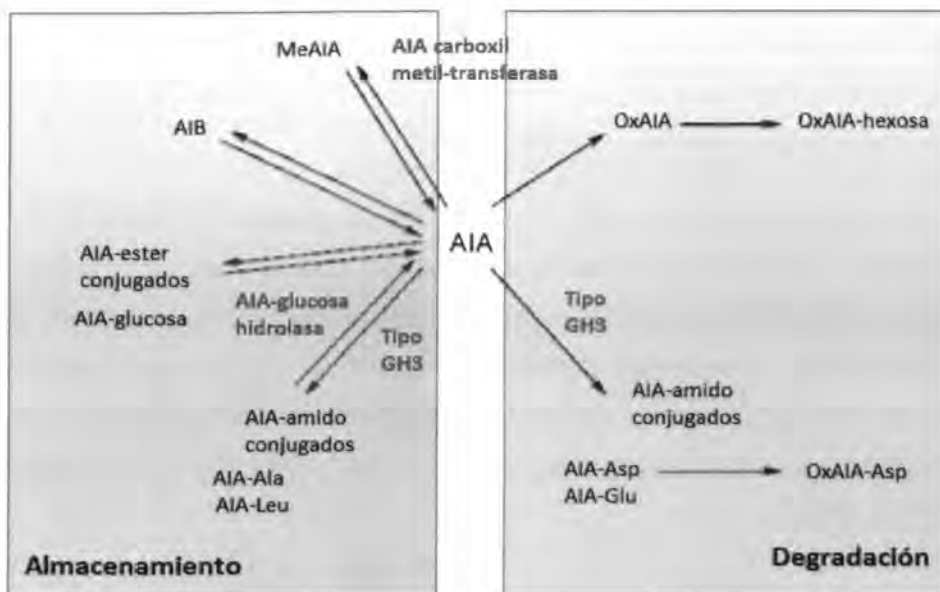
---

### **1.5.3 Conjugación y degradación: una manera de mantener constante los niveles de AIA libre.**

Las plantas son capaces de ajustar el nivel de RCV endógenos, principalmente el AIA, y con esto controlar su proceso de crecimiento y desarrollo a través de las condiciones ambientales cambiantes (Seidel et al., 2006).

Parte esencial de la homeostasis del AIA es su conjugación. Diversos estudios han mostrado que, en promedio, alrededor de 95% del AIA que se encuentra en una planta está en forma conjugada (Campanella et al., 2003a). Esto es muy relevante porque solamente el AIA en su forma libre es biológicamente activo. El AIA se puede conjugar principalmente con aminoácidos y carbohidratos. Dependiendo del compuesto con el que se conjuga el AIA puede volver a su forma activa o ser enviado para su degradación (Staswick et al., 2005).

El modelo general para la homeostasis del AIA incluye su almacenamiento y degradación (Figura 1.5); en el primer caso, el AIA libre puede obtenerse cuando se encuentra conjugado a los aminoácidos alanina o leucina (AIA-Ala, AIA-Leu). En el segundo caso, la conjugación a aminoácidos como los ácidos aspártico o glutámico (AIA-Asp, AIA-Glu), los cuales llevan al AIA a su ruta de degradación (Ljung et al., 2002).



**Figura. 1.5** Esquema representativo de las vías conocidas de conjugación y almacenamiento para AIA. Modificado de Chandler (2009).

Las enzimas que conjugan al AIA con los diferentes aminoácidos son codificadas por miembros de la familia de genes *GH3* (González-Lamothe et al., 2012). Estos genes son inducidos por auxinas. Una simple explicación de por qué los genes *GH3* son inducidos por auxinas es que éstos proporcionan un mecanismo a las plantas para hacer frente a la presencia de exceso de auxina (Staswick et al., 2005).

La familia de los genes *GH3* consiste de 19 miembros en *Arabidopsis thaliana*, de los cuales, al menos 7 (*GH3.2*, *GH3.3*, *GH3.4*, *GH3.5*, *GH3.6*, *GH3.9* y *GH3.17*) son capaces de catalizar la síntesis de amido conjugados del AIA, y pertenecen al grupo II de genes *GH3* (Wang et al., 2008; Staswick et al., 2002) (Figura 1.6). Algunos de estos conjugados pueden directa o indirectamente influir sobre las vías de señalización a manera que alteren el crecimiento y desarrollo normal de la planta cuando son acumuladas en exceso (Staswick et al., 2005).



GH3	Código de gen	Cromosoma	Grupo (s)	Sustrato de adenilación	Sinónimos
AtGH3-1	At2g14960	2	II	NT	
AtGH3-2	At4g37390	4	II	IAA	YDK1
AtGH3-3	At2g23170	2	II	IAA	
AtGH3-4	At1g59500	1	II	IAA	
AtGH3-5	At4g27260	4	II	IAA, SA	AtGH3a/WES1
AtGH3-6	At5g54510	5	II	IAA	DPL1
AtGH3-7	At1g23160	1	III	(-)	
AtGH3-8	At5g51470	5	III	(-)	
AtGH3-9	At2g47750	2	II	IAA	
AtGH3-10	At4g03400	4	I	(-)	DPL2
AtGH3-11	At2g46370	2	I	JA	FIN219/JAR1
AtGH3-12	At5g13320	5	III	(-)	PBS3/GDG1
AtGH3-13	At5g13350	5	III	NT	
AtGH3-14	At5g13360	5	III	NT	
AtGH3-15	At5g13370	5	III	(-)	
AtGH3-16	At5g13380	5	III	NT	
AtGH3-17	At1g28130	1	II	IAA	
AtGH3-18	At1g48670	1	III	(-)	
AtGH3-19	At1g48660	1	III	(-)	
AtGH3-20/ Truncada	At1g48690	1	III	(-)	

**Figura. 1.6** Familia completa de genes *GH3* presentes en *Arabidopsis thaliana*. (Modificado de Wang et al. (2008).

En otras especies la familia de genes *GH3* tiene un distinto número de miembros, tal es el caso de *Carica papaya* (6), *Vitis vinifera* (8), *Zea mays* (13), *Oryza sativa* (13), *Populus trichocarpa* (13), *Mimulus guttatus* (10) y *Aquilegia coerulea* (6) (Okrent y Wildermuth, 2011).

Todos los datos disponibles sugieren que la especificidad de las enzimas codificadas por los genes *GH3* varía desde muy específica para un sustrato a inespecífica y capaz de utilizar varios sustratos. Los diferentes miembros de la familia *GH3* pueden tener diferentes funciones en los tejidos. Su mecanismo de acción modula las respuestas de desarrollo de las plantas o de su defensa (González-Lamothe et al., 2012). Sin embargo, aún no entendemos el mecanismo completo de su función (Staswick et al., 2005).

#### 1.5.4 Conjugación

Un componente de la homeostasis de las auxinas es la conjugación del AIA. Un conjugado, es un compuesto en el cual la auxina se une covalentemente a otras sustancias de baja masa molecular, y pierde su actividad fisiológica (Machakova et al., 2008), como el caso de las formas conjugadas del AIA (Campanella et al., 2004). Además de la regulación de la síntesis de auxinas o de su degradación, las plantas pueden almacenar auxinas en la forma de conjugados (Bajguz y Piotrowska, 2009; Woodward y Bartel, 2005), la conjugación de AIA es un proceso que comparten las plantas y ocurre rápidamente en el tejido cuando la homeostasis se ve afectada (Bajguz y Piotrowska, 2009).

Alrededor del 90% del AIA producido endógenamente en las plantas se encuentra conjugado. Los amido conjugados son originados por la formación de enlaces entre auxinas (sean naturales o sintéticas) y aminoácidos, tales como aspartato, glutamato, alanina, leucina, glicina, valina, entre otros. Los enlaces éster involucran componentes de varios isómeros de la *O*-indol-3-acetil- $\beta$ -D-glucopiranososa, indol-3-acetil-mioinositol y indol-3-acetilglucosil-ramnosa (Machakova et al., 2008).

A pesar del hecho de que los conjugados del AIA son los que juegan un papel mayor en la homeostasis de las auxinas, sólo algunos de ellos han sido identificados en los tejidos vegetales (Seidel et al., 2006; Tam et al., 2000).

Todavía no se ha determinado la función fisiológica de los conjugados, pero la evidencia experimental sugiere que los conjugados de auxina participan en el inicio del desarrollo de la planta (Rampey et al., 2004), el desarrollo vascular, el desarrollo embrionario (Ludwig-Müller, 2011) y la embriogénesis somática (Ayil-Gutiérrez et al., 2013); sin embargo, es de suponer que diferentes conjugados juegan diferentes papeles en el metabolismo del AIA y, por lo tanto, en el desarrollo y la fisiología de la planta (Ljung et al., 2002).

#### 1.5.5 Degradación

Las auxinas, cuando son conjugadas con ciertos aminoácidos son protegidas de una ruptura oxidativa y pueden, más tarde, ser liberadas a través de la acción de enzimas hidrolíticas (Bajguz y Piotrowska, 2009) y, como ya se mencionó, son una eficiente

manera de regular los niveles hormonales endógenos (Bajguz y Piotrowska, 2009; Machakova et al., 2008). El vía de degradación es regulada en respuesta a los elevados niveles de AIA, en tanto que las rutas que llevan a su conjugación son apagadas (Woodward y Bartel, 2005; Bartel et al., 2001).

El proceso de degradación del AIA no ha sido tan estudiado como el proceso de biosíntesis y, por lo tanto, nuestra comprensión al respecto es muy limitada. En *A. thaliana* existe evidencia que sugiere que los conjugados AIA-Asp y AIA-Glu son el inicio de la ruta de degradación del AIA (Ludwig-Müller, 2011). El proceso de degradación es irreversible y puede ser llevado a cabo mediante dos distintas vías: una oxidación descarboxilativa o una oxidación sin descarboxilación. El inicio de la primera ruta es catalizada por una enzima no específica denominada AIA oxidasa/peroxidasa, lo que lleva a la subsecuente formación de productos de degradación tales como el indol 3-metanol y el indol 3-aldehído (Machakova et al., 2008; Ljung et al., 2002). A pesar de estas conclusiones, los mecanismos celulares que controlan la degradación oxidativa aún permanecen poco comprendidos (Ruiz Rosquete et al., 2012). Por su parte, la ruta de oxidación sin descarboxilación lleva a la formación de ácido oxindol-3-acético y de ácido dioxindol-3-acético junto con sus derivados (Machakova et al., 2008).

#### **1.5.6 Amidohidrolasas de conjugados de auxina: otra vía para la obtención de AIA libre y otros RCV**

En trabajos realizados con mutantes de *A. thaliana* insensibles a AIA-Leu, se pudo aislar un grupo de genes que fueron denominados *ILR1* (*IAA-Leucine-Resistant*), este grupo está constituido por tres miembros: *ILR1*, *ILL1* (*ILR-Like*) e *ILL2* (Bartel y Fink, 1995). Estudios con mutantes de *A. thaliana* insensibles a otros conjugados de AIA permitieron añadir tres nuevos miembros a esta familia: *IAR3* (*IAA-Ala-Resistant*), *ILL3* e *ILL5*. A *ILL5* se le considera un pseudogen de *IAR3* debido a su estrecho porcentaje de identidad (83%) y su cercanía en el cromosoma I en *A. thaliana*, prediciendo que tal vez sea el resultado de algún evento de duplicación genómica reciente (Cuadro 1,1) (Davies et al., 1999).

**Cuadro 1. 1** Hidrolasas y especificidad de sustrato en *Arabidopsis thaliana* y otras especies.

Amidohidrolasas	Substrato(s) <i>in vitro</i>	Secuencia C-terminal	Referencia
AtILR1	AIA-Leu/AIA-Phe	KSEL	(LeClere et al., 2002; Bartel y Fink, 1995)
AtILL1	AIA-Ala/*AIA-Asn/AIA-Tyr	HDEL	(LeClere et al., 2002; Bartel y Fink, 1995)
AtILL2	AIA-Ala	HEEL	(LeClere et al., 2002; Bartel y Fink, 1995)
AtIAR3	AIA-Ala	KDEL	(LeClere et al., 2002; Davies et al., 1999)
AtILL3		KSGD	(Davies et al., 1999)
AtILL5 (pseudogen)		KDEL	(Davies et al., 1999)
ILL6		DKHS	(LeClere et al., 2002)
AsILR1	AIA-Ala/AIA-Gly	KSEL	(Campanella et al., 2003b)
TalAR3	AIB-Ala/AIB-Gly/IPA-Ala	RDEL	(Campanella et al., 2004)

Las amidohidrolasas ILR1, ILL1, ILL2 e IAR3 de *A. thaliana* se caracterizaron mediante la especificidad de sus sustratos *in vitro* y se calculó que los valores de  $K_m$  se encuentra en el rango micromolar (LeClere et al., 2002). También se determinó que ILL1 e ILL2 comparten 50% de identidad, y no son parálogos (Campanella et al., 2003a).

En *A. suecica* se aisló un homólogo del gen *ILR1* y se determinó que la especificidad de la enzima correspondiente por su sustrato difiere en relación con la reportada para *A. thaliana* (Bartel y Fink, 1995) ya que hidroliza a los conjugados de AIA-Ala y de AIA-Gly, a pesar de su estrecha cercanía, tanto taxonómica como de identidad, que es de aproximadamente el 98% (Campanella et al., 2003b). En trigo (*Triticum aestivum*), se aisló un ortólogo del gen *IAR3* de *A. thaliana* y se pudo determinar que TalAR3 hidroliza cantidades despreciables del conjugado AIA-Ala y no de ningún otro conjugado de AIA con aminoácidos a diferencia de su ortólogo *IAR3*. En lugar de ello, TalAR3 tiene baja especificidad por conjugados éster AIA-Glc y AIA-mioinositol y especificidad elevada por los conjugados del AIB con alanina y con glicina, así como por el conjugado del ácido-3-propiónico con alanina. TalAR3 no hidroliza los conjugados del AIB con alanina, ni con glicina. Este trabajo sugiere que a pesar de la inevitable diferencia a través de eventos

evolutivos en genes ortólogos, entre diferentes especies, y lejanamente relacionadas, la cercanía no es garantía de que utilicen el mismo sustrato; además del hecho de que en diferentes especies, o al menos en *T. aestivum*, existen enzimas que hidrolizan al conjugado del AIB-Ala. En algunas especies el AIB puede ser un precursor del AIA, por lo que la planta, dentro de su mecanismo de homeostasis, puede hidrolizar al conjugado de AIB-Ala y convertir el AIB en AIA activo (Campanella et al., 2004).

A través de diferentes análisis filogenéticos se pudo estudiar la evolución molecular y los cambios que se dan entre los diferentes miembros de la familia ILR1 de amidohidrolasas de monocotiledóneas, eudicotiledóneas y gimnospermas (Campanella et al., 2003a). Se observó que en las plantas superiores, *IAR3* es el gen que menos cambios evolutivos ha sufrido y, por lo tanto, es el más conservado; además, se encuentra regulado por el miRNA167 (Kinoshita et al., 2012); de igual forma, pero en menor proporción se encuentran los genes *ILL1* e *ILR1*. Este mismo trabajo reporta que las amidohidrolasas ILR1, ILL1, ILL2 e IAR3 contienen secuencias señal en su extremo N-terminal y que en su extremo carboxilo terminal poseen señales que las localiza en el retículo endoplásmico (Campanella et al., 2003a; Davies et al., 1999; Bartel y Fink, 1995).

Las amidohidrolasas ejercen su actividad en diferentes etapas del crecimiento y desarrollo, de acuerdo a las necesidades de la planta; por ello se pudo determinar la actividad de cuatro amidohidrolasas en hojas, tallos, vainas y flores; sin embargo, solamente ILL2 y posiblemente ILR1 fueron detectadas en semillas, en tanto que IAR3 e ILL1 fueron detectadas sólo en raíces (Rampey et al., 2004). En este mismo análisis, se concluyó que ILR1 puede encontrarse de forma más activa en raíces para hidrolizar los conjugados AIA-Leu y AIA-Phe, mientras que en el hipocotilo se determinó una mayor actividad para el conjugado AIA-Leu (Rampey et al., 2004). IAR3 también puede encontrarse de forma activa en raíces hidrolizando el conjugado de AIA-Ala; además, esta enzima puede hidrolizar el conjugado de AIA-Leu y AIA-Phe de manera considerable, siempre y cuando ILR1 no se encuentre presente. En otro estudio de la expresión de *IAR3* en la misma especie muestra que se expresa en raíces, tallos y flores, sugiriendo una función para la hidrólisis de los conjugados del AIA en dichos tejidos.



