



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio de la regulación de la expresión del gen *SERK1*
de *Coffea canephora* L.**

Tesis que presenta

Doribet Jiménez Guillen

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

OCTUBRE 2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de la **M. C. Doribet Jiménez Guillen**, titulado **Estudio de la regulación de la expresión del gen SERK1 de *Coffea canephora* L.** 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 de los Drs. José Juan Zúñiga Aguilar y Gregorio Godoy Hernández, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 31 de octubre 2018

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma: _____

M. C. Doribet Jiménez Guillen

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte de los proyectos titulados “Identificación de procesos celulares modificados por la activación ectópica del dominio de cinasa del receptor SERK1 durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*”, y “Desarrollo, evaluación en campo y análisis de factibilidad comercial de dos cultivos del Sureste Mexicano con Denominación de Origen, editados genómicamente para conferirles resistencia contra patógenos fúngicos y oomicetos”, cuyo responsable es el Dr. José Juan Zúñiga Aguilar

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi padre celestial Jehova por permitirme poder llegar hasta donde he llegado, por iluminar siempre el camino de mi vida, Gracias DIOS.

A mis padres Isaías Jiménez Chable y Leonor Guillen García, por ser siempre el motor de mi vida, por estar siempre a mi lado, por apoyarme en cada momento de mi vida, por las cosas que han sacrificado por mí y sobre todo por confiar siempre en mí. Gracias papá y mamá, sin ustedes no hubiera podido lograr este proyecto más en mi vida, los amo.

A mis hermanos Juana, Elizabeth, Abel, Edilia y Betuel por estar siempre a mi lado apoyándome.

A Daniel Pérez Pascual por ser mi compañero de vida, por su amor, comprensión y estar siempre a mi lado, dándome ánimo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte de los proyectos “Identificación de procesos celulares modificados por la activación ectópica del dominio de cinasa del receptor SERK durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*” y “Desarrollo, evaluación en campo y análisis de factibilidad comercial de dos cultivos del Sureste Mexicano con Denominación de Origen, editados genómicamente para conferirles resistencia contra patógenos fúngicos y oomicetos”, que contaron con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y de la Comisión Intersecretarial de Bioseguridad y de Organismos Genéticamente Modificados (CIBIOGEM), con claves 156029 y 278944, respectivamente, cuyo responsable es el Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.

Agradecimiento al Dr. José Juan Zúñiga Aguilar por haber sido mi asesor de tesis, por haberme aceptado en su grupo de trabajo, por creer en mí. Por todo su apoyo, su tiempo, paciencia, por ayudarme en mi formación académica, por ser un gran investigador del cual aprendí mucho.

Dr. Gregorio Godoy Hernández por haberme co-asesorado y formar parte de su grupo de trabajo en el último año de mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de doctorado otorgada (388016).

A mi comité tutorial al Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela, Dr. Luiz Antonio Gallo, por ayudarme en mi formación académica, por sus críticas constructivas en cada evaluación.

Agradecimientos al M.C. Ramón Armando Souza Perera por su apoyo técnico durante la realización de este trabajo, por sus consejos para ser mejor profesionalmente.

Al CICY, al posgrado en ciencias biológicas, a la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por permitirme llevar a cabo mis estudios de doctorado.

Agradecimiento a todos los investigadores que me impartieron clases fueron muy importantes durante mi formación académica, aprendí mucho de cada uno de ellos.

Dra. Teresa Hernández Sotomayor por su apoyo durante el tiempo que estuvo como coordinadora de posgrado.

Dra. Renata Rivera Madrid por su apoyo como coordinadora de posgrado.

M.C. Elide Áviles Berzunza por su apoyo técnico durante la realización de esta tesis.

M.C. Luis Carlos Gutiérrez por donarme las semillas de *Nicotiana benthamiana*.

A mis compañeros de laboratorio por sus sugerencias, comentarios respecto a mi trabajo en cada seminario de grupo.

	Pág.
ÍNDICE	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	
1.1 Cinasa tipo receptor de plantas.....	3
1.2 Cinasa tipo receptor de la embriogénesis somática (SERK1)	4
1.3 Expresión de <i>SERK1</i> en eventos de diferenciación celular.....	5
1.4 Embriogénesis somática.....	8
1.5 Estudios de SERK1 durante la embriogénesis somática de <i>Coffea canephora</i> L.....	10
1.6 El uso biotecnológico de promotores de genes de <i>Coffea canephora</i> L	11
JUSTIFICACIÓN.....	13
OBJETIVOS.....	14
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	15
 CAPÍTULO II	
AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL PROMOTOR DE SERK1 DE <i>Coffea canephora</i> L.	
2.1 INTRODUCCIÓN.....	17
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
2.2.1 Material biológico.....	19
2.2.2 Aislamiento del promotor del gen <i>CcSERK1</i>	19
2.2.2.1 Diseño de cebadores específicos.....	19
2.2.2.2 Construcción de la biblioteca de <i>Coffea canephora</i> L.....	19
2.2.2.2.1 Extracción de DNA genómico de <i>Coffea canephora</i> L.....	19
2.2.2.2.2 Restricción de DNA genómico.....	20
2.2.2.2.3 Purificación de DNA genómico digeridos.....	20
2.2.2.2.4 Ligación de los adaptadores GenomeWalker al DNA genómico digerido.....	20
2.2.2.3 Amplificación del promotor del gen <i>SERK1</i> de <i>Coffea canephora</i>	21
2.2.2.3.1 Primera PCR.....	21
2.2.2.3.2 PCR anidado.....	22
2.2.2.3.3 Extracción y purificación de ácidos nucleicos de geles de agarosa.....	22

2.2.2.4	Ligación de los productos de PCR en el vector pGEM-T-Easy®.....	22
2.2.2.4.1	Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico.....	23
2.2.2.4.2	Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina.....	24
2.2.2.4.3	Análisis de identidad del DNA plasmídico.....	24
2.2.3	Análisis bioinformático del promotor del gen <i>CcSERK1</i>	24
2.3	RESULTADOS.....	25
2.3.1	Aislamiento y clonación del promotor de <i>CcSERK1</i>	25
2.3.1.1	Purificación y digestión de gDNA.....	25
2.3.1.2	Amplificación del promotor de <i>CcSERK1</i>	27
2.3.1.3	Clonación de los fragmentos del promotor de <i>CcSERK1</i> en el vector pGEM-T- Easy.....	28
2.3.1.3.1	Análisis de clonas recombinantes por PCR.....	28
2.3.2	Análisis bioinformático.....	29
2.4	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	35

CAPÍTULO III

ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN *SERK1* DE *Coffea canephora* L.