Las axinas participan en casi todos los procesos fisiológicos y de desarrollo de las plantas. Por ello, es de suponer que sus conjugados, en particular aquellos conjugados que liberan auxina libre, también muestren una amplia distribución en las plantas. Además, se ha determinado que existen otros fenómenos fisiológicos en los que pueden estar involucrados los conjugados del AIA. En álamo hay dos especies con diferentes susceptibilidades al estrés salino, *Populus euphratica* y el híbrido sensible a la salinidad *Populus x canescens*. La concentración de AIA libre disminuye bajo condiciones de estrés salino en el xilema de ambas especies de álamo, pero en mayor cantidad en *P. x canescens* que en *P. euphratica*. Sólo *P. euphratica* mostró un aumento en los conjugados del AIA en el xilema. Se aislaron genes homólogos a la amidohidrolasa ILL3 del xilema de ambas especies. Para realizar el análisis funcional de este gen, se sobreexpresó en *A. thaliana* el gen aislado de *P. x canescens*. Las plantas transgénicas fueron más resistentes al estrés salino que las plantas sin transformar. El aumento en la sensibilidad de las plantas transgénicas al conjugado AIA-Leu mostró que la hidrolasa ILL3 usa al AIA-Leu como sustrato. Estos resultados sugieren que el álamo puede usar a los conjugados del AIA en el tallo como fuente de auxina para balancear los efectos del estrés salino en la fisiología de la auxina (Junghans et al., 2006).

Titarenko et al. (1997) descubrieron que en *A. thaliana*, ciertos genes se expresan en respuesta a la herida causada por daño mecánico y que éstos fueron usados como marcadores moleculares para analizar la función del ácido jasmónico (JA) como mediador en la respuesta a herida en plantas. De estos genes, destaca el gen *Jasmonate Responsive 3 (JR3)*, el cual entre sus características, muestra un 38% de identidad con el gen *ILR1* de *A. thaliana* (Bartel y Fink, 1995). El nombre de este gen se cambió recientemente a *IAR3*. Woldemariam et al. (2012) reportaron la caracterización de un gen relacionado a *IAR3* en *Nicotiana attenuata*, llamado *JIH1* (Jasmonoyl-Isoleucine Hydrolase 1), cuyo producto hidroliza al conjugado de JA-Ile en JA e Ile. Estudios *in vitro* de las hidrolasas *IAR3* e *ILL6* en *A. thaliana*, muestran que pueden estar involucradas en la respuesta a herida, hidrolizando al conjugado JA-Ile, luego de que la hoja haya recibido algún tipo de daño mecánico, dando un primer acercamiento al posible sustrato de la amidohidrolasa *ILL6* (Widemann et al., 2013), y también sugiere una serie de pasos de conjugación, división y oxidación en el metabolismo del AJ al mismo tiempo que apunta a una relación entre la respuesta a herida y la homeostasis de las auxinas (Titarenko et al.,

1997).

Estudiando raíces infectadas de *Brassica rapa* con *Plasmodiophora brassicae*, Savic et al. (2009) y Schuller et al. (2006) aislaron una familia de hidrolasas de conjugados del AIA y determinaron la actividad de sus miembros y la especificidad para sus sustratos *in vitro*.

**Cuadro 1. 2** Amidohidrolasas presentes en *Brassica rapa* y su especificidad de sustrato.

Amidohidrolasa	Substrato(s) <i>in vitro</i>	Secuencia N-terminal	Referencia
Br-ILL2	IPA-Ala/AIA-Ala/AIA-Leu/AIA-Val	HDEL	(Savic et al., 2009; Schuller y Ludwig-Müller, 2006)
Br-IAR3 24	IPA-Ala/AIA-Ala/AIA-Gly/AIA-Asp	KDEL	(Savic et al., 2009; Schuller y Ludwig-Müller, 2006)
Br-IAR3 25			(Schuller y Ludwig-Müller, 2006)
Br-ILL6	-	-	(Schuller y Ludwig-Müller, 2006)

De igual forma, en un estudio de la interacción entre simbioses, en la leguminosa *Medicago truncatula*, se identificaron cinco miembros de posibles amidohidrolasas (Cuadro 1.3) (Campanella et al., 2008).

**Cuadro 1.3** Amidohidrolasas presentes en *Medicago truncatula* y su especificidad de sustrato.

Amidohidrolasa	Substrato(s) <i>in vitro</i>	Substrato(s) <i>in vitro</i>	Referencia
MtIAR31	AIB-Ala/AIA-Asp	AIA-Ala*	(Campanella et al., 2008) (Campanella et al., 2011)
MtIAR32	AIA-Asp/AIB-Ala/AIB-Gly	AIA-Asp*	(Campanella et al., 2008) (Campanella et al., 2011)
MtIAR33	Ala-Asp/AIA-glucosa	AIB-Ala*	(Campanella et al., 2008) (Campanella et al., 2011)
MtIAR34	AIA-Asp/AIA-glucosa/AIA-Leu/AIA-Val	AIA-Asp*	(Campanella et al., 2008) (Campanella et al., 2011)
MtIAR36	AIA-Gly/AIA-Ala/AIA-Ile/AIA-Glucosa	AIA-Ala*	(Campanella et al., 2008) (Campanella et al., 2011)

En estudios posteriores, los integrantes de esta familia fueron truncados y los resultados fueron muy variables en cuanto a la especificidad por el sustrato de cada uno (\*) (Campanella et al., 2011).

### 1.5.7 Recapitulación de antecedentes

A pesar de los avances recientes, el papel de los conjugados de auxinas y su subsecuente hidrólisis aún permanecen mayormente sin conocerse. Varios trabajos concuerdan en que existen mecanismos redundantes en cuanto a la bioquímica de las hidrolasas de conjugados de auxina, como una manera de asegurar y suplir los requerimientos de AIA por la planta (Rampey et al., 2004). La determinación del sustrato natural, la localización y la actividad de estas enzimas puede ser un componente importante para definir su función en la homeostasis del AIA (LeClere et al., 2002).



## HIPOTESIS

Si en el proceso de embriogénesis somática de *Coffea canephora* existen regulaciones en la concentración endógena de AIA libre y sus conjugados, entonces es posible que homólogos de la familia ILR de hidrolasas participen en la regulación del desarrollo de la embriogénesis somática.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la presencia de transcritos que codifican para amidohidrolasas de conjugados de AIA que pudieran participar en la homeostasis del AIA en los primeros días de la inducción de la ES en *C. canephora*.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analizar el nivel de expresión de transcritos de genes que codifican para amidohidrolasas durante la inducción de la embriogénesis somática en *C. canephora*.

Inferir la relación evolutiva de la familia de amidohidrolasas ILR en distintas eudicotiledoneas con respecto a la familia de *C. canephora*.

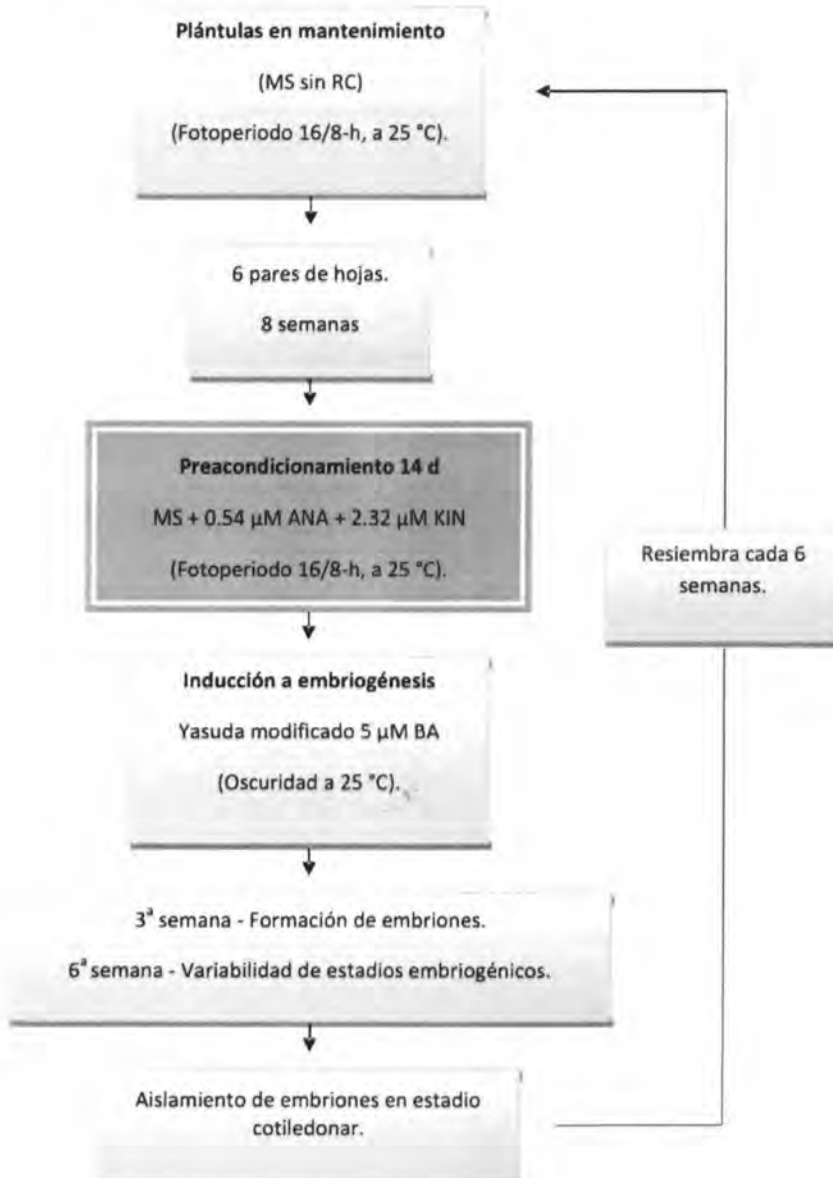
## JUSTIFICACIÓN

Nuestro grupo ha determinado que antes de que se inicie el proceso embriogénico, hay un cambio importante en el balance tanto del AIA libre como del conjugado. El contenido de AIA-ala disminuye dramáticamente en los primeros siete días de la inducción de la ES; por lo que es necesario explorar si las hidrolasas están jugando un papel en la inducción de la ES.

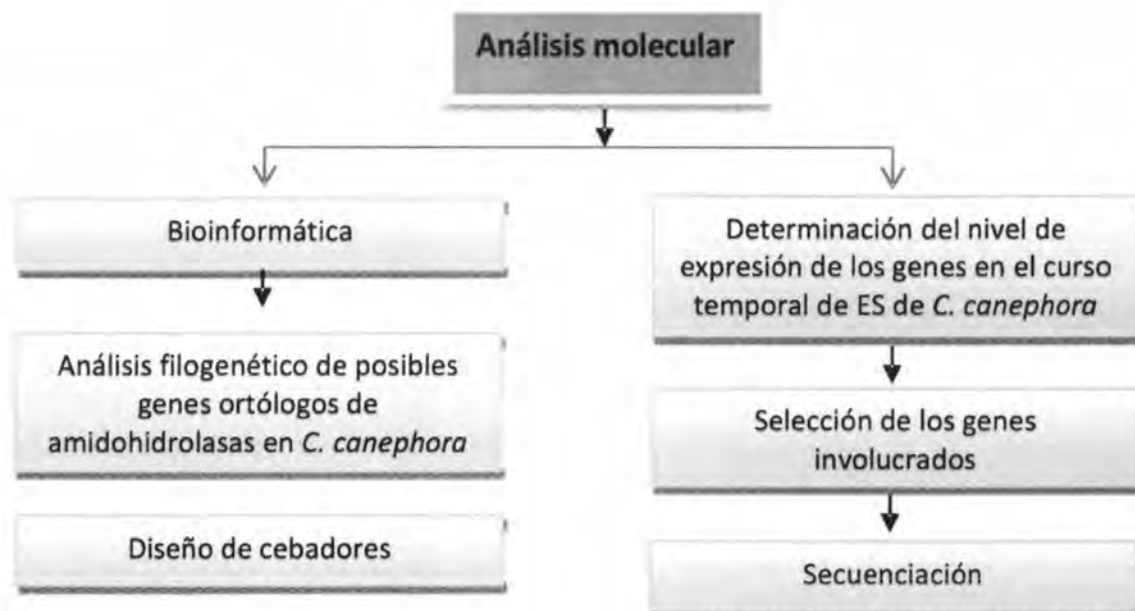
## ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La parte experimental está dividida en dos partes. En la primera parte se obtendrá el material vegetal para la realización de muestreos, mientras que en la segunda parte se abordará el análisis molecular para lograr los objetivos propuestos.

El esquema de trabajo a seguir es el siguiente:



Segunda parte.



**Figura. 1.7** Descripción de actividades de la primera y segunda parte de la estrategia experimental.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ayil-Gutiérrez, B., R. M. Galaz-Avalos, E. Peña-Cabrera y V. M. Loyola-Vargas (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998.
- Bajguz, A. y A. Piotrowska (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70, 957-969.
- Bartel, B. y G. R. Fink (1995). ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, 268, 1745-1748.
- Bartel, B., S. LeClere, M. Magidin y B. K. Zolman (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid  $\beta$ -oxidation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20, 198-216.
- Campanella, J. J., D. Larko y J. Smalley (2003a). A molecular phylogenomic analysis of the ILR1-like family of IAA amidohydrolase genes. *Comparative and Functional Genomics*, 4, 584-600.
- Campanella, J. J., J. Ludwig-Müller, V. Bakllamaja, V. Sharma y A. Cartier (2003b). ILR1 and sILR1 IAA amidohydrolase homologs differ in expression pattern and substrate specificity. *Plant Growth Regulation*, 41, 215-223.
- Campanella, J. J., A. F. Olajide, V. Magnus y J. Ludwig-Müller (2004). A novel auxin conjugate hydrolase from wheat with substrate specificity for longer side-chain auxin amide conjugates. *Plant Physiology*, 135, 2230-2240.
- Campanella, J. J., S. M. Smith, D. Leib, S. Wexler y J. Ludwig-Müller (2008). The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their

---

expression during the interaction with two symbionts. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 26-38.

Campanella, J. J., S. Sigethy y J. Ludwig-Müller (2011). Truncation of *Medicago truncatula* auxin conjugate hydrolases alters substrate specificity. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 745-752.

Chandler, J. W. (2009). Local auxin production: a small contribution to a big field. *BioEssays*, 31, 60-70.

Davies, R. T., D. H. Goetz, J. Lasswell, M. N. Anderson y B. Bartel (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 11, 365-376.

Eckardt, N. A. (2001). New insights into auxin biosynthesis. *The Plant Cell*, 13, 1-3.

Etienne, H., (2005). Somatic embryogenesis protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.), en: *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants*, Jain, S. y P. Gupta, (eds). Springer. Netherlands. pp. 167-179.

Friml, J., J. Wisniewska, E. Benková, K. Mendgen y K. Palme (2002). Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415, 806-809.

George, E. F., (2008). Plant tissue culture procedure: background, en: *Plant propagation by tissue culture*, George, E. F., M. A. Hall y G. J. De Klerk, (eds). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 1-28.

González-Lamothe, R., M. El Oirdi, N. Brisson y K. Bouarab (2012). The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *The Plant Cell*, 24, 762-777.

Junghans, U., A. Polle, P. DÜchting, E. Weiler, B. Kuhlman, F. Gruber y T. Teichmann (2006). Adaptation to high salinity in poplar involves changes in

xylem anatomy and auxin physiology. *Plant, Cell & Environment*, 29, 1519-1531.

Kinoshita, N., H. Wang, H. Kasahara, J. Liu, C. MacPherson, Y. Machida, Y. Kamiya, M. A. Hannah y N. H. Chua (2012). *IAA-Ala resistant3*, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates *Arabidopsis* root architecture changes during high osmotic stress. *The Plant Cell*, 24, 3590-3602.

LeClere, S., R. Tellez, R. A. Rampey, S. P. T. Matsuda y B. Bartel (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 20446-20452.

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.

Ljung, K., A. K. Hull, M. Kowalczyk, A. Marchant, J. Celenza, J. D. Cohen y G. Sandberg (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 50, 309-332.

Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943-950.

Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1757-1773.

Machakova, I., E. Zazimalova y E. F. George, (2008). Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors, en: *Plant Propagation by Tissue Culture*, George, E. F., M. A. Hall y G. J. D. Klerk, (eds). Springer. Netherlands. pp. 175-204.

- 
- Mano, Y. y K. Nemoto (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63, 2853-2872.
- Mroginski, L., P. Sansberro y E. Flashland, (2010). Establecimiento de cultivos vegetales, en: *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*, Levitus, G., V. Echenique, C. Rubistein, E. Hopp y L. Mroginski, (eds). INTA. pp. 17-24.
- Neumann, K. H., A. Kumar y J. Imani (2009). *Plant cell and tissue culture - A tool in biotechnology*, Springer, Heidelberg, Germany. 333 p.
- Okrent, R. y M. Wildermuth (2011). Evolutionary history of the GH3 family of acyl adenylases in rosids. *Plant Molecular Biology*, 76, 489-505.
- Perrot-Rechenmann, C. (2010). Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a001446.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Rampey, R. A., S. LeClere, M. Kowalczyk, K. Ljung, G. Sandberg y B. Bartel (2004). A family of auxin-conjugate hydrolases that contributes to free indole-3-acetic acid levels during Arabidopsis germination. *Plant Physiology*, 135, 978-988.
- Ribnicky, D. M., N. Ilic, J. D. Cohen y T. J. Cooke (1996). The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. The implications for carrot somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 112, 549-558.
- Robert, H. S. y J. Friml (2009). Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology*, 5, 325-332.
- Ruiz Rosquete, M., E. Barbez y J. Kleine-Vehn (2012). Cellular auxin homeostasis:



gatekeeping is housekeeping. *Molecular Plant*, 5, 772-786.

Santner, A., L. I. Calderon-Villalobos y M. Estelle (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5, 301-307.

Savic, B., S. Tomic, V. Magnus, K. Gruden, K. Barle, R. Grenkovic, J. Ludwig-Müller y B. Salopek-Sondi (2009). Auxin amidohydrolases from *Brassica rapa* cleave the alanine conjugate of indolepropionic acid as a preferable substrate: a biochemical and modeling approach. *Plant and Cell Physiology*, 50, 1587-1599.

Schuller, A. y J. Ludwig-Müller (2006). A family of auxin conjugate hydrolases from *Brassica rapa*: characterization and expression during clubroot disease. *New Phytologist*, 171, 145-158.

Seidel, C., A. Walz, S. Park, J. D. Cohen y J. Ludwig-Müller (2006). Indole-3-acetic acid protein conjugates: novel players in auxin homeostasis. *Plant Biology*, 8, 340-345.

Staswick, P. E., I. Tiryaki y M. Rowe (2002). Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell*, 14, 1405-1415.

Staswick, P. E., B. Serban, M. Rowe, I. Tiryaki, M. T. Maldonado, M. C. Maldonado y W. Suza (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *The Plant Cell*, 17, 616-627.

Tam, Y. Y., E. Epstein y J. Normanly (2000). Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology*, 123, 589-596.



- 
- Thorpe, T. A. y C. Stasolla, (2001). Somatic embryogenesis, en: Current trends in the embryology of angiosperms, Bhojwani, S. S. y W. Y. Soh, (eds). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, NL. pp. 279-336.
- Titarenko, E., E. Rojo, J. Leon y J. J. Sanchez-Serrano (1997). Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 115, 817-826.
- Vanneste, S. y J. Friml (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136, 1005-1016.
- Vinod, K., M. M. Naidu y G. A. Ravishankar (2006). Developments in coffee biotechnology-*in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87, 49-65.
- Wang, H., C. e. Tian, J. Duan y K. Wu (2008). Research progresses on *GH3s*, one family of primary auxin-responsive genes. *Plant Growth Regulation*, 56, 225-232.
- Widemann, E., L. Miesch, R. Lugan, E. Holder, C. Heinrich, Y. Aubert, M. Miesch, F. Pinot y T. Heitz (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 31701-31714.
- Woldemariam, M. G., N. Onkokesung, I. T. Baldwin y I. Galis (2012). Jasmonoyl-L-isoleucine hydrolase 1 (JIH1) regulates jasmonoyl-L-isoleucine levels and attenuates plant defenses against herbivores. *The Plant Journal*, 72, 758-767.
- Woodward, A. W. y B. Bartel (2005). Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95, 707-735.



## CAPÍTULO II

### ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y PARTICIPACIÓN DE AMIDOHIDROLASAS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Coffea canephora*.

#### 2.1 INTRODUCCIÓN

En esta etapa se pretende realizar el análisis filogenético y el análisis molecular de amidohidrolasas presentes en la ES en *C. canephora* con el fin de averiguar cuál es la importancia evolutiva de esta familia de genes y como intervienen en las regulaciones endógenas del AIA y/o sus conjugados durante este proceso.

Como punto de partida se obtuvo el material vegetal que consistió en plántulas de *C. canephora* cultivadas en medio MS sin RCV de acuerdo al protocolo establecido en nuestro laboratorio (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Posteriormente, en bases de datos de libre acceso, se realizó el análisis bioinformático en diversas especies de plantas, de las secuencias de los genes que codifican a las enzimas involucradas en la hidrólisis de los conjugados de AIA con aminoácidos, para poder inferir la relación evolutiva de esta familia de genes en especies cercana o lejanamente relacionadas

Después del diseño de los cebadores, determinar la expresión de los genes posiblemente involucrados en el proceso de hidrólisis durante el proceso de ES (preacondicionamiento e inducción) con el fin de determinar cuál es el gen responsable que causa el descenso en la concentración de los conjugados.

#### 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

##### 2.2.1 Material vegetal

Se partió de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* en medio de mantenimiento (MS sin RCV). Las plántulas se subcultivaron en cajas Magenta en 50 mL de medio MS semisólido suplementado con 0.54  $\mu\text{M}$  de ANA y 2.32  $\mu\text{M}$  de KIN. Las plántulas fueron mantenidas en condiciones de fotoperiodo (16 h-luz/8 h-oscuridad) a  $25 \pm 2$  °C por 14 días. Durante esta etapa de pretratamiento, se colectaron muestras para la extracción de ARN total los días -14 dai, -7dai y 0 dai (dai: días anteriores a la inducción).

### 2.2.2.1 Inducción a embriogénesis somática

Para la obtención de los explantes para la inducción de la ES se usaron plántulas de 14 días de pretratamiento que no tuvieran más de cinco pares de hojas. Para la inducción de la ES se tomaron el primero y segundo par de hojas y para la obtención de los explantes se usó un sacabocado de un centímetro de diámetro. Se colocaron cinco explantes en 50 mL de medio de Yasuda suplementado con BA 5  $\mu$ M en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los explantes se incubaron en condiciones de oscuridad a  $25 \pm 2$  °C y agitación a 55 rpm. Durante los primeros días de inducción de la ES se realizó una colecta de muestra para la extracción de ARN total los días: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, y 21 dpi (dpi: días posteriores a la inducción).

Con el fin de determinar que el proceso embriogénico se estuviera llevando a cabo correctamente y, periódicamente, algunas muestras se dejaron continuar hasta el final del proceso (56 dpi) y los embriones cotiledonares obtenidos se germinaron en medio MS sin RCV.

### 2.2.3 Relación filogenética

Para el análisis filogenético se obtuvieron las secuencias de los genes completos de las amidohidrolasas en *C. canephora*, números de accesoión: Cc06\_g10900 ILR1-like 1, Cc11\_g14190 ILR1-like 2, Cc04\_g02290 ILR1-like 4, Cc02\_g00710 ILR1-like 5, Cc10\_g12030 ILR1-like 6, Cc06\_g06300 ILR1-like 7. El marco de lectura de cada gen fue analizado con el programa ORF Finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>).

Con los datos depositados en la base de datos PHYTOZOME V 10 para las especies enlistadas en el Cuadro 2.1 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>) y con los datos de la base de datos Sol Genomics Network (<http://solgenomics.net/>) para las secuencias depositadas para *C. arabica* y *Nicotiana tabacum* se realizó una comparación (BLAST) de las secuencias de nucleótidos para cada uno de los integrantes de la familia ILR de *C. canephora*.

Se realizó un alineamiento de todas las secuencias con cada gen de la familia de hidrolasas de *C. canephora* y mediante la comparación de valores se determinaron los

---

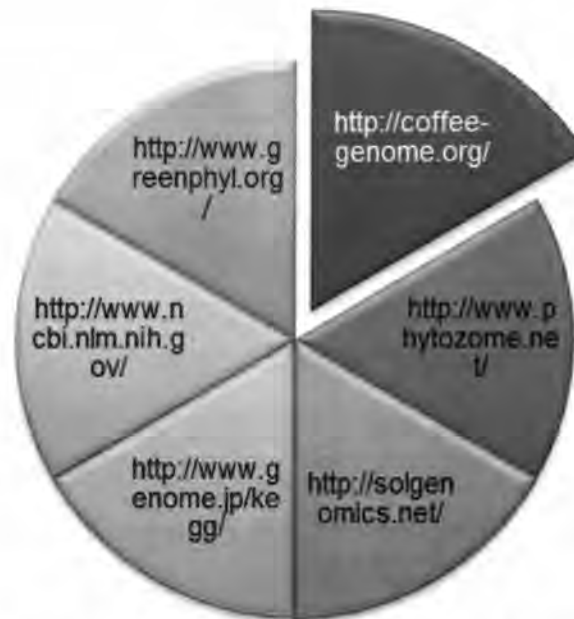
mejores candidatos en nuestro análisis. Estos resultados fueron corroborados mediante la realización de un árbol filogenético.

El alineamiento de las secuencias se realizó utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) que se encuentra incluido en el programa MEGA 6 (<http://www.megasoftware.net/mega.php>). Las secuencias obtenidas poseían una región que pertenece a la familia de peptidasas M20 (IPR002933), dentro de esta familia se encuentran las amidohidrolasas (IPR017439). Además, contenían un dominio de dimerización (IPR011650).

Para inferir la filogenia se seleccionó el mejor modelo de sustitución y todos los árboles filogenéticos fueron realizados por el método del vecino más cercano ("Neighbor-Joining") utilizando un "bootstrap" de 5,000. Todos los árboles filogenéticos fueron realizados en el programa MEGA v6.

Las bases de datos utilizadas fueron PHYTOZOME v10, Sol Genomics Network, GenomeNet (<http://www.genome.jp/kegg>), National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), GreenPhyl v4 e International Coffee Genome network (<http://www.coffeegenome.org/>) (Figura 2.1).

Estas bases de datos son portales de genómica comparativa en una amplia variedad de plantas, donde se pueden encontrar un catálogo de familias de genes basado en predicciones de genes en los genomas, cada base de datos ha sido importante en vista de las diversas y únicas herramientas que poseen, como el caso de la base de datos de Sol Genomics Network, el cual se utilizó previo a la liberación del genoma completo de *C. canephora*, y en el cual se pudo obtener hasta cuatro miembros de la familia de amidohidrolasas. La base de datos del genoma de café fue esencial para nuestras búsquedas en este trabajo así como lo será para las perspectivas de éste.



**Figura. 2.1** Bases de datos utilizadas para el análisis bioinformático de los genes reportados en esta investigación.

#### 2.2.4 Diseño de cebadores

El diseño de los cebadores, fue realizado en el programa Oligo Explorer 1.2, con el cálculo del  $T_m$  bajo el método de "Nearest Neighbor" (NN), 50 mM de concentración de sales y 500 nM de concentración de ADN (del oligonucleótido). Evitando la formación de dímeros, horquillas o la auto complementariedad de bases.

Todos los cebadores fueron diseñados a partir de la secuencia de la especie *C. canephora* que en la base de datos Sol Genomics Network se menciona que es específica para ese gen previo a la publicación del genoma de *C. canephora*.

#### 2.2.5 Medición de la expresión de los transcritos

Para el análisis de la expresión, se colectó material vegetal antes y durante el proceso embriogénico, es decir en las fases de pretratamiento y de inducción, los días -14 dai, -7 dai y 0 dai, y los días 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi y 21 dpi, respectivamente.

El ARN fue extraído de las muestras recolectadas de la siguiente manera: 100 mg de tejido foliar (peso fresco) fueron pulverizados con nitrógeno líquido en un mortero y el macerado fue depositado en un tubo Eppendorf; posteriormente se adicionó 1 mL del reactivo TRI-Reagent, se agitó por un minuto y se agregaron 100  $\mu$ L de una mezcla de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), de nuevo se agitó por un minuto y se dejó reposar en hielo de 10 a 30 minutos para centrifugar a continuación a 12,000 rpm por 15 minutos a 4 °C; la fase acuosa superior fue cuidadosamente colectada en un nuevo tubo Eppendorf rotulado y se adicionaron 500  $\mu$ L de isopropanol, mezclando suavemente y dejando reposar por 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm por 10 minutos a 4 °C, se colectó la pastilla decantando el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 mL de etanol al 75%, se hizo una última centrifugación a 8,500 rpm por 5 min a 4 °C, el sobrenadante fue descartado y la pastilla se resuspendió en 20-25  $\mu$ L de agua estéril libre de ARNasa. Posteriormente, para determinar la pureza del ARN, se realizó su cuantificación con un NanoDrop 2000. Se hicieron alícuotas y las muestras fueron almacenadas a -80 °C.

Para la obtención del ADN complementario (ADNc) se utilizó el kit Super Script™ First Strand Synthesis for RT-PCR de INVITROGEN. Se realizó la siguiente mezcla en un tubo Eppendorf:

Mezcla de RNA	N $\mu$ L
10 mM dNTP mix (2.5 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Primer [0.5 $\mu$ g/olido DT]	1 $\mu$ L
Agua DEPC	Vol. final 10 $\mu$ L

Una vez realizada la mezcla de ARN/cebador se incubó a 65 °C durante 5 minutos, posteriormente se colocó en hielo durante un minuto. Seguidamente en un tubo Eppendorf se preparó la siguiente mezcla de reacción:

Componentes	1X
10X RT Buffer	2 $\mu$ L
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ L
0.1 DTT	2 $\mu$ L
ARNasa out (40 u/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L



Se adicionaron los 9  $\mu$ L de volumen total para cada tubo Eppendorf con la mezcla ARN/"Primer", se mezcló y colectó por centrifugación. Se incubó a 47 °C por dos minutos, y seguidamente se adicionó 1  $\mu$ L de la Súper Script II RT de INVITROGEN en cada tubo. Se incubó a 42 °C por 50 minutos; transcurrido el tiempo, se incubó nuevamente a 70 °C por 15 minutos, se colectó por centrifugación, y se adicionó 1  $\mu$ L de ARNasa H en cada tubo y se incubó a 37 °C por 20 minutos. Se hicieron alícuotas del ADNc recién sintetizado y se almacenaron a -20 °C.

Se procedió a realizar las amplificaciones por PCR de nuestro ADNc con cebadores del gen constitutivo de actina de *C. canephora* bajo las siguientes condiciones:

# de Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
35	Desnaturalización	94	35 s
	Alineamiento	52	1 min
	Extensión	72	1 min

### 2.2.6 PCR de los genes ILR1 Cc., ILL6 Cc., IAR3 Cc. ILL3 Cc., ILL2 Cc.

Condiciones de PCR:

Gen	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
	Desnaturalización	94	45 s
<i>ILR1 Cc / IAR3 Cc</i>	Alineamiento	61	36 s
<i>ILL6 Cc/ ILL3 Cc</i>		60	
<i>ILL2 Cc</i>		63	
	Extensión	72	1 min
30 ciclos			

A todos los productos de PCR se les realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% a 60 voltios/60 minutos.



### 2.2.6 Secuenciación

Para el análisis de secuenciación, el ADN del producto de PCR fue purificado para evitar lecturas erróneas que pudieran afectar los resultados finales. La purificación del ADN del producto de PCR corrido en un gel de agarosa al 1% fue el siguiente, de acuerdo al Zymoclean™ DNA recovery Kit:

1. En el transiluminador de rayos UV, se cortó el gel de agarosa con una cuchilla estéril lo más cercano posible al borde de la banda, tratando en la medida de lo posible, obtener la menor cantidad de agarosa. Posteriormente, la muestra fue colocada en un tubo Eppendorf de 1.5 mL.
2. Se adicionó un volumen de la solución ADB igual al triple del peso de la agarosa en el tubo.
3. El tubo fue incubado a una temperatura de 50 °C por un tiempo de 8 minutos, hasta que la agarosa se haya disuelto completamente (agitar sin vortex).
4. La agarosa fundida fue transferida a un tubo de colecta que en su interior se encuentra una columna que posee un filtro.
5. El tubo fue centrifugado a 8000 rpm y el sobrenadante fue descartado.
6. Se adicionaron 200 µL del amortiguador DNA Wash a la columna y se centrifugó a 8000 rpm, posteriormente se descartó el sobrenadante. Este paso se realizó una vez más.
7. Finalmente, se adicionaron 15 µL de agua grado biología molecular directamente a la columna (se esperó aproximadamente 1 a 2 minutos previos a la centrifugación). La columna fue transferida a un tubo de colecta nuevo estéril y fue centrifugada a 500 rpm por 15 segundos, para eluir el ADN.

Las muestras con el ADN del producto de PCR purificado fueron cuantificadas y ajustadas a las concentraciones y volúmenes requeridos por la compañía MACROGEN para que pudiera darse satisfactoriamente la reacción de secuenciación.