3.1	INTRODUCCIÓN.....	37
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
3.2.1	Material Biológico.....	40
3.2.2	Construcción de los vectores pCcSERK1::GUS con el promotor nativo y con eliminaciones en el promotor.....	40
3.2.2.1	Eliminación del promotor 35S del vector pCAMBIA1301.....	41
3.2.2.2	Adición de sitios de restricción para la enzimas <i>kpnI</i> y <i>NcoI</i> a la versión completa y eliminadas del promotor de <i>CcSERK1</i>	42
3.2.2.3	Sub-clonación de los fragmentos del promotor de <i>CcSERK1</i> en el vector pCAMBIA1301.....	42
3.2.2.4	Análisis de identidad de DNA plasmídico.....	43
3.2.3	Transformación de la cepa LBA4404 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con las construcciones pCCSERK1::GUS.....	43
3.2.4	Transformación genética de explantes de <i>C. canephora</i> con pCcSERK1::GUS.....	44
3.2.5	Análisis funcional del promotor de <i>CcSERK1</i> durante ES de <i>C. canephora</i> ...	45
3.3.	RESULTADOS.....	46
3.3.1	Análisis Funcional del promotor del gen <i>CcSERK1</i>	46
3.3.1.1	Construcción del vector pCcSERK1::GUS.....	46

3.3.1.2	Transformación de LBA4404 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con las construcciones pCcSERK1::GUS.....	50
3.3.1.3	Transformación genética de explantes de <i>C. canephora</i> con las construcciones pCcSERK1::GUS.....	52
3.4	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	58

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *SERK1* DE *Coffea canephora* L.

4.1	INTRODUCCIÓN.....	63
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	65
4.2.2	Análisis de la actividad del promotor putativo del gen <i>SERK1</i> como respuesta a la adición exógena de auxina.....	65
4.2.2.1	Transformación de <i>E. coli</i> por choque térmico con el plásmido pUC57::promotor CcSERK1-aux(-).....	66
4.2.2.2	Purificación del promotor CcSERK1-aux(-) a partir del gel de agarosa.....	67
4.2.2.3	Sub-clonación del promotor CcSERK1-aux(-) en el vector pCAMBIA1301....	67
4.2.2.4	Transformación de la cepa LBA4404 de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción pCcSERK1::GUS-aux(-).....	68
4.2.2.5	Transformación genética de explantes de <i>Nicotiana benthamiana</i> con las construcciones pCcSERK1::GUS, pCcSERK1::GUS-aux(-).....	69
4.2.2.6	Efecto de la adición de auxina exógena sobre la actividad del promotor putativo del gen <i>CcSERK1</i>	69
4.2.2.7	Análisis histoquímico de GUS.....	69
4.3.	RESULTADOS.....	71
4.3.1	Efecto de la auxina exógena sobre la actividad del promotor putativo del gen <i>CcSERK1</i>	71
4.3.1.1	Transformación de <i>E. coli</i> con el plásmido pUC57::prSERK1-aux(-).....	72
4.3.1.2	Construcción del vector pCcSERK1::GUS-aux(-).....	74
4.3.1.3	Sub-clonación del promotor CcSERK1-aux(-) en el vector pCAMBIA1301....	75
4.3.1.4	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con la construcción pCcSERK1::GUS-aux(-).....	75
4.3.1.4	Efecto de la auxina exógena sobre la actividad del promotor de <i>CcSERK1</i> ...	76
4.4.	DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	80

CAPITULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5. 1	CONCLUSIÓN.....	83
5. 2	PERSPECTIVAS.....	85
	ANEXOS.....	86
	BIBLIOGRAFÍAS.....	99

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Estructura de la cinasa tipo receptor SERK1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	5
1.2	Nivel de expresión del gen <i>CcSERK1</i>	10
1.3	Análisis de expresión del gen <i>CcSERK1</i>	11
1.4	Estrategia experimental.....	15
2.1	Aislamiento de gDNA de <i>C. canephora</i>	24
2.2	Electroforesis de la purificación y digestión de gDNA.....	25
2.3	Ampliación del promotor del gen <i>CcSERK1</i> a partir de la biblioteca de gDNA.....	26
2.4	Amplificación del promotor del gen <i>CcSERK1</i> a partir de pDNA.....	28
2.5	Alineamiento de la secuencia del promotor de <i>CcSERK1</i> con la región UTR-5'...	29
2.6	Análisis de la secuencia del promotor de <i>CcSERK1</i> con el programa PLAN PAN 2.0.....	31
3.1	Mapa del vector pCAMBIA1301.....	39
3.2	Eliminación del promotor 35S del vector pCAMBIA1301.....	45
3.3	Amplificación del promotor del gen <i>CcSERK1</i> con sitios de enzima de restricción.....	46
3.4	Amplificación del promotor de <i>CcSERK1</i> con sitios de enzima de restricción.....	48
3.5	Análisis de las construcciones p <i>CcSERK1</i> ::GUS por PCR y enzimas de restricción.....	49
3.6	Verificación por PCR la transformación de <i>A. tumefaciens</i> con p <i>CcSERK1</i> ::GUS	50
3.7	Análisis funcional del promotor de <i>CcSERK1</i> durante la embriogénesis somática de <i>C. canephora</i> L.....	50
3.8	Representación esquemática del promotor de <i>CcSERK1</i>	52
3.9	Análisis del p <i>CcSERK1</i> ::GUS durante la embriogénesis somática.....	54
3.10	Análisis del p <i>CcSERK1</i> :GUS en diferentes estructuras embriogénicas.....	55
4.1	Esquema de las mutaciones en los elementos responsivos a auxina en el	69

	promotor de CcSERK1.....	
4.2	DNA plasmídico pUC57::promotor CcSERK1-aux(-).....	70
4.3	Digestión de pDNA del promotor CcSERK1-aux(-) con las enzimas de restricción <i>KpnI</i> y <i>NcoI</i>	71
4.4	Eliminación del promotor 35S del vector pCAMBIA1301.....	72
4.5	Digestión de los pDNA pCcSERK1::GUS-aux(-).....	73
4.6	PCR a partir de colonias de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformadas con la construcción pCcSERK1::GUS-aux(-).....	74
4.7	Análisis del efecto de la auxina exógena sobre la actividad del promotor de CcSERK1 en hojas de <i>N. benthamiana</i>	75
4.8	Análisis del efecto de la auxina exógena sobre la actividad del promotor de CcSERK1 en tallos de <i>N. benthamiana</i>	77