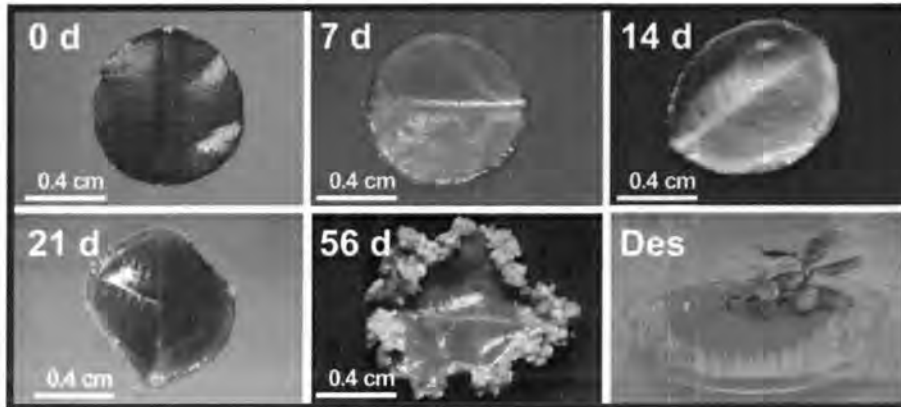
Muestra	Concentración	Volumen
X	50 ng/ $\mu$ L	$\geq 20 \mu$ L

Se corrió un gel de agarosa al 1% para corroborar el tamaño del producto amplificado y sobre todo la intensidad del fragmento, que puede servir como medio para la determinación de la eficacia de la purificación.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Proceso de ES en *Coffea canephora*

El primer experimento realizado fue la repetición del proceso embriogénico de acuerdo con el protocolo reportado por Quiroz-Figueroa et al. (2006) y la demostración de que los embriones somáticos obtenidos eran viables (Figura 2.2).



**Figura. 2.2** Proceso de ES en *C. canephora*. El proceso fue realizado de acuerdo al protocolo previamente reportado por Quiroz-Figueroa (2006). a) Día 0, preacondicionamiento, b) 7 dpi, c) 14 dpi, d) 21 dpi y e) 56 dpi del proceso de ES, en el cual pueden apreciarse todos los estadios embriogénicos: globular, corazón, torpedo y cotiledonar. f) Desarrollo del embrión cotiledonar hasta plántula completa en medio MS sin reguladores de crecimiento vegetal. dpi: días posteriores a la inducción.

### 2.3.2 Aislamiento de estadios embriogénicos

Como parte del proceso de obtención de material vegetal y para verificar el correcto desarrollo de los embriones somáticos, se realizó un seguimiento temporal de cada uno de los estadios de desarrollo (Figura 2.3). Una vez alcanzado el estadio cotiledonar, los embriones fueron puestos a germinar en medio MS sin RCV, en condiciones de fotoperiodo (8/16 h luz/oscuridad).



**Figura. 2.3** Estadios embriogénicos de *C. canephora*. a) Globular, b) Corazón, c) Torpedo, d) Cotiledonar temprano, e) Cotiledonar.

### 2.3.3 Análisis filogenético

Con la reciente publicación del genoma de *C. canephora* (Denoeud et al., 2014) se tuvo la oportunidad de obtener las secuencias de los genes que codifican a cada una de las hidrolasas de la familia ILR. También se escogieron las especies enlistadas en el Cuadro 2.1 con el fin de comparar los genes que codifican a las hidrolasas ILR. Se escogieron 19 especies a lo largo del espectro evolutivo de las plantas pertenecientes a ocho familias de plantas. En los casos de *C. arabica* y *N. tabacum*, cuyos genomas no han sido secuenciados, se utilizaron ESTs depositados en la base de datos de Sol Genomics Network.

**Cuadro 2. 1** Búsqueda de ortólogos de los genes que codifican a las hidrolasas de los conjugados del AIA.

Especie	Versión	Orden	Familia	Género
<i>Arabidopsis thaliana</i> (Ath)	TAIR10	Brassicales	Brassicaceae	<i>Arabidopsis</i>
<i>Arabidopsis lyrata</i> (Aly)	v1.0			<i>Arabidopsis</i>
<i>Brassica rapa</i> (Bra)	FPsc v1.3			<i>Brassica</i>
<i>Capsella rubella</i> (Cru)	v1.0			<i>Capsella</i>
<i>Gossypium raimondii</i> (Gra)	v2.0	Malvales	Malvaceae	<i>Gossypium</i>
<i>Theobroma cacao</i> (Tca)	v1.1			<i>Theobroma</i>
<i>Solanum tuberosum</i> (Stu)	v.3.4	Solanales	Solanaceae	<i>Solanum</i>
<i>Solanum lycopersicum</i> (Sly)	iTAG2.3			<i>Solanum</i>
<i>Nicotiana tabacum</i> (Nta)				<i>Nicotiana</i>
<i>Populus trichocarpa</i> (Ptr)	v3.0	Malpighiales	Salicaceae	<i>Populus</i>
<i>Vitis vinifera</i> (Vvi)	Genoscope.12x	Vitales	Vitaceae	<i>Vitis</i>
<i>Eucalyptus grandis</i> (Egr)	v1.1	Myrtales	Myrtaceae	<i>Eucalyptus</i>
<i>Ricinus cummunis</i> (Rcu)	v1.0	Malpighiales	Euphorbiaceae	<i>Ricinus</i>
<i>Fragaria vesca</i> (Fve)	v1.1	Rosales	Rosaceae	<i>Fragaria</i>
<i>Mimulus guttatus</i> (Mgu)	v2.0	Lamiales	Phrymaceae	<i>Mimulus</i>
<i>Glycine max</i> (Gma)	Wm82.a2v1	Fabales	Fabaceae	<i>Glycine</i>
<i>Medicago truncatula</i> (Mtr)	Mt4.0v1			<i>Medicago</i>
<i>Coffea canephora</i> (Cca)		Gentianales	Rubiaceae	<i>Coffea</i>
<i>Coffea arabica</i> (Car)				<i>Coffea</i>
<i>Oryza sativa</i> (Osa)	v7.0	Poales	Poaceae	<i>Oryza</i>

Listado de las especies cuyos genomas completos se utilizaron para hacer la comparación de los genes que codifican a las hidrolasas, con los genes que codifican a las hidrolasas en el genoma de *C. canephora*. En los casos de *C. arabica* y *N. tabacum* se utilizaron los ESTs depositados en la base de datos de Sol Genomics Network.

El análisis comparativo permitió determinar que para el caso de *C. canephora* existen seis genes que codifican a hidrolasas de los conjugados del AIA (Cuadro 2.2). Estos genes son, *ILR1 like 1*, *ILR1 like-2*, *ILR1 like-4*, *ILR1 like-5*, *ILR1 like-6* e *ILR1 like-7*. Para 18 de las especies se utilizó la secuencia completa más actualizada que se encuentra depositada en Phytozome v10 (<http://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html>). El número total de hidrolasas fue obtenido, de acuerdo al número total de accesiones diferentes del genoma completo de cada especie, siempre y cuando pertenecieran a la familia peptidasa M20/M25/M40 (PFAM: PF01546) y/o tuvieran un dominio de dimerización peptidasa (PFAM: PF07687) y presentaran actividad hidrolítica (GO: 0016787). El número de

hidrolasas de este tipo varió entre un máximo de 15 y un mínimo de 5. De las 20 especies estudiadas, 13 de ellas tuvieron entre 6 y 9 hidrolasas, en tanto que 4 de ellas presentaron entre 10 y 15 hidrolasas. Entre las diferencias determinadas está el hecho de que para *C. canephora* no se encontró la hidrolasa ILR1 like-3, que sí se presentó en *A. thaliana*.

Para entender las relaciones evolutivas de los genes de la familia ILR que posiblemente se encuentran involucrados en el proceso de ES en *C. canephora* a través del tiempo y en familias cercana y lejanamente relacionadas, se realizaron los arboles filogenéticos mostrados en las Figuras 2.4 a 2.9. En cada caso se utilizaron las especies listadas en cada una de los cuadros listados más abajo, *ILR1 like 1* (Cuadro 2.3), *ILR1 like-2* (Cuadro 2.4), *ILR1 like-4* (Cuadro 2.5), *ILR1 like-5* (Cuadro 2.6), *ILR1 like-6* (Cuadro 2.7), e *ILR1 like-7* (Cuadro 2.8). Para los casos de *C. arabica* y *N. tabacum* se utilizaron los datos depositados en la base de datos Sol Genomics Network.

Las secuencias de cada hidrolasa de la familia ILR de *C. canephora* se obtuvieron del genoma completo de *C. canephora* (Denoëud et al., 2014). Los números de accesión fueron la base para la obtención de las secuencias que permitieron el análisis filogenético en las diferentes especies de eudicotiledóneas. Se realizó un alineamiento entre las secuencias de los genes de la familia de amidohidrolasas de *C. canephora* y todas las especies eudicotiledóneas listadas en el Cuadro 2.2. La familia Brassicaceae fue comparada con los integrantes de la familia de hidrolasas de *A. thaliana*, excepto *ILL5*, ya que se ha reportado que es un pseudogen del gen *JAR3* (LeClere et al., 2002). *O. sativa* fue utilizada como grupo externo para cada árbol filogenético.

Las secuencias, considerando las que presentaron mayor puntuación, mayor valor esperado (utilizando el valor más cercano a 0), mayor porcentaje de identidad ( $\geq 70\%$ ) y porcentaje de cobertura, fueron categorizadas para cada gen de la familia de hidrolasas en *C. canephora* (Cuadros 2.3 – 2.8). Los árboles fueron realizados con el programa MEGA v6, y todas las secuencias fueron alineadas mediante CLUSTAL W. Una vez alineadas las secuencias que pertenecían a un gen específico se procedió a determinar su mejor modelo de sustitución para finalmente realizar los árboles mediante el método de "Neighbor Joining" (Denoëud et al., 2014) utilizando un "bootstrap" con valor de 5,000.

**Cuadro 2. 2** Número total de posibles hidrolasas en las especies utilizadas en este trabajo.

Espece	Posibles hidrolasas	Espece	Posibles hidrolasas
<i>A. lyrata</i>	6	<i>M. guttatus</i>	6
<i>A. thaliana</i>	7	<i>M. truncatula</i>	13
<i>B. rapa</i>	7	<i>O. sativa</i>	9
<i>C. canephora</i>	6	<i>P. trichocarpa</i>	9
<i>C. rubella</i>	7	<i>R. cummunis</i>	5
<i>E. grandis</i>	11	<i>S. lycopersicum</i>	7
<i>F. vesca</i>	10	<i>S. tuberosum</i>	8
<i>G. max</i>	15	<i>T. cacao</i>	8
<i>G. raimondii</i>	8	<i>V. vinifera</i>	9

Excepto para *C. arabica* y *N. tabacum*, el número total de hidrolasas fue obtenido, de acuerdo al número total de accesiones diferentes del genoma completo de cada especie, siempre y cuando pertenezcan a la familia peptidasa M20/M25/M40 (PFAM: PF01546) y/o posean un dominio de dimerización peptidasa (PFAM: PF07687) y tengan actividad hidrolítica (GO: 0016787).

**Cuadro 2. 3** Especies y números de accesión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-1.

Espece	Número de accesión	Ortólogo ILR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125048	Like-1
<i>Arabidopsis lyrata</i>	495757	Like-1
<i>Brassica rapa</i>	Bra018932	Like-1
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.010G080300.1	Like-1
<i>Theobroma cacao</i>	Thecc1EG037723t5	Like-1
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVT01015256001	Like-1
<i>Solanum tuberosum</i>	PGSC0003DMT400000925	Like-1
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc12g008690.1.1	Like-1
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os07g14590.1	Like-7
<i>Fragaria vesca</i>	mrna11364.1-v1.0-hybrid	Like-1
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a006375m	Like-1
<i>Coffea canephora</i>	Cc06_g10900	Like-1



**Cuadro 2. 4** Especies y números de accesión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-2.

Especie	Número de accesión	Ortólogo ILR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_125049	Like-2
<i>Capsella rubella</i>	Carubv10027523m	Like-2
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.012G123400.1	Like-2
<i>Theobroma cacao</i>	Thecc1EG010185t2	Like-2
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.B03368.1	Like-2
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVT01020159001	Like-2
<i>Solanum tuberosum</i>	PGSC0003DMT400040310	Like-2
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc05g006220.2.1	Like-2
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.010G035900.1	Like-2
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os01g51060.1	Like-2
<i>Fragaria vesca</i>	mrna00715.1-v1.0-hybrid	Like-2
<i>Glycine max</i>	Glyma08g40270.1	Like-2
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr8g062790.1	Like-2
<i>Ricinus cummunis</i>	29736.m002115	Like-2
<i>Coffea canephora</i>	Cc11_g14190	Like-2

**Cuadro 2. 5** Especies y números de accesión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-4.

Especie	Número de accesión	Ortólogo ILR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_104055	Like-4
<i>Arabidopsis lyrata</i>	923670	Like-4
<i>Capsella rubella</i>	Carubv10009165m	Like-4
<i>Brassica rapa</i>	Bra030419	Like-4
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.009G029600.1	Like-4
<i>Theobroma cacao</i>	Thecc1EG037723t1	Like-4
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.C03691.1	Like-4
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVT01016901001	Like-4
<i>Solanum tuberosum</i>	PGSC0003DMT400006691	Like-4
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc03g121270.2.1	Like-4
<i>Nicotiana tabacum</i>	SGN-U427450	Like-4
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.003G045200.1	Like-4
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os03g62070.1	Like-4
<i>Fragaria vesca</i>	101303993	Like-4
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a006385m	Like-4
<i>Glycine max</i>	Glyma08g21030.1	Like-4
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr2g097530.1	Like-4
<i>Ricinus cummunis</i>	30146.m003436	Like-4
<i>Coffea canephora</i>	Cc04_g02290	Like-4
<i>Coffea arabica</i>	SGN-U612326	Like-4



**Cuadro 2. 6** Especies y números de accesión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-5.

Especie	Número de accesión	Ortólogo ILR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_124794	Like-3
<i>Arabidopsis lyrata</i>	495494	Like-3
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.012G001500.1	Like-5
<i>Theobroma cacao</i>	Thecc1EG015532t1	Like-5
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.K00046.1	Like-5
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVT01038665001	Like-5
<i>Solanum tuberosum</i>	PGSC0003DMT400069509	Like-5
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc06g073060.2.1	Like-5
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.015G004000.1	Like-5
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os03g62060.1	Like-3
<i>Fragaria vesca</i>	mrna12442.1-v1.0-hybrid	Like-5
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a023576m	Like-5
<i>Glycine max</i>	Glyma04g40440.1	Like-5
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr3g093030.1	Like-5
<i>Ricinus cummunis</i>	29764.m000755	Like-5
<i>Coffea canephora</i>	Cc02_g00710	Like-5

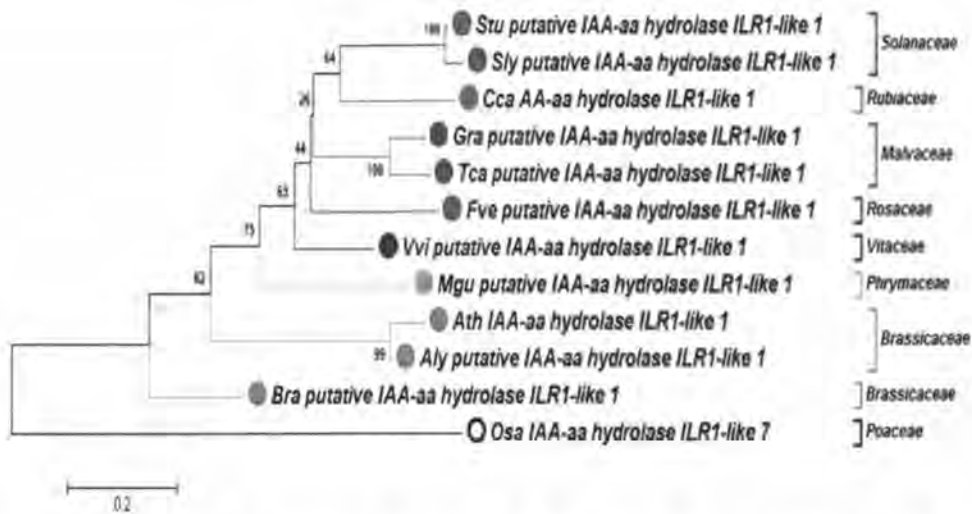
**Cuadro 2. 7** Especies y números de accesión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-6.

Especie	Número de accesión	Ortólogo ILR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_103546	Like-6
<i>Arabidopsis lyrata</i>	922904	Like-6
<i>Capsella rubella</i>	CARUB_v10008915mg	Like-6
<i>Brassica rapa</i>	Bra036946	Like-6
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.010G051100.1	Like-6
<i>Theobroma cacao</i>	Thecc1EG035141t1	Like-6
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.F03795.1	Like-6
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVT01008852001	Like-6
<i>Solanum tuberosum</i>	PGSC0003DMT400076719	Like-6
<i>Solanum lycopersicum</i>	Solyc10g079640.1.1	Like-6
<i>Nicotiana tabacum</i>	SGN-U439582	Like-6
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.005G178900.1	Like-6
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os06g47620.1	Like-6
<i>Fragaria vesca</i>	mrna11194.1-v1.0-hybrid	Like-6
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a005140m	Like-6
<i>Glycine max</i>	Glyma06g12120.1	Like-6
<i>Medicago truncatula</i>	Medtr3g088590.1	Like-6
<i>Ricinus cummunis</i>	29908.m006125	Like-6
<i>Coffea canephora</i>	Cc10_g12030	Like-6

**Cuadro 2. 8** Especies y números de accesión de las secuencias utilizadas para el árbol ILR1 like-7.

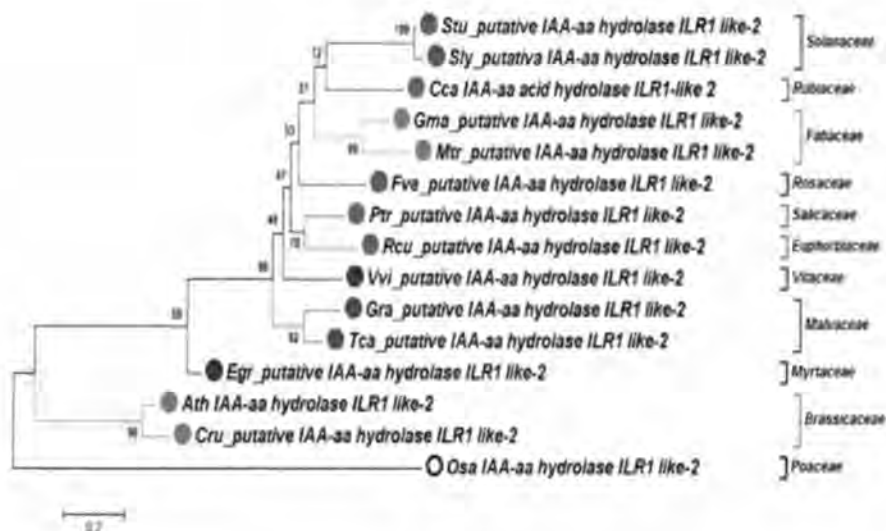
Especie	Número de accesión	Ortólogo ILR
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_111156	Like-7
<i>Arabidopsis lyrata</i>	477533	Like-7
<i>Capsella rubella</i>	Carubv10013712m	Like-7
<i>Brassica rapa</i>	Bra040608	Like-7
<i>Gossypium raimondii</i>	Gorai.009G398600.1	Like-7
<i>Theobroma cacao</i>	Thecc1EG022768t1	Like-7
<i>Eucalyptus grandis</i>	Eucgr.K02596.1	Like-7
<i>Vitis vinifera</i>	GSVIVT01033909001	Like-7
<i>Solanum tuberosum</i>	102588705	Like-7
<i>Solanum lycopersicum</i>	101254822	Like-7
<i>Nicotiana tabacum</i>	SGN-U434568	Like-7
<i>Populus trichocarpa</i>	Potri.016G074100.1	Like-7
<i>Oryza sativa</i>	LOC_Os07g14600.1	Like-8
<i>Fragaria vesca</i>	mrna15612.1-v1.0-hybrid	Like-7
<i>Mimulus guttatus</i>	mgv1a006848m	Like-7
<i>Ricinus cummunis</i>	30032.m000453	Like-7
<i>Coffea canephora</i>	Cc06_g06300	Like-7
<i>Coffea arabica</i>	SGN-U605158	Like-7

La historia evolutiva para el gen *ILR1 like-1* (Figura 2.4) fue deducida, como en todos los demás casos estudiados, usando el método "Neighbor-Joining" (Denoëud et al., 2014). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas de 3. 36197042. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agruparon en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas) (Felsenstein, 1985). El árbol fue realizado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades a aquellas distancias evolutivas que fueron utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) y se reportan en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. La tasa de variación entre sitios fue diseñada con una distribución Gamma (parámetro de forma = 0.49). Para la construcción del árbol del gen *ILR1-like 1* se utilizaron 12 secuencias de nucleótidos (ADN; Cuadro 2.3). Todas las posiciones que contenían espacios vacíos y datos ausentes fueron eliminadas usando el programa MEGA v6. En total se eliminaron 795 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo fue realizado con el programa MEGA v6 (Tamura et al., 2013).



**Figura. 2.4** Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen *ILR1-like 1* de *C. canephora* mediante el método del vecino más cercano. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agruparon en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas).

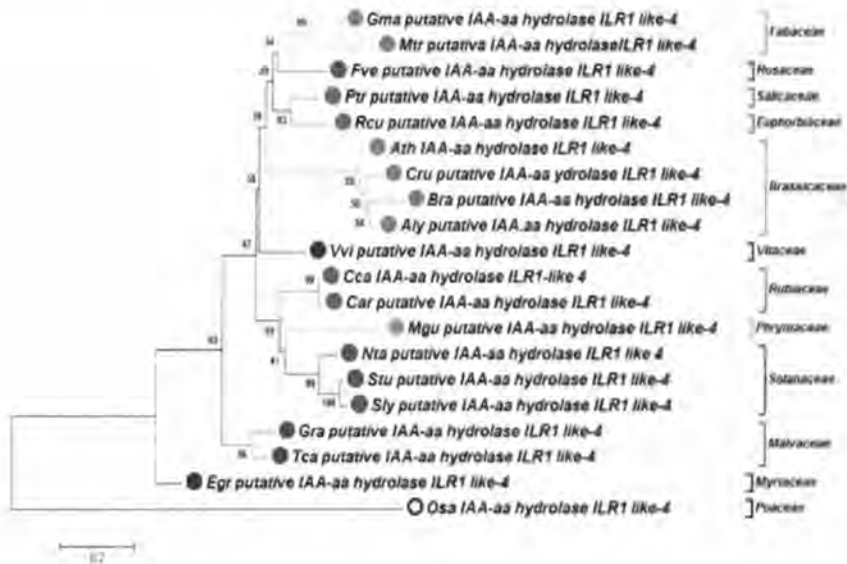
La historia evolutiva para el gen *ILR1 like-2* (Figura 2.5) fue deducida usando el método del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 4.99487116. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agrupan en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas) (Felsenstein, 1985). El árbol fue realizado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades a aquellas distancias evolutivas que fueron utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993) y se reportan en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. La tasa de variación entre sitios fue diseñada con una distribución Gamma (parámetro de forma = 0.66). El análisis involucró 15 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contenían "gaps" y datos ausentes fueron eliminadas. En total fue de 747 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo fue realizado en el programa MEGA v6 (Tamura et al., 2013).



**Figura. 2.5** Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 2 de *C. canephora* mediante el método del vecino más cercano. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agrupan en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas).

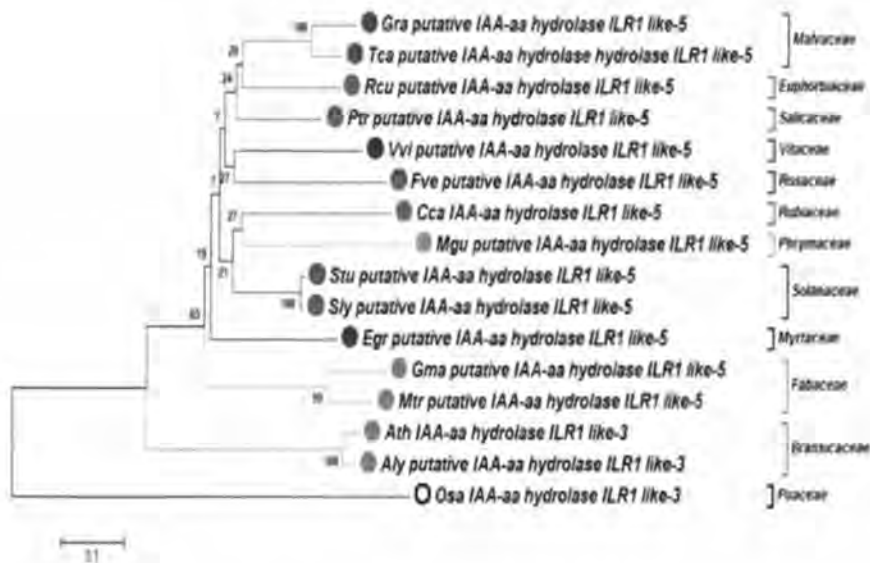
La historia evolutiva para el gen *JAR3* (Figura 2.6) fue deducida usando el método del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 4.01053279. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agruparon juntos en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas) (Felsenstein, 1985). El árbol fue realizado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades a aquellas distancias evolutivas que fueron utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Kimura 2 (Kimura, 1980) y se reportan en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. La tasa de variación entre sitios fue diseñada con una distribución Gamma (parámetro de forma = 0.49). El análisis involucró 20 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contenían "gaps" y datos ausentes fueron eliminadas. Fue un total de 535 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo fue realizado en el programa MEGA v6 (Tamura et al., 2013).

La historia evolutiva para el gen ILR1 like 5 (Figura 2.7) fue deducida usando el método del vecino más cercano (Saitou y Nei, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 3.57338885. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agruparon juntos en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas) (Felsenstein, 1985). El árbol fue realizado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades a aquellas distancias evolutivas que fueron utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Kimura 2 (Kimura, 1980) y se reportan en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. La tasa de variación entre sitios fue diseñada con una distribución Gamma (parámetro de forma = 0.68). El análisis involucró 16 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contenían "gaps" y datos ausentes fueron eliminadas. En total fueron 598 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo fue realizado en el programa MEGA v6 (Tamura et al., 2013).



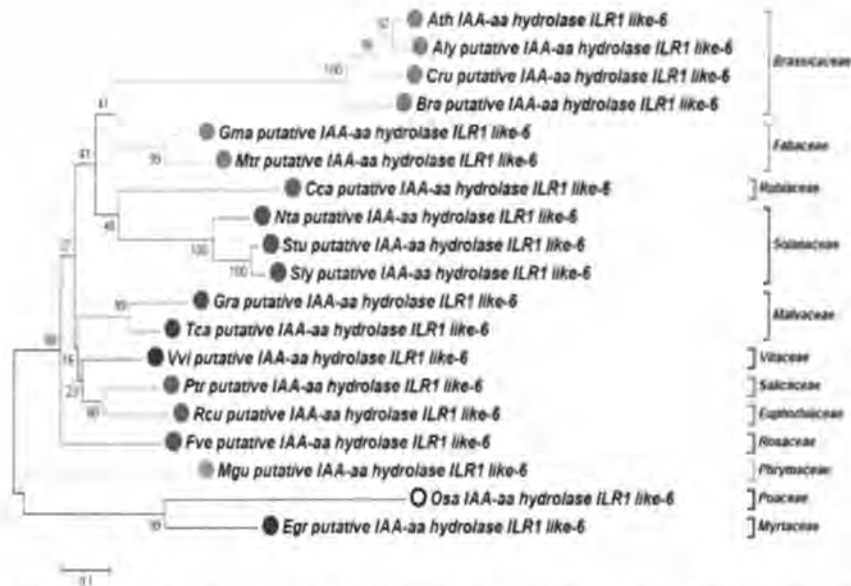
**Figura. 2.6** Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen IAR3 de *C. canephora* mediante el método del vecino más cercano. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agrupan en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas).





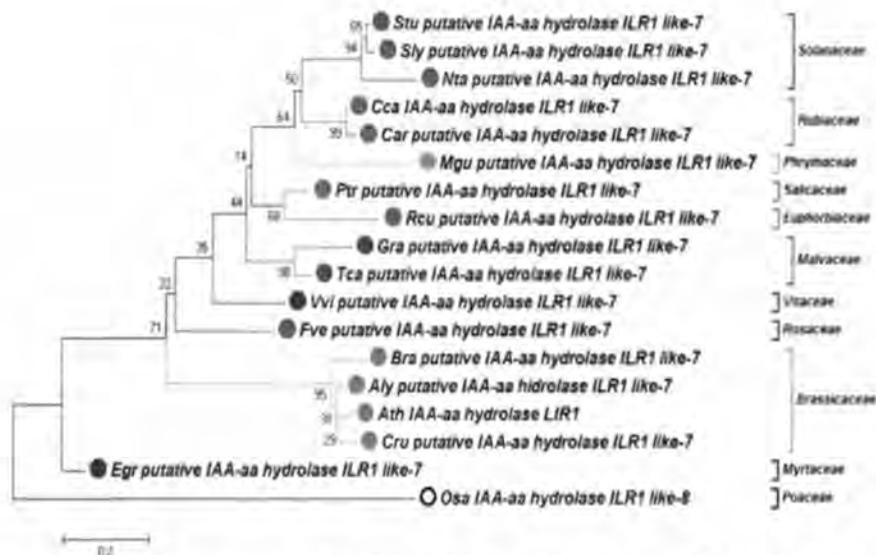
**Figura. 2.7** Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 5 de *C. canephora* mediante el método del vecino más cercano. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agrupan en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas).

La historia evolutiva para el gen ILR1 like 6 (Figura 2.8) fue deducida usando el método "Neighbor-Joining" (Saitou y Nei, 1987). El árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 4.42271039 son mostrados. El porcentaje de réplicas del árbol al cual los taxones fueron asociados y agrupados juntos en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas) son mostrados junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol fue realizado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades a aquellas distancias evolutivas que fueron utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Kimura 2 (Kimura, 1980) y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. La tasa de variación entre sitios fue diseñada con una distribución Gama (parámetro de forma = 0.42). El análisis involucró 19 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contenían "gaps" y datos ausentes fueron eliminadas. Fue un total de 836 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo fue realizado en el programa MEGA v6 (Tamura et al., 2013).



**Figura. 2.8** Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 6 de *C. canephora* mediante el método del vecino más cercano. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agrupan en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas).

La historia evolutiva para el gen ILR1 like 7 (Figura 2.9) fue deducida usando el método "Neighbor-Joining" (Saitou y Nei, 1987). El árbol óptimo con la suma de la longitud de las ramas = 4.00803586 son mostrados. El porcentaje de réplicas del árbol al cual los taxones fueron asociados y agrupados juntos en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas) son mostrados junto a las ramas (Felsenstein, 1985). El árbol fue realizado a escala, con la longitud de las ramas en las mismas unidades a aquellas distancias evolutivas que fueron utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método Kimura 2 (Kimura, 1980) y están en las unidades del número de sustituciones de base por sitio. La tasa de variación entre sitios fue diseñada con una distribución Gama (parámetro de forma = 0.71). El análisis involucró 18 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contenían "gaps" y datos ausentes fueron eliminadas. Fue un total de 177 posiciones en la base de datos final. El análisis evolutivo fue realizado en el programa MEGA v6 (Tamura et al., 2013).



**Figura. 2.9** Análisis de secuencias ortólogas de ADN del gen ILR1-like 7 de *C. canephora* mediante el método del vecino más cercano. También se muestra el porcentaje (junto a las ramas) de réplicas del árbol al cual se asociaron los taxones y que agrupan en el ensayo del "bootstrap" (5,000 réplicas).

El análisis filogenético para cada una de las seis ILRs analizadas muestra que para los casos de las rubiáceas y solanáceas, los genes que codifican a estas enzimas se encuentran muy cerca evolutivamente (Figs. 10 - 15). También se puede apreciar que los genes agruparon en clados según la familia de especies. En todos los casos el gen que codifica a las hidrolasas de arroz, una monocotiledónea, fue el más alejado evolutivamente del resto de las hidrolasas (grupo externo). El gen que codifica a la hidrolasa IAR3 fue el gen que mostró las mayores divergencias con los otros cinco genes.



### 2.3.4 Cebadores

Para el análisis de la expresión de los genes que codifican a las ILRs se diseñaron cebadores específicos para cada uno de ellos. Es importante mencionar que esta parte de la investigación se realizó antes de que se publicara el genoma completo de *C. canephora*. Se utilizó como modelo la presencia de hidrolasas en *A. thaliana*.

Todos los cebadores fueron diseñados a partir de las secuencias para *ILRs* que se encuentran depositadas para *C. canephora* en la base de datos Sol Genomics Network. *ILL3* fue el único caso en el que no se reportaron unigenes o ESTs para *C. canephora* en las bases de datos (después de la secuenciación de su genoma sabemos que no tiene este gen). Sin embargo, se encontró un unigen de una posible *ILL3* en *N. tabacum*; además, se cuenta con la secuencia que posiblemente sea un *ILL3* de *S. lycopersicum*. Asumimos que por ser de familias cercanas es posible encontrar la secuencia del gen *ILL3* en *C. canephora* diseñando cebadores de secuencias consenso.