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
2.1	Reacción de digestión.....	19
2.2	Reacción de ligación.....	19
2.3	Mezcla de PCR.....	20
2.4	PCR anidado.....	21
2.5	Reacción de ligación.....	21
3.1	Reacción de restricción.....	40
3.2	Reacción de amplificación del promotor de CcSERK1	41
3.3	Reacción de ligación.....	42
4.1	Reacción de restricción.....	64
4.2	Reacción de ligación.....	65
4.3	Reacción de amplificación.....	66

ABREVIATURAS

AUXRE	Elemento responsivo a auxina
NAA	Ácido naftalenacético
BR	Brasinoesteroides
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DPA	Días post antesis
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
RNA	Ácido ribonucleico
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
ES	Embriogénesis somática
EC	Embriogénesis cigótica
EtBr	Bromuro de etidio
GUS	-glucuronidasa
KIN	Kinetina
LB	Medio luria-bertani
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog
pb	Pares de base
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RLK	Cinasa tipo receptor
RCV	Regulador de crecimiento vegetal
RT-PCR	PCR con transcripción reversa
rpm	Revoluciones por minutos
REs	Elementos responsivos

SN	Sobrenadante
TA	Temperatura ambiente
TAE	Tris base – ácido acético – EDTA
TDZ	Thidiazuron

RESUMEN

Se han identificados genes que desempeñan funciones de regulación durante la embriogénesis somática (ES) tales como *WUSCHEL (WUS)* (Zuo *et al.*, 2002), *AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15)* (Harding *et al.*, 2003), *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* (Stone *et al.*, 2001), *BABY BOOM (BBM)* (Boutilier *et al.*, 2002) y *Cinasa 1 tipo Receptor de la Embriogénesis Somática (SERK1)* (Hecht *et al.*, 2001), entre otros. *SERK1* es indispensable en procesos de diferenciación celular y en el establecimiento de la embriogénesis cigótica (EC) y ES, es considerado como el mejor marcador molecular de competencia embriogénica, debido que es el único gen que por sus características biológicas (receptor celular con actividad de cinasa intracelular), sus niveles de expresión (se expresa en células con competencia embriogénica y solamente en etapas tempranas de la ES) y la capacidad de su proteína codificada para conferir competencia embriogénica a los cultivos (Hecht *et al.*, 2001). Por ello, la identificación de elementos de respuesta (REs, por sus siglas en inglés) en su promotor, que sean responsables de la expresión de *SERK1* durante el establecimiento y el desarrollo de la ES, es de extrema utilidad para entender la regulación molecular de la transición somática-embrionaria.

En el presente proyecto se aisló y se caracterizó funcionalmente una secuencia de DNA de -1,620 pb localizada corriente arriba del gen homólogo de *SERK1* de *Coffea canephora* L. (*CcSERK1*). Los resultados demostraron que cuando se usó la secuencia completa de DNA (-1,620 pb), la tinción histoquímica de GUS fue observada en las venas central y secundarias de los explantes foliares, en la masa proembriogénica y en los estadios globular, corazón, torpedo y cotiledonar del desarrollo embrionario somático. Los experimentos con las deleciones de DNA revelaron que el segmento de -1,048 pb fue suficiente para dirigir la expresión normal de *SERK1* antes del establecimiento de la ES y durante las diferentes etapas del desarrollo embrionario; sin embargo, con el segmento de DNA de -792 pb, la tinción de GUS desapareció de los explantes foliares y de la masa proembriogénica pero persistió de manera normal en cada etapa de los embriones en desarrollo. Esto implica que la región de DNA comprendida entre las posiciones -1,048 y -792, donde se ubican REs únicos para los factores transcripcionales (FT) BBM y WUS, es necesaria para la expresión de *SERK1* durante el establecimiento de la ES, pero no en el posterior desarrollo embrionario. Finalmente, cuando se usó el segmento de -618 pb, no se

detectó tinción de GUS en ninguna etapa del proceso.

Por otra parte, se evaluó el efecto de la adición exógena de auxina sobre la actividad del promotor de *CcSERK1* en explantes de *Nicotiana benthamiana*. Los resultados mostraron que la auxina condujo al incremento en la expresión del gen reportero *UidA* cuando se usó el promotor nativo; en contraste, la expresión del gen reportero *UidA* fue eliminada en los explantes cuando los cuatro AUXRE existentes en el promotor fueron mutados.

Hasta donde sabemos, el presente trabajo representa el primer estudio molecular de un promotor de café durante la ES. Los resultados sugieren por primera vez que la expresión del gen *SERK1* que ocurre antes y después de la transición somática-embriónica es regulada independientemente por diferentes regiones de su promotor, en donde se ubican FT específicos (BBM/WUS y AGAMOUS/ANT, respectivamente). Estos resultados apoyan la importancia del gen *CcSERK1* como marcador molecular de competencia embriónica y el potencial de su promotor como una herramienta biotecnológica para entender los mecanismos de la diferenciación celular *in vitro*.

ABSTRACT

Genes have been identified what play functions of regulation during somatic embryogenesis (ES) such as *WUSCHEL (WUS)* Zuo *et al.*, 2002), *AGAMOUS-LIKE 15 (AGL15)* (Harding *et al.*, 2003), *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* (Stone *et al.*, 2001), *BABY BOOM (BBM)* (Boutilier *et al.*, 2002) and *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK1)* (Hecht *et al.*, 2001), among others. SERK1 is indispensable in processes of cell differentiation and in the establishment of zygotic embryogenesis (CE) and SE, is considered the best molecular marker of embryogenic competition, because it is the only gene that due to its biological characteristics (cellular receptor with intracellular kinase activity), its expression levels (expressed in cells with embryogenic competence and only in early stages of SE) and the capacity of its encoded protein for conferring embryogenic competence on crops (Hecht *et al.*, 2001). Therefore, the identification of promoter response elements (REs) responsible for the expression of *SERK1* during the establishment and development of SE, is extremely useful for understanding the molecular regulation of the somatic-embryonic transition.

In the present project, a DNA sequence of -1,620 bp located upstream of the homologous *SERK1* gene from *Coffea canephora* L. (*CcSERK1*) was isolated and functionally characterized. The results showed that when the complete DNA sequence (-1,620 bp) was used, the histochemical staining of GUS was observed in the central and secondary veins, in the proembryogenic mass and in globular, heart, torpedo and cotyledon stages of the somatic embryonic development. The experiments with DNA deletions revealed that the -1,048 bp segment was still sufficient to direct the normal expression of *SERK1* both before the SE establishment and during the different stages of embryo development; however, with the -792 bp DNA segment, GUS staining disappeared from the leaf explants and proembryogenic masses but persisted normally in every stage of the developing embryos. This implies that the DNA region between -1,048 and -792 positions, where unique REs for the transcriptional factors BBM and WUS are located, is necessary for the expression of *Serk1* during the establishment of the ES but not in the subsequent embryonic development. Finally, when the -618 bp segment was used, no GUS staining was detected in any stage of the process.

On the other hand, the effect of the exogenous addition of auxin on the activity of the prCcSERK1 promoter in explants of *Nicotiana benthamiana* was evaluated. The results

showed that the addition of auxin led to the increase in the expression of the *UidA* reporter gene, when the native promoter was used; in contrast, the expression of the reporter gene *UidA* was eliminated from the explants when the four AUXRE present in the promoter were mutated.

To our knowledge, the present work represents the first molecular study of a coffee tree gene promoter during SE. The results suggest for the first time that *SERK1* expression occurring before and after the somatic-embryonic transition is regulated independently by different promoter regions, where specific transcription factors (BBM/WUS and AGAMOUS/ANT, respectively) are located. These results support the power of the *CcSERK1* gen as a molecular marker of embryogenic competence and the potential of the *CcSERK1* promoter as a biotechnological tool to understand the mechanisms of cell differentiation *in vitro*.

INTRODUCCIÓN

La Cinasa Tipo Receptor de la Embriogénesis Somática (SERK1; por las siglas en inglés de Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase1) (Schmidt *et al.*, 1997), pertenece a una pequeña familia de cinco miembros en *Arabidopsis thaliana*: *AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3* (BAK1), *AtSERK4* (BKK1) y *AtSERK5*. De acuerdo con los análisis filogenéticos los cinco SERKs se agrupan en un solo clado, el de la subfamilia II de cinasa tipo receptor con repeticiones ricas en leucina (RLK-LRR) (Gou *et al.*, 2010; Shiu y Bleecker 2001).

El análisis con mutantes del gen *SERK1* demostró que la mutante *serk1-3* tiene una reducción en la capacidad embriogénica, esto sugiere que tiene un papel esencial en la embriogénesis somática (Kwaaitaal y de Vries, 2007). En *Arabidopsis*, la expresión del gen *AtSERK1* se encuentra en células que adquieren la competencia embriogénica, en células embriogénicas y en embriones somáticos tempranos. *AtSERK1* también se expresa en los óvulos antes de la fecundación y transitoriamente durante el desarrollo del embrión cigótico. Además, *AtSERK1* aumenta la competencia embriogénica cuando se expresa ectópicamente (Hecht *et al.*, 2001).

Por otra parte, la expresión de *SERK1* también es regulada positivamente por reguladores de crecimiento vegetal (RCV). En *Oryza sativa*, *OsSERK1* es inducido en hojas de arroz por moléculas de señalización de defensa tales como el ácido salicílico (SA), el benzotiadiazol (BTH, un análogo de SA), el ácido jasmónico (JA) y el ácido abscísico (ABA). Adicionalmente, la sobreexpresión constitutiva de *OsSERK1* en dos cultivares de arroz condujo a un aumento significativo de la resistencia a la infección por hongos. En ese estudio se sugiere que la proteína codificada por *OsSERK1* puede mediar parcialmente la transducción de la señal de defensa además de tener un papel básico en la embriogénesis somática (Hu *et al.*, 2005). En piña, la expresión de *AcSERK1* en callos no embriogénicos fue regulada positivamente por el ácido jasmónico (JA), el ácido salicílico (SA), el cloruro de sodio (NaCl), por lesiones y por un tratamiento a baja temperatura (Ma *et al.*, 2016). La proteína codificada por *AcSERK1* puede mediar parcialmente la transducción de la señal de defensa y desempeñar un papel en la respuesta al estrés (Song *et al.*, 2008; Chinchilla *et al.*, 2007; Hu *et al.*, 2005).

En nuestro modelo de estudio, el sistema de embriogénesis somática de *Coffea canephora* L. es de tipo directo únicamente se observa el crecimiento de células embriogénicas en el borde del explante foliar. En este sistema, la edad de la planta y el pre-acondicionamiento previo de la planta madre *in vitro* con NAA y cinetina (KIN) es crítico, así como la adición de benciladenina (BA) para la inducción (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006; Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002a, b).

En el presente trabajo se aisló una región de -1,620 pb localizada corriente arriba del gen *CcSERK1*. Esta secuencia se utilizó para generar un sistema reportero constituido por la fusión de diversos segmentos del promotor putativo con el DNA del gen que codifica una β -glucuronidasa de *Escherichia coli* (GUS). Con este sistema se separó la región promotora de *CcSERK1*, se investigó la expresión del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis somática y se analizó el efecto del regulador de crecimiento auxina sobre la actividad del promotor de *CcSERK1*.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 Cinasa tipo Receptor (RLKs) de plantas

Las cinasas tipo receptores (RLK: *Receptor-Like Kinase*) son un grupo diverso de proteínas anclados en la membrana citoplasmática y esto le permiten a las células que reconozcan y respondan a su entorno extracelular (van der Geer *et al.*, 1994). El genoma de *Arabidopsis thaliana* codifica al menos 450 RLKs, y más de 750 en el genoma de arroz (Morillo y Tax, 2006; Shiu *et al.*, 2004; Shiu and Bleecker 2001). Las proteínas RLKs tienen una estructura tripartita conservada que consta de un dominio amino-terminal extracelular que une al ligando, un dominio transmembranal que los ancla en la membrana citoplasmática y un dominio conservado intracelular con actividad de cinasa de serina/treonina o tirosina (KD) (Shiu y Bleecker, 2001).

Los RLKs juegan una amplia gama de funciones en crecimiento y desarrollo de las plantas y en el sistema de defensa de la planta, (Tichtinsky *et al.*, 2003; Cock *et al.*, 2002; Shiu y Bleecker 2001). Las proteínas RLKs llevan a cabo estas funciones por la unión del ligando en el dominio extracelular del receptor lo que origina su homo o heterodimerización en la membrana citoplasmática, esta dimerización permite la trans-fosforilación de ambos receptores, lo que expone el sitio activo y permite que el dominio de cinasa fosforile a sus sustratos citoplásmicos, iniciando de esa manera la transducción de señales correspondiente (Aker *et al.*, 2008). La desactivación de los RLKs se lleva a cabo a través de su defosforilación por fosfatasaes específicas y su posterior internalización a través de endocitosis (Ruscinova *et al.*, 2004). Para la mayoría de estas proteínas sus funciones siguen siendo desconocidas.