**Cuadro 2. 9** Cebadores para los genes *ILR1*, *ILL2*, *ILL3*, *IAR3* e *ILL6*.

Nombre	Secuencia	Tm NN	Tamaño
<i>ILR1</i> <i>C. canephora</i>	F 5'-CTGGAGAATACGGTGGTTTC-3'	60.9 °C	782 pb
	R 5'-ATCACATTTCTGCTTGACC-3'	61.5 °C	
<i>ILL2</i> <i>C. canephora</i>	F 5'-GCCATACCAGTCTGCTTGG-3'	63.3 °C	528 pb
	R 5'-GTCCTTCGCTCCTTCACCT-3'	63.4 °C	
<i>IAR3</i> <i>C. canephora</i>	F 5'-ATATGGGTGTTTCCAGATGG-3'	61.0 °C	389 pb
	R 5'-GGATTTTTGCTCTTGTGCTC-3'	61.3 °C	
<i>ILL6</i> <i>C. canephora</i>	F 5'-GAGGAAGATCCATCAGAACC-3'	60.0 °C	554 pb
	R 5'-CGACAGAGTGATGAGGATTC-3'	59.8 °C	
<i>ILL3</i> <i>C. canephora</i>	F 5'-ACCAAGTCTCTGATTCGTAG-3'	59.5 °C	1063 pb
	R 5'-ACATCTCTGCTATGGCTGTG-3'	60.5 °C	

### 2.3.5 Extracción del ARN total

Antes de la obtención del ADNc, se realizó la extracción del ARN total de las muestras colectadas los días -14 dai, -7 dai, 0 dai, 0.5 dpi, 1 h dpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi y 21 dpi de acuerdo con la metodología descrita anteriormente. Se utilizó un NanoDrop 2000 para medir la pureza del ARN. Posteriormente, las muestras fueron almacenadas en alicuotas de 5  $\mu$ L en tubos de PCR a una temperatura de  $-80$  °C hasta su posterior uso.

**Cuadro 2.10** Extracción de ARN total de los puntos del muestreo durante la inducción de la ES en *C. canephora* por el método del TRIzol Reagent. (dpi = días post inducción). Color rosa: tejido en medio de pre-acondicionamiento. Color verde: tejido en medio de inducción de la ES.

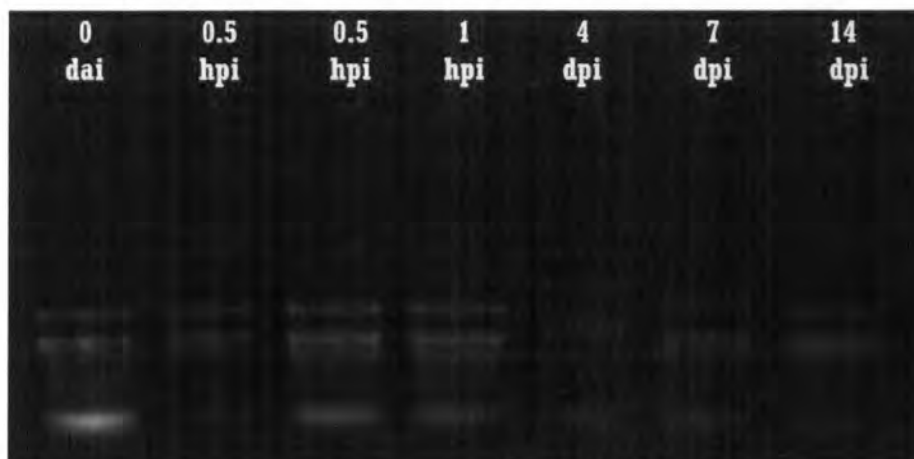
Muestra	[ng/ $\mu$ L]	Absorbancia 260/280
-14 dai	1307.2	2.00
-7 dai	634.9	1.89
0 dai	626.3	1.88
0.5 hpi	354.3	1.83
1 hpi	316.5	2.05
4 dpi	663.6	1.99
7 dpi	1742	2.04
14 dpi	723.5	2.03

La extracción de ARN total fue realizada por el método de Trizol Reagent, utilizando 100 mg de tejido foliar por cada punto de muestreo. En el Cuadro 2.10 se aprecia que las muestras de las cuales se extrajo la mayor cantidad de ARN fue de los días -14 dai, 7 dpi y 21 dpi y en menor cantidad de las muestras 0.5 hpi y 1 hpi, respectivamente. El grado de pureza de las extracciones se encontró en el rango óptimo y fue similar entre todas las extracciones.



**Figura. 2.10** Extracción de ARN de los explantes foliares de *C. canephora* durante el proceso de inducción de la ES. Días -14, -7 y 0 de preacondicionamiento y 0.5 hpi, 1 hpi y 4dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Gel de agarosa 1%/80 voltios/30 minutos.

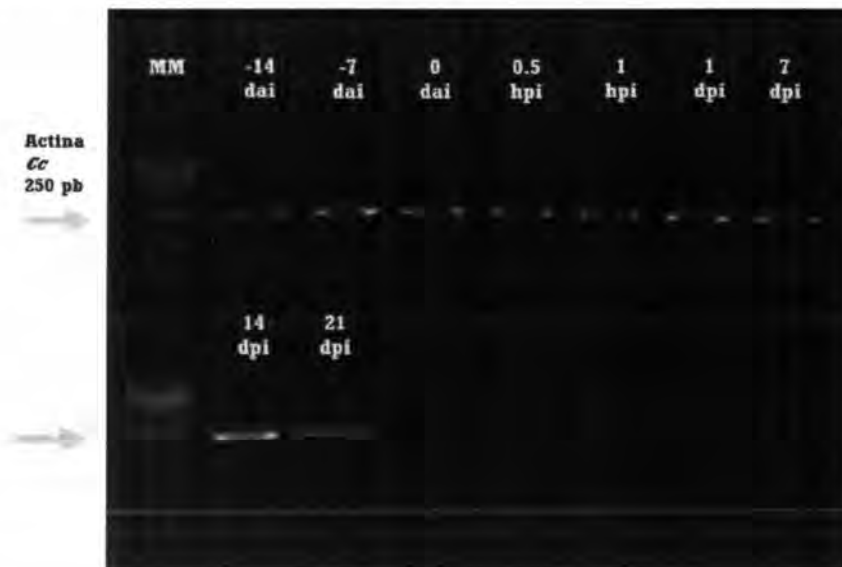
En la Figura 2.10 se puede observar la integridad del ARN total aislado de los diferentes puntos clave del proceso de embriogénesis somática en *C. canephora*. La integridad fue observada en un gel de agarosa al 1% a 80 Volts durante 30 min, colocando 1  $\mu$ L de ARN total por cada pocillo. Esta comprobación de la pureza aunada a la comprobación de la integridad, dieron pie para la posterior síntesis de ADN complementario.



**Figura. 2.11** Extracción de ARN de explante foliar de *C. canephora* durante el proceso de inducción de la ES. Día cero de pre-acondicionamiento, 0.5 hpi, 1 hpi y 4 dpi, 7 dpi y 14 dpi. Gel de agarosa 1%/80 voltios/30 minutos.

### 2.3.6 Síntesis del ADN complementario

La síntesis del ADNc se realizó utilizando como templado el ARNm del curso temporal (-14 dai, -7 dai, 0 dai, 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi) de la ES en *C. canephora* (Figura 2.12). El producto de la síntesis fue utilizado como templado para una reacción de PCR de punto final usando al gen constitutivo que codifica a la actina como testigo positivo (250 pb). El producto de la reacción fue corrido en un gel de agarosa al 1% a 80 voltios durante 30 min. Las condiciones del PCR se muestran en la Figura 2.13.



**Figura. 2.12** Producto de PCR del gen constitutivo de actina y de los días -14 dai, -7 dai y 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi y 21 dpi. Gel de agarosa al 1%/80 voltios/30 minutos.

Esta actividad fue realizada para asegurar que la ausencia del gen de interés no se debiera a la mala síntesis del ADNc, por lo cual, de ser satisfactoria la síntesis, otorgaría dos posibles panoramas: la ausencia o presencia del gen dependería entonces del correcto o incorrecto diseño de cebadores, la ausencia debido a que no se encontraba en cierto punto clave de muestreo o bien, la ausencia de la participación de gen para este proceso biológico.

Condiciones (35 ciclos)		
Des. inicial	95 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	35 s
Alineamiento	52 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Ext. final	72 °C	10 min
Mantenimiento	4 °C	∞

**Figura. 2.13** Condiciones de PCR para los diversos templados de ADNc con el gen constitutivo que codifica al gen de la actina.

Las condiciones para una reacción de PCR son fundamentales para el éxito de la técnica. El rango de temperatura para la amplificación del gen constitutivo que codifica a la actina es muy amplio; para esta actividad la temperatura utilizada fue de 52 °C, pero se ha utilizado hasta una temperatura de 63 °C.

### 2.3.7 Perfiles de expresión de los genes *ILR1 Cc.*, *ILL2 Cc.*, *CcIAR3 Cc.*, *ILL6 Cc.* e *ILL3 Cc.*

La reacción de PCR de punto final se realizó para comprobar la presencia o ausencia de expresión de los genes que codifican a las hidrolasas y su intervención en el proceso de ES en *C. canephora*. Para esto, cada juego de cebadores fue utilizado independientemente, tanto *ILL2*, *IAR3*, *ILL6* e *ILR1* fueron utilizados en el curso completo de la inducción. Las condiciones de la reacción fueron descritas en la sección de materiales y métodos. Se utilizó el gen constitutivo que codifica a la actina como testigo positivo que amplifica un fragmento de 250 pb. Para el caso de *ILL2*, se utilizó el mismo gen que codifica para actina pero el fragmento amplificado es de 130 pb. También se realizó un testigo negativo con todos los componentes de la reacción sin templado.

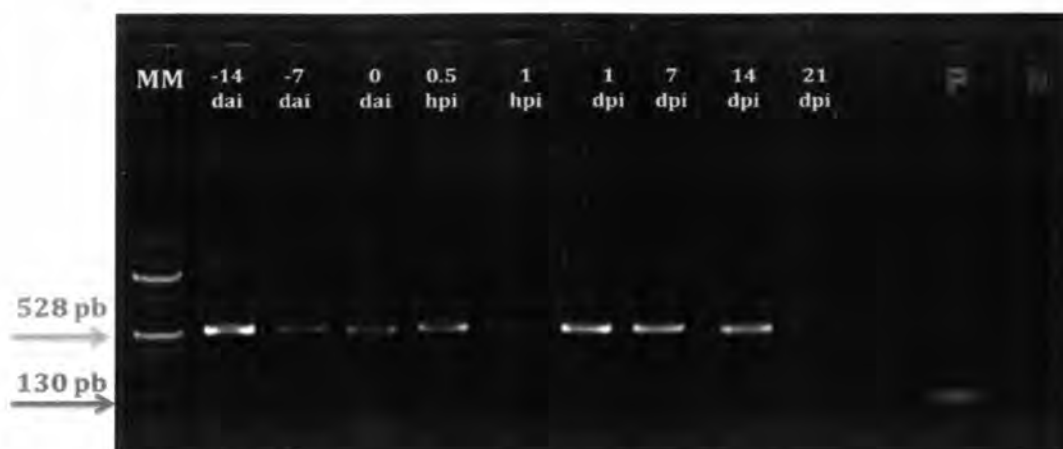
*ILR1* amplificó un fragmento de 782 pb, *ILL2* amplificó un fragmento de 528 pb, *IAR3* amplificó un fragmento de 389 pb e *ILL6* amplificó un fragmento de 550 pb. Todos los resultados de las reacciones fueron corridos en un gel de agarosa al 1% a 60 voltios

durante 60 minutos. El carril número 1 correspondió al marcador de masa molecular; los carriles 2 a 10 correspondieron a los puntos utilizados de muestreo y en los cuales se centró nuestro análisis, el carril 12 correspondió al testigo positivo y el carril 13 correspondió al testigo negativo. La discusión de los resultados se encuentra en el apartado del mismo nombre.



**Figura. 2.14** Perfil de expresión del gen ILR1 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, día 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Flecha azul: fragmento amplificado a un tamaño de 780 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (250 pb). P: testigo positivo. N: testigo negativo.

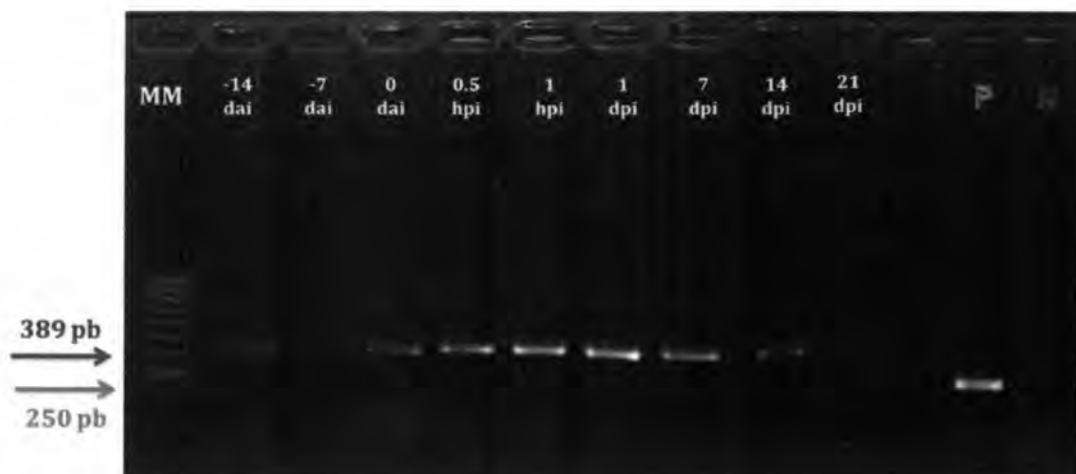
El gen ILR1 (Figura 2.14) se expresó durante los días en los cuales el explante se encontraba en condiciones de mantenimiento, a partir de los primeros 7 y 14 días posteriores al proceso de pre-acondicionamiento, este nivel de expresión baja, incluso hasta las 0.5 h y 1 h posterior al proceso de inducción; sin embargo, el nivel de expresión aumentó drásticamente a partir del día uno posterior a la inducción. Este incremento fue atenuado conforme transcurrieron los días en el medio de inducción hasta alcanzar el día 21. Es importante notar el dramático cambio ocurrido a partir del día uno hasta el día siete.



**Figura. 2.15** Perfil de expresión ILL2 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Flecha verde claro: fragmento amplificado de un tamaño de 528 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (130 pb). P: testigo positivo. N: testigo negativo.

Al igual que el gen *ILR1*, el gen *ILL2* se expresó durante los días en los cuales el explante se encontraba en condiciones de mantenimiento (Figura 2.15), el nivel de expresión de transcritos es atenuado conforme transcurren los 14 días en el medio de pre-acondicionamiento y se mantuvo hasta la primer hora posterior al cambio en medio de inducción; sin embargo, ocurrió un aumento de expresión de transcritos a partir del día uno posterior a la inducción. Es importante notar el nivel bajo de expresión de transcritos una vez alcanzado el día 21 después de la inducción.

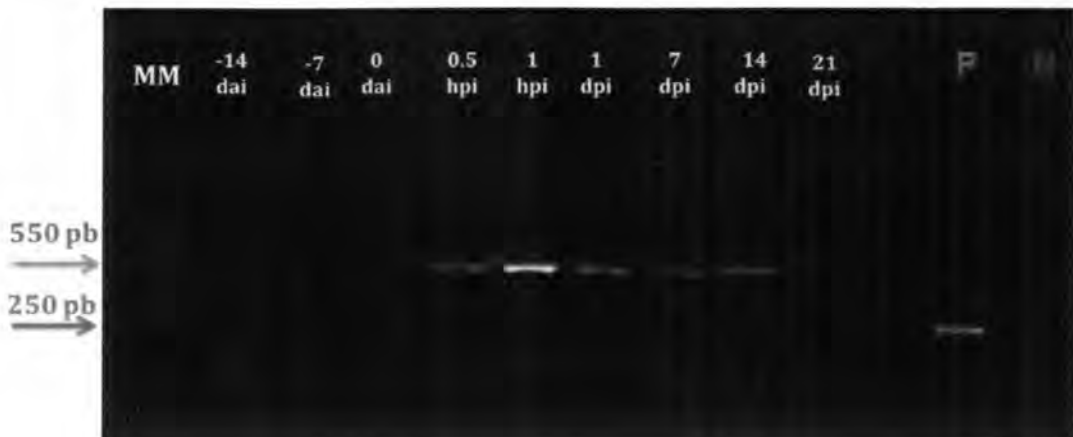




**Figura. 2.16** Perfil de expresión de IAR3 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Flecha roja: fragmento amplificado de 390 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (250 pb). P: testigo positivo. N: testigo negativo.