La clasificación de las proteínas RLK, basada en la identidad entre los dominios extracelulares, divide las 417 proteínas RLK de *Arabidopsis* en más de 21 clases, tales como: repetición rica en leucina (LRR)-RLK, S-dominio RLK, L-lectina-RLK, RKF3-Like-RLK y PERK-Like-RLK. Entre estas clases, LRR-RLK es la más grande con 216 proteínas en *Arabidopsis*. Las proteínas RLK de esta clase contienen varios números de dominios LRR en su receptor. Con base en la similitud entre los dominios cinasa, la clase LRR-RLK se

divide en 13 subfamilias llamadas LRR I a LRR XIII. En la subfamilia LRR II se encuentran las proteínas SERK (Ito *et al.*, 2005; Shiu y Bleeker 2001).

1.2 La cinasa tipo receptor relacionada con la embriogénesis somática (SERK1)

El primer reporte de una cinasa de esta familia se publicó en 1997 en *Daucus carota* y por el modelo de estudio se le denominó cinasa 1 tipo receptor de la embriogénesis somática (SERK1) (Schmidt *et al.*, 1997). Desde entonces, genes homólogos de *SERK1* han sido descubiertos y vinculados a la embriogénesis somática (ES) y a la cigótica (EC) en un gran número de especies (Singla *et al.*, 2008; Hecht *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1997). El descubrimiento de varios homólogos de *SERK* en diferentes especies de plantas indica que esta proteína está conservada en el reino vegetal.

La proteína predicha de *AtSERK1* es de 625 aminoácidos (Hech *et al.*, 2001), consta de un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular. En el dominio extracelular se encuentra un motivo de péptido señal, una secuencia tipo cierre de leucina (LZ) y cinco regiones de aminoácidos ricas en leucina (LRRs), el motivo LRR posee sitios potenciales de *N*-glucosilación, los cuales son esenciales para la correcta localización de *SERK1* (Shah *et al.*, 2001a). Tiene también un motivo Ser-Pro-Pro (SPP) rico en prolina, lo cual es una característica conservada de las proteínas de la pared celular vegetal conocidas como extensinas; se ha sugerido que este motivo actúa como bisagra que le proporciona flexibilidad a la parte extracelular del receptor o como una región de interacción con la pared celular (Schmidt *et al.*, 1997). El motivo SPP es único para la proteína *SERK* y es considerado como un sello distintivo de los RLK tipo *SERK* (Hecht *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1997), (Figura 1.1).

SERK1 tiene una región yuxtamembranal, donde se encuentra una treonina en la posición 304; este residuo es indispensable para desplegar la actividad de autofosforilación (Shah *et al.*, 2001b). En el dominio intracelular de *SERK* se encuentra el dominio de cinasa que contiene once subdominios característicos del sitio catalítico de las proteínas cinasas de serina/treonina (Figura 1.1). Entre el subdominio VII y VIII se encuentra el asa crítica de activación de la proteína (Shah *et al.*, 2001b), que consta de dos residuos de treonina en

las posiciones 462 y 468, necesarios para la actividad de auto y transfosforilación (Shah *et al.*, 2001) y un residuo de lisina en la posición 330 es indispensable para la actividad de cinasa (Shah *et al.*, 2001b). La segunda parte del extremo carboxilo terminal puede estar mediando la interacción proteína-proteína, un prerequisite para la transmisión de una cascada de fosforilación intracelular (Schmidt *et al.*, 1997). Las proteínas SERK, como otros receptores RLK, poseen actividad catalítica de autofosforilación (Shah *et al.*, 2001).

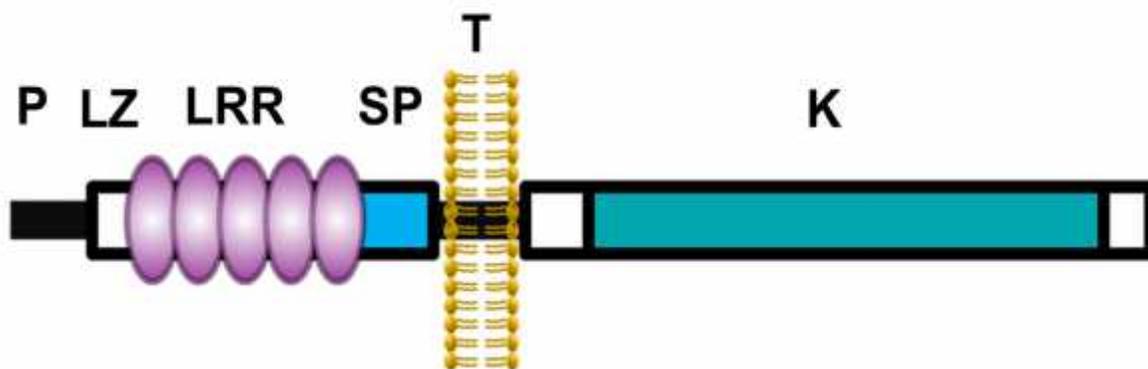


Figura 1.1 Estructura de la cinasa tipo receptor de la embriogénesis somática de *Arabidopsis thaliana* (AtSERK1). Los dominios se describen en el texto; P: Motivo de péptido señal; LZ: Secuencia tipo cierre de leucina; LRR: Repeticiones ricas en leucinas; SP: Motivo Ser-Pro-Pro; T: Región transmembranal; K: Dominio de cinasa, (Modificado de Becraft, 2010).

1.3 Expresión de *SERK1* en eventos de diferenciación celular

El gen que codifica para la cinasa tipo receptor SERK1 fue aislado como un marcador para las células totipotentes individuales en cultivo de *D. carota* (*DcSERK*). A partir de este trabajo, genes homólogos de *DcSERK* fueron descubiertos en varias especies de plantas, donde el gen es también un marcador del potencial embriogénico (Nolan *et al.*, 2009; Hecht *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2000).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado cinco miembros de la familia SERK (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3*, *AtSERK4* y *AtSERK5*) (Shah *et al.*, 2001), pero hasta el momento solo se ha demostrado que *AtSERK1* tiene función en la ES (Salaj *et al.*, 2008; Hecht *et al.*, 2001).

En un estudio reciente se determinó que los genes *SERK1*, *SERK3* y *SERK4* son esenciales para la vía de señalización de brasinoesteroides (Gou *et al.*, 2012). Los tres SERK juegan un papel importante en el control del desarrollo de la raíz en *Arabidopsis*, en vías dependientes e independientes de brasinoesteroide (BR) (Gou *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2012). En esta última vía, actúa a través de sus interacciones con un desconocido RLK de unión a ligando. Esta vía puede ser regulada a través de la modulación de la expresión de genes del transporte de auxina y otros genes relacionados con el desarrollo de las raíces tales como *SHORT-ROOT* (SHR) y *WOX5* (Du *et al.*, 2012).

Por otro lado, en estudios realizados en *Medicago truncatula* se ha encontrado que la expresión de *MtSERK* es inducida por el ácido naftalénacético (NAA), mientras que la citocinina benciladenina (BA) no tiene efecto alguno sobre su expresión; sin embargo, cuando se emplearon simultáneamente el ANA y BA se observó un efecto de sinergia en la expresión de *MtSERK1*, aumentando al doble la expresión, en comparación de cuando sólo se empleó ANA. A través de este trabajo se pudo determinar que existe una correlación entre la expresión de *MtSERK1* y la ES y se sugirió que *MtSERK1* puede jugar un papel en la morfogénesis, ya que la formación de raíz de *M. truncatula* es regulada por auxinas (Nolan *et al.*, 2003).

En *Arabidopsis*, *SERK1* aumenta la competencia embriogénica cuando se expresa ectópicamente (Hecht *et al.*, 2001). En el análisis con mutantes de *SERK1*, se demostró que la mutante *serk1-3* tiene una reducción en la capacidad embriogénica, esto sugiere que tiene un papel esencial en la ES (Kwaaitaal y de Vries, 2007). Resultados de estudios *in planta* mostraron que la proteína *SERK1* se encuentra en los haces vasculares de raíces, tallos, hojas y raíces laterales (Kwaaitaal *et al.*, 2005; Hecht *et al.*, 2001).

Dos investigaciones independientes demostraron que *AtSERK1* y *AtSERK2* están involucrados en el desarrollo de las anteras y que en ese proceso son redundantes (Albrecht

et al., 2005; Colcombet *et al.*, 2005). Las mutantes dobles *serk1-1 serk2-2* son estériles masculinas debido a un fallo en la especificación del tapetum. La fertilidad puede ser restaurada por una sola copia de cualquiera de estos dos genes.

En otros estudios realizados se encontró que la expresión de *SERK1* se induce en células en proliferación procedentes de procámbium vascular después de un tratamiento prolongado con 2,4-D. Con la exposición prolongada a 2,4-D, células del sistema provascular de las hojas en *Dactylis glomerata* (Somleva *et al.*, 2000), explantes de hipocótilo en *D. carota* (Guzzo *et al.*, 1994) y embriones inmaduros en *Arabidopsis* (Raghavan, 2004) proliferan y constituyen el origen de las células competentes. En *D. carota*, la expresión de *SERK1* se presenta exclusivamente en células de masas vasculares proliferantes que adquirirán la competencia embriogénica (Schmidt *et al.*, 1997).

En los haces vasculares, *AtSERK1* se expresa en células inmaduras vasculares y se restringió al procámbium en áreas más maduras del tejido vascular. En las raíces, la expresión se observó primero en las células madre vasculares y continuó siendo expresado en la zona meristemática de células de tránsito de amplificación (TA) vascular (Kwaaitaal y de Vries, 2007), en este último estudio se demostró que la expresión de *SERK1* marca la población de células en el procámbium de células madres pluripotentes en los haces vasculares.

Se ha hipotetizado que la aplicación de 2,4-D, da como resultado una reversión de estas células pluripotentes a un destino de las células madre totipotentes, donde después se inicia la embriogénesis (Kwaaitaal y de Vries, 2007). Un trabajo reciente en *Cyclamen persicum* donde se analizó la formación de células madres y el mantenimiento de la embriogénesis somática y organogénesis *in vitro*, apoya esta hipótesis, ya que los genes *CpSERK1* y *CpSERK2* se expresan en las células madres pluripotentes *in planta* e *in vitro*. Con estos resultados se propone que la alta expresión de estos genes en los derivados de trans-amplificación de las células madres mantiene una condición pluripotente que conduce a la totipotencia y, en consecuencia, la embriogénesis somática (Sanova *et al.*, 2011). Estos resultados parecen indicar que la expresión de *SERK1* marca las células madre pluripotentes en los haces vasculares, células que después del tratamiento con las moléculas adecuadas tales como auxinas fuertes son capaces de adquirir totipotencia y son

capaces de iniciar la embriogénesis somática (Kwaaitaal y de Vries, 2007).

1.4 Embriogénesis somática

La ES es el proceso mediante el cual las células somáticas se desarrollan para producir un embrión completo y el origen puede ser unicelular (Schmidt *et al.*, 1997), o multicelular (Taylor y Vasil 1996). Las células embriogénicas logran la bipolaridad desde etapas tempranas como sucede en la embriogénesis cigótica, pero sin la fusión de gametos (Williams and Maheswaran, 1986; Sharp *et al.*, 1980). La ES ocurre de manera natural en ciertas especies (Garcês *et al.*, 2007), mientras que en otras puede ser inducida *in vitro* mediante la manipulación de diversos factores exógenos en el medio de cultivo. Las condiciones para la inducción de ES en diferentes especies y variedades cultivadas generalmente se descubrieron por ensayo y error (Henry *et al.*, 1994; Jacobsen 1991).

La determinación de los factores específicos físicos y químicos que cambian el destino del desarrollo embrionario es un paso clave en la inducción embriogénica. Se ha propuesto que los RCV y el estrés desempeñan un papel central en la mediación de la cascada de transducción de señales que conduce a la reprogramación de la expresión génica, seguido por una serie de divisiones celulares que induce también el crecimiento desorganizado (callo) o crecimiento polarizado que conduce a la ES (de Jong *et al.*, 1993; Dudits *et al.*, 1991). Además de las auxinas como el principal inductor (Feher *et al.*, 2002), hay reportes de inducción de la embriogénesis somática como respuesta a la presencia de otros RCV tales como citocinina (Sagare *et al.*, 2000.) o ácido abscísico (ABA) (Nishiwaki *et al.*, 2000; Bell *et al.*, 1993).