El nivel de expresión de IAR3 (Figura 2.16), en los cuales el explante es mantenido en condiciones de mantenimiento fue similar entre los días -14 y -7 anteriores a la inducción, inclusive se mantuvieron ligeramente mayores en el día 0, posteriormente el incremento en la expresión de los transcritos incrementó a partir de las 0.5 h, alcanzando su máxima expresión en el día uno. Este incremento fue drásticamente atenuado una vez alcanzado el día 21. Es importante notar el cambio dramático ocurrido a partir de las 0.5 h hasta el día 14 posterior a la inducción.

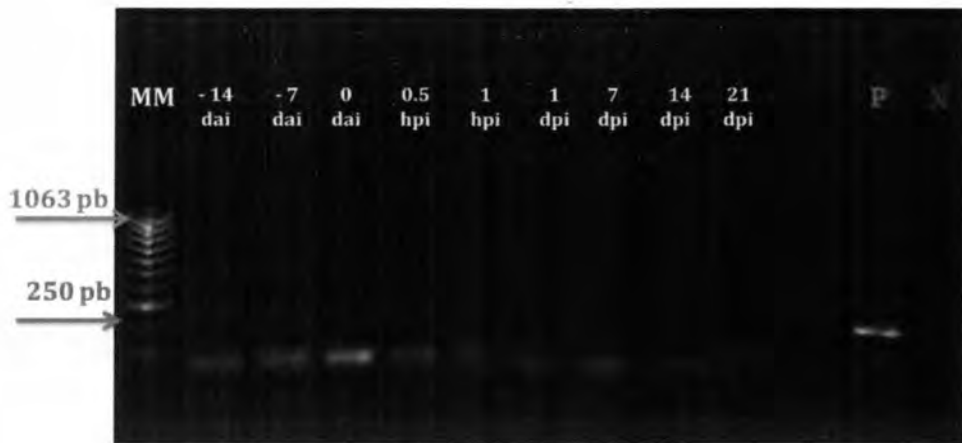




**Figura. 2.17** Perfil de expresión del gen ILL6 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Flecha morada: fragmento amplificado a un tamaño de 550 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina a un tamaño de 250 pb. P: testigo positivo. N: testigo negativo.

El nivel de expresión de ILL6 (Figura 2.17) no fue apreciable durante toda la etapa de pre-acondicionamiento; sin embargo, el nivel de expresión fue muy notorio y marcado justo después de que el explante se encontraba en el medio de inducción de la ES. Este incremento fue drásticamente atenuado una vez alcanzado el día 21. Es importante notar el cambio dramático ocurrido a partir de que el explante fue sometido a condiciones de inducción. Este resultado bien podría servir como un futuro marcador del proceso de ES en *C. canephora*.

Es posible que estas coincidencias en la expresión de transcritos durante el cambio del explante al medio de inducción, sirvan para amortiguar el cambio tan drástico del medio de pre-acondicionamiento al medio de inducción a ES hasta alcanzar la homeostasis del AIA endógeno en el día 21.



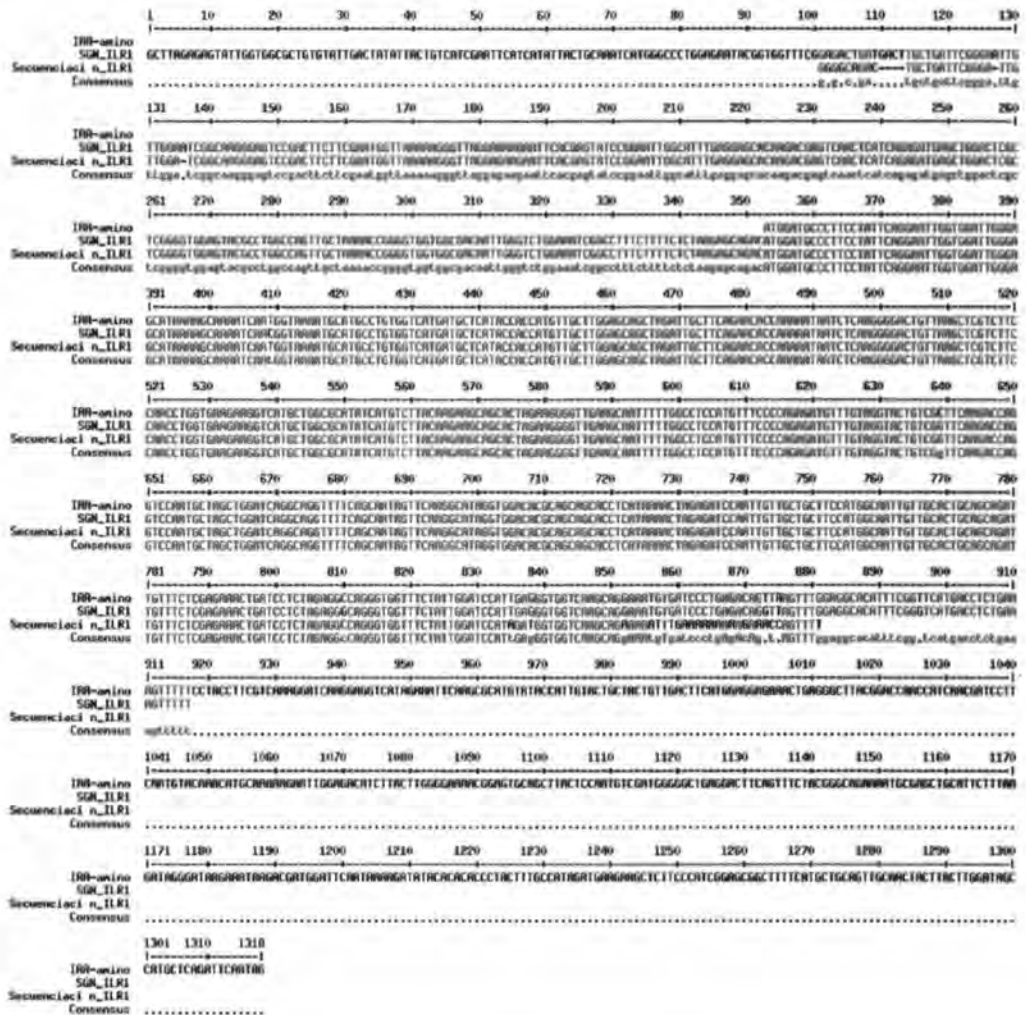
**Figura. 2.18** Perfil de expresión de ILL3 Cc. Pre-acondicionamiento: -14 dai, -7 dai, 0 dai. Inducción: 0.5 hpi, 1 hpi, 1 dpi, 7 dpi, 14 dpi, 21 dpi. dpi: días posteriores a la inducción. Flecha café: fragmento esperado a un tamaño de 1063 pb. Flecha verde: testigo positivo del gen que codifica a la actina (250 pb). P: Testigo positivo. N: Testigo negativo.

### 2.3.8 Secuenciación

Secuencias *ILR1 Cc*, *ILL2 Cc*, *IAR3 Cc* e *ILL6 Cc* obtenidas de la secuenciación en MACROGEN Company alineadas con la secuencia problema y la secuencia del genoma de *C. canephora*.

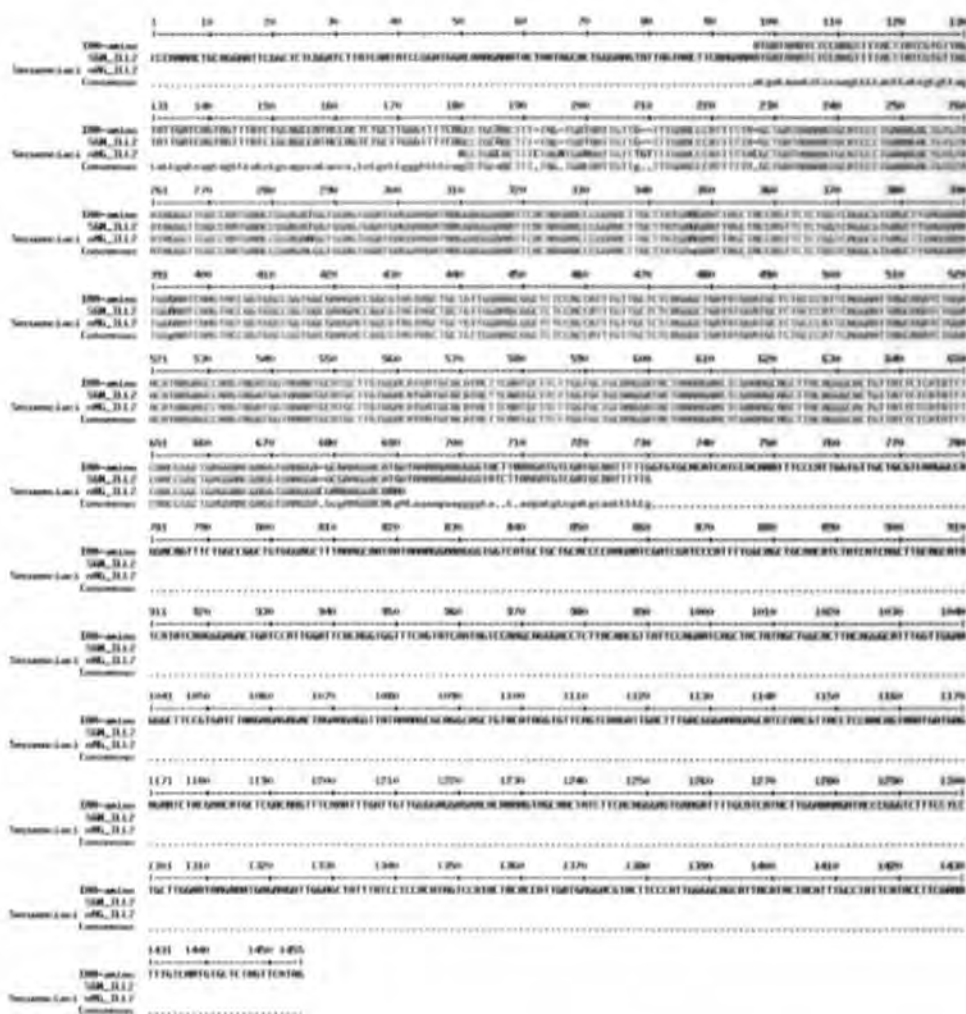
Para la secuenciación de los fragmentos observados se realizó la purificación de cada fragmento de interés de acuerdo al protocolo del Zymoclean™ DNA recovery Kit. Los productos de la purificación fueron ajustados a una concentración de  $50 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  y a un volumen que fuera  $\geq$  a  $20 \mu\text{L}$ , de acuerdo a las recomendaciones de la compañía MACROGEN.

La comprobación en cuanto al correcto diseño de los cebadores, la amplificación de un producto específico y sobre todo el correcto alineamiento de las secuencias en comparación con las secuencias obtenidas de la página de Sol Genomics Network, *ILL2* (SGN-U625779), *IAR3* (SGN-U628177), *ILL6* (SGN-U624774) e *ILR1* (SGN-U624166) así como las secuencias obtenidas en el genoma (*Cc06\_g10900 ILR1-like 1*, *Cc11\_g14190 ILR1-like 2*, *Cc04\_g02290 ILR1-like 4*, *Cc02\_g00710 ILR1-like 5*, *Cc10\_g12030 ILR1-like 6* e *Cc06\_g06300 ILR1-like 7*) permitió confirmar la veracidad de los resultados anteriormente presentados. Como se muestra en las Figuras 2.19-2.22. Estas secuencias pertenecen a la familia amidohidrolasas en *C. canephora*.



**Figura. 2.19** Alineación del gen completo de *C. canephora* ILR1 con el resultado de la muestra secuenciada ILR1 y la secuencia ILR1 de la base de datos Sol Genomics Network. El alineamiento fue realizado en el programa Multalin versión 5.4.1.

El alineamiento entre la secuencia de *ILR1* enviada a secuenciar, la *ILR1* depositada en la página de Sol Genomics Network y la secuencia del gen *ILR1* en la base de datos del genoma de *C. canephora* demuestran la efectividad en el desarrollo de las técnicas previas a este resultado de secuenciación; además, los resultados comprueban que el fragmento obtenido se encuentra más cercano al extremo 5' y de igual forma, abarca parte de la secuencia de la región codificante.



**Figura. 2.20** Alineación del gen completo de *C. canephora* ILL2 con el resultado de la muestra secuenciada ILL2 y la secuencia ILL2 de la base de datos Sol Genomics Network. El alineamiento fue realizado en el programa Multalin versión 5.4.1.

El correcto alineamiento entre el gen secuenciado, el depositado en la base de datos Sol Genomics Network así como en la base de datos del genoma de *C. canephora*, confirma que el gen ILL2 interviene durante el proceso de ES en *C. canephora*; además, los resultados comprueban que el fragmento obtenido se encuentra más cercano al extremo 5' y abarca parte de la codificante.

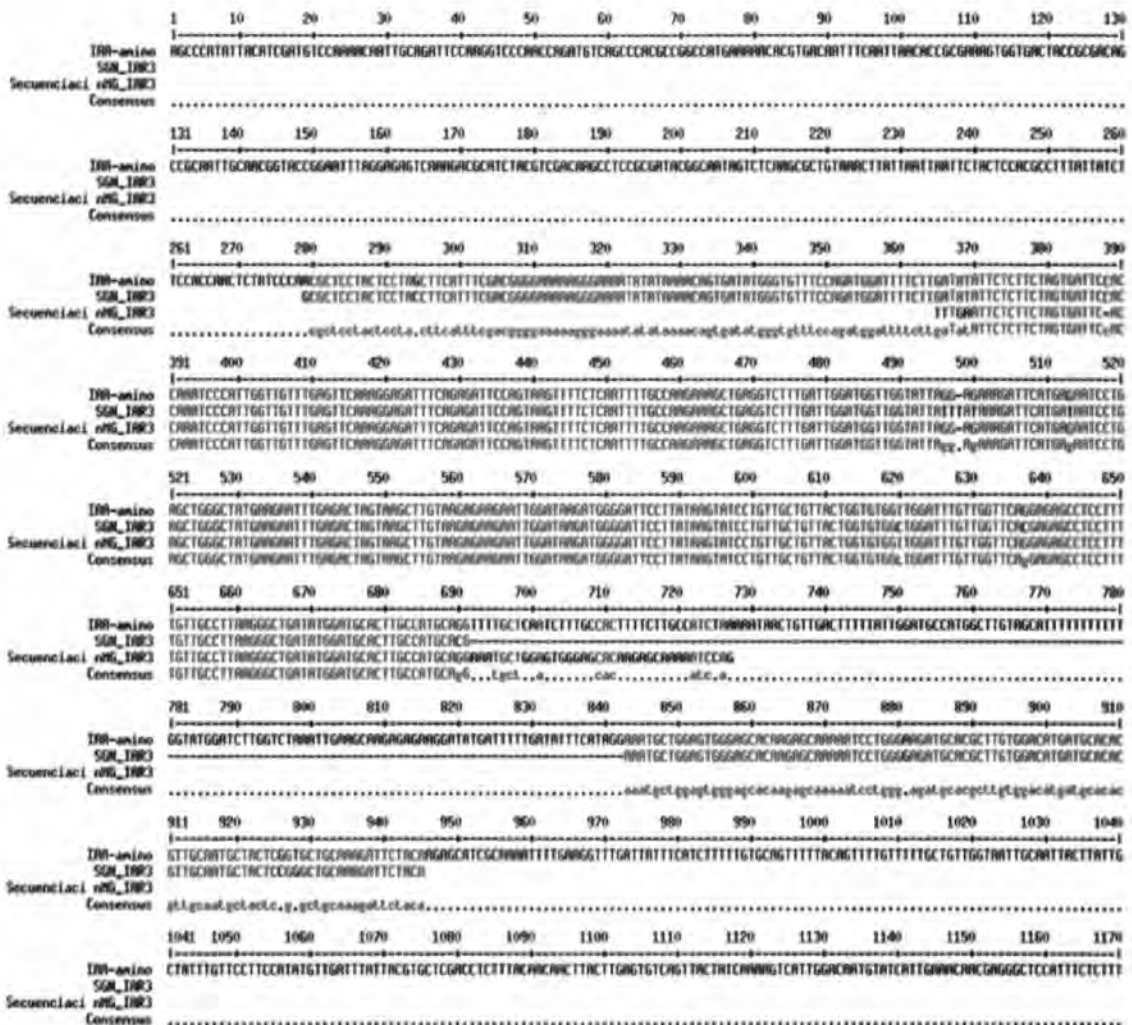


Figura. 2.21 Alineación del gen completo de *C. canephora* IAR3 con el resultado de la muestra secuenciada IAR3 y la secuencia IAR3 de la base de datos Sol Genomics Network. El alineamiento fue realizado en el programa Multalin versión 5.4.1.