Aunque la ES fue descrita por vez primera hace más de 50 años (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958), aún continúa siendo objeto de numerosos estudios por su gran importancia como modelo para estudiar la diferenciación celular y como herramienta biotecnológica para la clonación de genotipos élite (von Arnold *et al.*, 2002; Krikorian y Simola, 1999). Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos que regulan este proceso siguen sin estar claros hasta la fecha (Yang *et al.*, 2012); de hecho, la regulación de la ES es una de las 25 preguntas fundamentales que permanecen sin contestar en la actividad científica, de

acuerdo con una lista de 125 preguntas establecidas en la revista Science en su aniversario 125 (Vogel, 2005).

Mediante análisis de expresión diferencial se han identificado genes que codifican para proteínas extracelulares, intermediarios de vías de traducción de señales, genes que responden a RCV, genes del ciclo y pared celular, genes involucrados en la regulación epigenética, así como, diferentes factores de transcripción. La mayor atención se centra en los genes específicos y altamente expresados en atapas tempranas de la ES. Sin embargo, la mayoría de los genes identificados poseen funciones diversas, que no son exclusivas de la ES (Ikeda *et al.*, 2006).

La identificación de estos genes expresados diferencialmente durante la ES, permite agruparlos de acuerdo con su función (Chugh and Khurana, 2002):

- Responsivos a hormonas: *DcArg-1*, homologos de *pJCW1*, *pJCW2*, *DcECP63*, *Em*, *DcECP40*, *DcECP31*;
- De mantenimiento: *Top I*, *EF-1a*, *CEM6*, *H3-1*, *CGS102*, *CGS103*, *CGS201*;
- Transducción de señales: *SERK*, *swCDKs*, *CRKs*, *MsCPK3*;
- Proteínas extracelulares: *EP3-1*, *EP3-2*, *PgChi-1*, *PgGlu-1*, *EP2*, *DcAGP1*;
- De la maduración: *Mat*, *Dc2.15*, *Dc3*, *Dc8*, *DcEMB*, *Em*, *DcECP31*, *DcECP40*, *MsLEC*, *MsLEC2*; Hsps y germinas: *Mshsp18*, *Dchsp1*, *PcGER1*;
- Factores de transcripción: *LEC1*, *LEC2*, *BBM*, *EMK*, *WUS*, *WOX*, *AGL15*, *ABI3*, *Sbh1*, *CHB1-CHB6*, *DcDB*;
- Mutantes cigóticas: *clv*, *lec*, *pkl*, *pt*, *stm*, *wus*, *zll/pnh*.

Los genes homeóticos (*LEC1*, *LEC2*, *WUS*, *AGL15*) pueden conferir un desarrollo embriogénico cuando son expresados ectópicamente en tejidos somáticos (Arroyo-Herrera *et al.*, 2008; Boutilier *et al.*, 2002; Lotan *et al.*, 1998). El hecho de que tengan funciones en etapas posteriores del desarrollo implica que sus funciones no son específicas de las etapas tempranas, decisivas para la diferenciación (Ikeda *et al.*, 2006).

1.5 SERK1 durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora* L.

En el modelo de estudio *Coffea canephora*, el sistema de ES es tipo directo y únicamente se observa el crecimiento de células embriogénicas en el borde del explante. En este sistema, la edad de la planta y el pre-acondicionamiento previo de la planta madre *in vitro* con ANA y Kin es crítico, así como la adición de BA en la inducción (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002, 2006b).

En nuestro laboratorio se ha trabajado en la caracterización molecular del gen *SERK1* de *Coffea canephora* (*CcSERK1*). Se ha aislado el cDNA de *SERK1* el cual contiene todos los dominios característicos de la proteína codificada (Pérez-Pascual, 2013). Por otro lado, mediante ensayos de hibridación tipo Southern blot, empleando como sonda un fragmento del gen *SERK1*, indican que existe una copia única del receptor SERK1 en el genoma de *Coffea canephora* (Pérez-Pascual *et al.*, 2018).

Experimentos realizados por medio de transcripción reversa acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de punto final, utilizando cebadores específicos, demostraron que el gen *CcSERK1* se expresa muy poco en tejidos diferenciados como la raíz, tallo, hojas o las yemas laterales. Sin embargo, se expresa fuertemente en embriones provenientes de fruto verde (G), amarillo (Y) y rojo cereza (B). Estos datos sugieren que en la planta adulta se expresa preferentemente durante la embriogénesis cigótica (Figura 1.2).

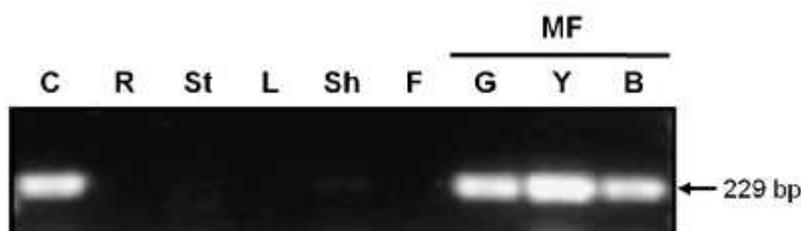


Figura 1.2 Nivel de expresión del gen *CcSERK1* en el desarrollo de la embriogénesis cigótica y en diferentes tejidos de la planta adulta de *Coffea canephora*. El análisis se realizó a partir de RNAt por RT-PCR. C: Plásmido pGEM-CcSERK1 como testigo positivo; R: Raíz; St: Tallo; L: Hoja; Sh: Botón floral; F: Flor; G: Fruto verde; Y: Fruto amarillo; B: Fruto rojo, MF: Frutos maduros (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2006).

Por otra parte, mediante experimentos de RT-PCR se analizó el nivel de expresión del gen *CcSERK1* durante el proceso de ES y se encontró que la expresión de *CcSERK1* se incrementa entre los cinco y los diez días después de inducción del proceso de ES y disminuye entre los 25 y 30 días después de la inducción, como se muestra en la figura 1.3.