El resultado de la secuenciación alinea correctamente con la secuencia depositada en la base de datos Sol Genomics Network para el gen *IAR3* y de igual forma para la secuencia del gen *IAR3* en la base de datos de *C. canephora*; además, los resultados comprueban que el fragmento obtenido se encuentra más cercano al extremo 5' y abarca parte de la región codificante.





## 2.4. DISCUSIÓN

El análisis *in silico* fue llevado de la siguiente manera: mediante herramientas bioinformáticas se realizó un estudio detallado para determinar la filogenia genómica de la familia de amidohidrolasas ILR, utilizando como modelo de estudio la evolución molecular y los cambios entre diferentes eudicotiledóneas. *Oryza sativa* fue la única monocotiledónea incluida en este análisis y fue tomada como grupo externo en la realización de todos los árboles.

El estudio fue dirigido para observar cómo los genes cambian a través del tiempo entre especies y familias que están cercana o lejanamente relacionadas. En *A. thaliana* *ILL5* es un aparente pseudogen de *IAR3* (LeClere et al., 2002), por lo que no se contempló en esta investigación ya que podría causar redundancia en nuestros resultados. De acuerdo a los diversos análisis se logró inferir el número de integrantes que podría contener cada árbol, siendo *IAR3* quien contenía el mayor número, lo cual concuerda con lo reportado previamente (Campanella et al., 2003). En este estudio se sugiere que *IAR3* es el miembro más conservado de esta familia de genes. Además, se propone que *ILL3* es el miembro que se encuentra menos conservado, lo cual podría ser una explicación por el cual no existe este integrante en la familia de amidohidrolasas en *C. canephora*.

A pesar de que *ILL1* contiene el menor número de integrantes, se sugiere una alta conservación de los integrantes *ILL1* e *ILR1*. De esta manera, tanto *IAR3* como *ILL1* e *ILR1* pueden haber jugado algún papel durante la evolución de las plantas superiores (Campanella et al., 2003).

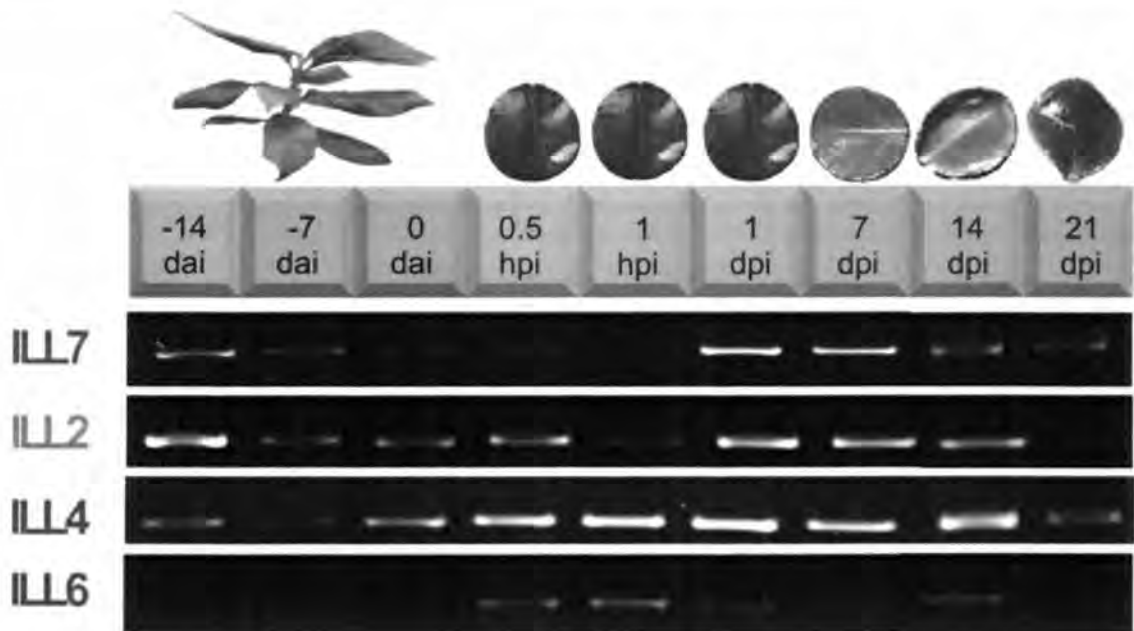
Al realizar el alineamiento del gen *ILL5* con respecto al genoma de *A. thaliana*, se observó que éste tenía una mayor relación con el gen *ILL3* de *A. thaliana*, por lo que para la especie *A. lyrata* la nomenclatura utilizada en el árbol *ILL5* fue de posible *ILL3*. En los arboles *ILL1*, *ILL5* e *ILR1* se optó por utilizar una hidrolasa de *O. sativa* con una nomenclatura diferente al gen al que pudiera pertenecer el árbol, debido a que sus respectivas secuencias ocasionaban que el árbol pudiese interpretarse erróneamente. Este hecho no modifica el fin por el cual es empleado el grupo externo, ya que *O. sativa* fue escogida por ser monocotiledónea.



En este trabajo, salvo las especies de *A. thaliana*, *C. canephora* y *O. sativa*, todas las demás secuencias se nombraron con el prefijo de "posible".

En la base de datos Sol Genomics Network, se pudieron obtener al menos 4 posibles amidohidrolasas de *C. canephora*: ILR1 (SGN-U624166), ILL2 (SGN-U625779), IAR3 (SGN-U628177) e ILL6 (SGN-U624774), las cuales sirvieron como punto de referencia en el diseño de cebadores y en diversos análisis de alineamiento múltiple de secuencias.

La parte experimental fue realizada partiendo de extracciones de ARN de todas las muestras de los puntos específicos a analizar para posteriormente obtener el ADN complementario. La siguiente imagen resume la participación de todas las amidohidrolasas evaluadas en este trabajo.



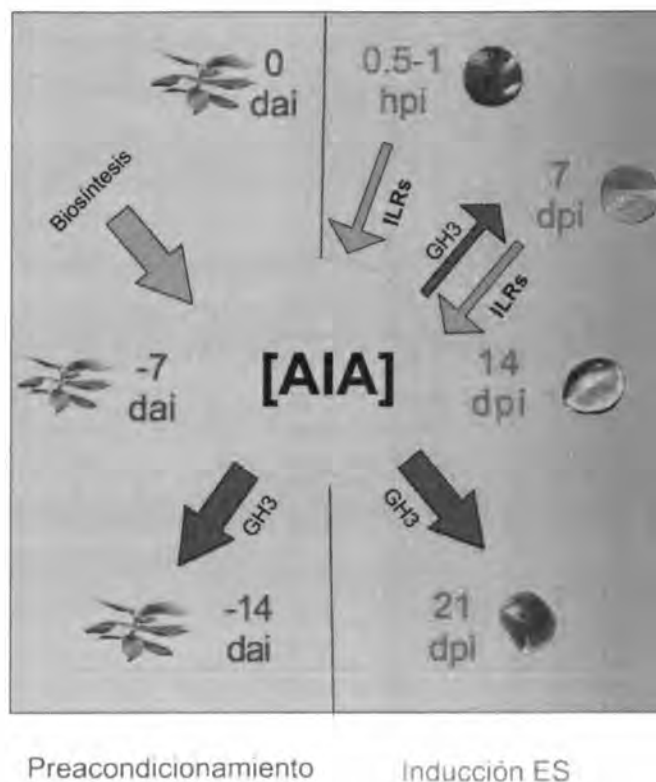
**Figura. 2.23** Participación de las amidohidrolasas en el proceso de preacondicionamiento (color rosa) e inducción a ES en *C. canephora* (color verde claro). En la parte superior se localiza el seguimiento temporal del explante foliar en todo el proceso de la ES. En la parte inferior se encuentra una relación en los niveles de expresión de cada una de las amidohidrolasas analizadas en este trabajo y en el cual pudieran estar involucradas en la regulación de los niveles endógenos del AIA, dando como resultado los cambios morfológicos hasta alcanzar la formación de la masa proembriogénica en el borde del explante foliar.

En la Figura 2.23, se puede apreciar que en plantas que se encuentran en medio MS sin reguladores del crecimiento (día -14), existe un cierto nivel de expresión, por lo cual se interpreta que en condiciones de mantenimiento, las amidohidrolasas están mediando diferentes necesidades fisiológicas en cuanto al aporte de auxina de la plántula previo a someterse al medio de pre-acondicionamiento. Durante los tiempos posteriores al proceso de inducción, *ILL1* e *ILL2* muestran su mayor expresión durante el primer día y los 7 días posteriores a la inducción. *IAR3* e *ILL6* durante la 0.5 h hasta las 24 h.

Es interesante mencionar que la expresión de *ILL6* claramente comienza justo después del cambio del explante del medio de pre-acondicionamiento al medio de inducción de la ES. En todos los casos el nivel de expresión disminuye una vez concluido el proceso completo de inducción de la ES en *C. canephora*.

Los perfiles de expresión de *ILR1* e *ILL6* fueron los esperados si se toma en cuenta la interpretación de que se ha quitado la auxina del medio de inducción, por lo que se infiere que la célula realiza un intento de aporte activando su homeostasis desde las primeras horas hasta el periodo de inducción a ES. De igual forma, otra posible explicación sería que al momento de que el ácido indol acético es liberado a su forma activa, éste se conjuga inmediatamente. Resultado coherente con lo reportado en la regulación de los conjugados de AIA-Ala (Ayil-Gutiérrez et al., 2013) y con la posibilidad de que varios miembros de la familia GH3 contribuyan a esta regulación tanto de manera reversible como irreversible.

*IAR3* por su parte, tiene dos posibles explicaciones, si bien es cierto que puede tener actividad de hidrolasa y que lo reportado para *A. thaliana* es que su sustrato de especificidad es el conjugado de AIA-Ala (LeClere et al., 2002; Davies et al., 1999), también existe la posibilidad de que participe en una ruta alterna que involucra una señalización para liberar JA en respuesta a la herida causada por daño mecánico en la hoja (Widemann et al., 2013). Posiblemente existe una relación entre la homeostasis de las auxinas y la respuesta a herida (Titarenko et al., 1997)(Titarenko et al., 1997)(Titarenko et al., 1997).



**Figura. 2.24** Modelo representativo de las regulaciones endógenas de AIA mediada por su conjugación y la posible hidrólisis de conjugados durante la embriogénesis somática en *C. canephora*. Proceso de pre-acondicionamiento (rojo claro) y proceso de inducción (verde claro). Flechas azules gruesas, alto incremento en la concentración del ácido indol acético debido al proceso de biosíntesis. Flechas rojas gruesas, incremento en la conjugación, mediada por los genes de la familia *GH3*. Flecha azul delgada: inicios de la participación de amidohidrolasas de conjugados de ácido indol acético como respuesta a un primer aporte de auxina para mantener la concentración endógena en homeostasis. Flecha roja delgada: disminución en conjugación mediada por los genes de la familia *GH3*.

Es posible que la asociación entre la participación de los conjugados del AIA aunado con la intervención de amidohidrolasas de la familia ILR, sea crucial para el proceso de inducción de la ES en *C. canephora*, debido a las regulaciones endógenas que se han demostrado para mantener una homeostasis (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

Nuestros datos apoyan la hipótesis de que, en cierto momento, durante la ES en *C. canephora*, existe la participación de amidohidrolasas de conjugados de auxina, que intervienen en los primeros momentos de la inducción y que disminuye conforme se alcanza la homeostasis y ocurren los cambios en la reprogramación celular que llevan a la formación de la masa proembriogénica.

## 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.
- Campanella, J. J., D. Larko y J. Smalley (2003). A molecular phylogenomic analysis of the ILR1-like family of IAA amidohydrolase genes. *Comparative and Functional Genomics*, 4, 584-600.
- Davies, R. T., D. H. Goetz, J. Lasswell, M. N. Anderson y B. Bartel (1999). IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *The Plant Cell*, 11, 365-376.
- Denoeud, F., L. Carretero-Paulet, A. Dereeper, G. Droc, R. Guyot, M. Pietrella, C. Zheng, A. Alberti, F. Anthony, G. Aprea, J. M. Aury, P. Bento, M. Bernard, S. Bocs, C. Campa, A. Cenci, M. C. Combes, D. Crouzillat, C. Da Silva, L. Daddiego, F. De Bellis, S. Dussert, O. Garsmeur, T. Gayraud, V. Guignon, K. Jahn, V. Jamilloux, T. Joët, K. Labadie, T. Lan, J. Leclercq, M. Lepelley, T. Leroy, L. T. Li, P. Librado, L. Lopez, A. Muñoz, B. Noel, A. Pallavicini, G. Perrotta, V. Poncet, D. Pot, Priyono, M. Rigoreau, M. Rouard, J. Rozas, C. Tranchant-Dubreuil, R. VanBuren, Q. Zhang, A. C. Andrade, X. Argout, B. Bertrand, A. De Kochko, G. Graziosi, R. J. Henry, Jayarama, R. Ming, C. Nagai, S. Rounsley, D. Sankoff, G. Giuliano, V. A. Albert, P. Wincker y P. Lashermes (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345, 1181-1184.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the Bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.

- 
- Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- LeClere, S., R. Tellez, R. A. Rampey, S. P. T. Matsuda y B. Bartel (2002). Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 20446-20452.
- 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.
- Saitou, N. y M. Nei (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406-425.
- Tamura, K. y M. Nei (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10, 512-526.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski y S. Kumar (2013). MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Titarenko, E., E. Rojo, J. Leon y J. J. Sanchez-Serrano (1997). Jasmonic acid-dependent and -independent signaling pathways control wound-induced gene activation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 115, 817-826.
- Widemann, E., L. Miesch, R. Lugan, E. Holder, C. Heinrich, Y. Aubert, M. Miesch, F. Pinot y T. Heitz (2013). The amidohydrolases IAR3 and ILL6 contribute to jasmonoyl-isoleucine hormone turnover and generate 12-hydroxyjasmonic acid upon wounding in *Arabidopsis* leaves. *Journal of Biological Chemistry*,

288, 31701-31714.



## CAPÍTULO III

### CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 3.1 CONCLUSIONES

La reciente secuenciación del genoma de *C. canephora* revela que la familia de amidohidrolasas presentes en esta especie está integrada por 6 miembros. En este trabajo reportamos en análisis y expresión de 4 integrantes de la familia de genes que se encuentran involucrados en la hidrólisis de los conjugados de AIA durante el proceso de ES en *C. canephora* y posiblemente en otros procesos fisiológicos.

Los resultados de la expresión del transcrito de los genes de interés en este trabajo de investigación, aunado a su secuenciación y comparadas con las secuencias depositadas en la base de datos Sol Genomics Network, arrojan resultados concretos de que al menos, en el proceso de ES en *C. canephora*, intervienen cuatro posibles amidohidrolasas de la familia ILR que actúan conjuntamente en respuesta al cambio en la concentración de auxina debido al cambio de medio de pre-acondicionamiento al medio de inducción y en el cual ocurra una participación de estos durante las primeras horas y días, existiendo una relación con los conjugados de AIA-aa reversibles mediado por los genes de la familia *GH3*, el cual podría llegar a ser esencial para que puedan darse los inicios del proceso de diferenciación.

En conclusión, las plantas tienen una amplia gama de opciones para adecuar sus niveles de AIA de acuerdo a la etapa de desarrollo o algún proceso fisiológico dado. En la homeostasis del AIA, particularmente en la conjugación (*GH3*) e hidrólisis (*ILR*), las plantas utilizan diversos mecanismos para suplir y/o agilizar el aporte de auxina en sus distintos requerimientos.

El papel en la concentración endógena de AIA libre y conjugado es crucial para que el proceso de ES pueda llevarse a cabo. Este trabajo de investigación proporciona un primer acercamiento de cómo genes de la familia *ILR* de amidohidrolasas se encuentran involucrados en las regulaciones endógenas de AIA en *C. canephora*.

### 3.2. PERSPECTIVAS

Nuevos estudios serían necesarios para reforzar los resultados de este trabajo, entre los cuales podemos encontrar los siguientes:

- Analizar si tanto *ILL1* e *ILL5* participan o no en el proceso de ES en *C. canephora*.
- El análisis de expresión cuantitativa de cada amidohidrolasa analizada.
- Realizar mediante análisis bioinformático la comparación, a nivel de transcrito, de los puntos clave de análisis del proceso de ES en *C. canephora*.
- Expresar heterológamente en bacteria la secuencia completa de todas las amidohidrolasas de *C. canephora*, la purificación de la (s) proteína (s) obtenida (s) y su posterior análisis cinético para determinar la especificidad de su sustrato.
- Determinar el perfil de concentración endógena de los conjugados de AIA involucrados en el proceso de ES.
- Realizar pruebas histoquímicas para detectar los perfiles de expresión *in vivo* de las hidrolasas durante el proceso de ES en *C. canephora*.