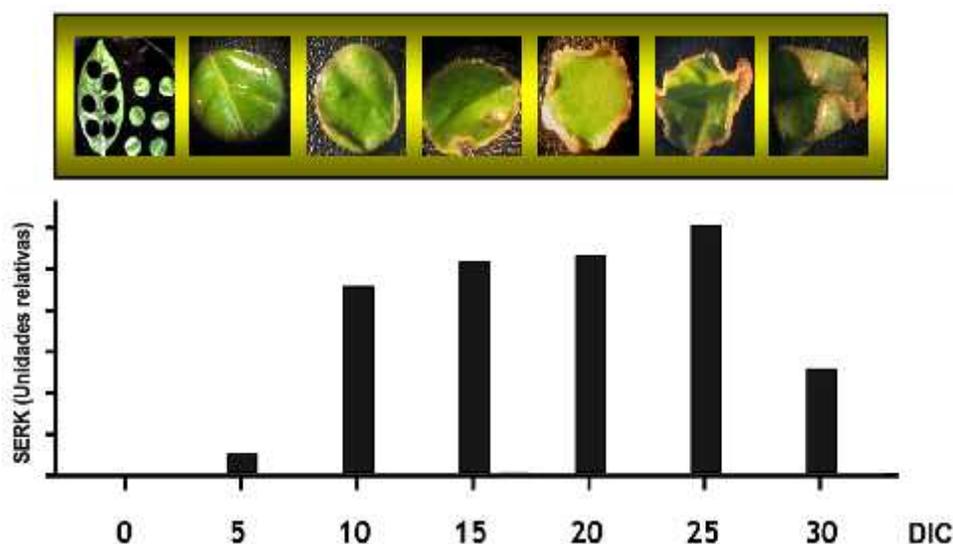


Figura 1.3 Nivel de expresión del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*. El análisis de expresión del gen *CcSERK1* se analizó durante el proceso de ES en diferentes tiempos de inducción, desde el día cero hasta el día 30 (Villanueva-Alonzo *et al.*, 2006).

1.6 El uso biotecnológico de promotores de genes de *Coffea canephora* L.

Los enfoques biotecnológicos para mejorar la calidad del café se han centrado en la manipulación de genes asociados con rasgos agronómicos específicos (Mishra y Slater, 2012) y en el análisis de promotores vegetales aislados. La expresión de los promotores de genes de café en sistemas heterólogos reveló que son reconocidos por la maquinaria de transcripción del huésped y, por lo tanto, podrían utilizarse como herramientas biotecnológicas en el fitomejoramiento (de Aquino *et al.*, 2018; Cotta *et al.*, 2014; Severino *et al.*, 2012; Marraccini *et al.*, 2003;). Con frecuencia, el análisis de promotores de genes implica la expresión ectópica de genes reporteros en especies de *Nicotiana tabacum* y *N.*

benthamiana como sistemas de validación heterólogos. Por ejemplo, estudios de expresión utilizando el promotor del gen que codifica una proteína putativa tipo isoflavona reductasa (*CaIRL*) demostró que se expresa exclusivamente en hojas de café y su nivel de transcripción es marcadamente aumentado en respuesta a la infección por hongos y herida mecánica. El análisis en plantas de tabaco transgénicas confirmó la capacidad de respuesta del promotor putativo al estrés abiótico en hojas heridas (Brandalise *et al.*, 2009).

En líneas transgénicas de tabaco transformadas con promotores de factores de transcripción *CaWRKY1a* y *CaWRKY1b* de *Coffea arabica*, que dirigen la expresión del gen reportero *uidA* (pW1a::GUS), estos promotores mostraron respuestas diferenciales a reguladores del crecimiento vegetal, infección fúngica y lesión foliar (Petitot *et al.*, 2013).

El promotor del gen *deshidrina* (*CcDH2*) de *C. canephora* se aisló y su secuencia de nucleótidos reveló la existencia de secuencias reguladoras probablemente involucradas en el control de la expresión de la *deshidrina* (*CcDH2*) durante el desarrollo de la semilla (Hinniger *et al.*, 2006). Marraccini *et al.* (2003) clonaron el promotor de *ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa* (*RBCS1*) de *C. arabica* y encontraron la presencia de varias cajas de DNA putativas con similitudes con elementos de respuesta a la luz bien caracterizados; usando una secuencia de nucleótidos de 1 kb de longitud para dirigir la expresión del gen *uidA*, mostraron que este promotor de café podría dirigir la expresión génica específica de hoja y está regulado por la luz en tabaco transgénico. Los promotores de los genes *11S globulina* y *NMT* fueron capaces de dirigir la expresión transgénica en los tejidos del endospermo y en los embriones transgénicos secundarios de *C. canephora*, respectivamente (Kumar *et al.*, 2007).

Estos resultados demuestran el comienzo incipiente de estudios con promotores genéticos en especies económicamente importantes del género *Coffea*, para comprender la regulación de la expresión génica durante la diferenciación celular del proceso de ES en estas especies.

JUSTIFICACIÓN

Con base en estudios realizados con mutantes, con ensayos de sobreexpresión y de análisis de su expresión en regiones meristemáticas, así como en las embriogénesis somáticas y cigótica, se sugiere que *SERK1* participa en la regulación de la diferenciación celular vegetal. Pero a pesar de que la adición de RCV como las auxinas, el ácido salicílico y el jasmonato de metilo incrementa sus niveles de expresión *in planta*, aún se sabe muy poco sobre los elementos de señalización que regulan su expresión en los diferentes órganos y tejidos.

Con relación al papel del gen *SERK1* durante la ES, se sabe que éste puede ser el gen que dispare el proceso. Datos preliminares con el modelo de ES directa de *C. canephora* de nuestro laboratorio indican que este gen se expresa en tiempos tempranos durante la inducción de la ES, antes de la aparición de estructuras embrionarias y durante el desarrollo embrionario de manera coincidente con la aparición de las etapas pre-globular y globular (Villanueva-Alonzo, 2006); sin embargo, no se sabe cuáles son las señales o los controles moleculares que regulan su expresión diferencial en este proceso, por lo que el análisis de su promotor podría ofrecer información sobre los elementos a los cuales este gen responde durante la ES.

Con base en lo anterior, en el presente proyecto se decidió aislar una secuencia genómica corriente arriba del gen *SERK1* de *C. canephora*, con el objetivo de separar la región promotora y de analizar la funcionalidad de los elementos de respuesta presentes en ella, mediante su fusión a un gen reportero y el uso de esta herramienta para analizar indirectamente la expresión del gen *SERK1* durante el proceso de ES y en sistemas heterólogos, este trabajo se realizó de acuerdo a la estrategia experimental planteado en la figura 1.4.

Los resultados aportarán información para conocer parte de los mecanismos de regulación de la expresión de *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *C. canephora*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la regulación de la expresión del gen *SERK1* de *Coffea canephora* L.

Objetivos específicos

1. Aislar el promotor del gen *SERK1* de *Coffea canephora* L.

- a. Aislar y clonar una secuencia genómica localizada corriente arriba del gen *CcSERK1*.
- b. Eliminar la región promotora en la secuencia genómica aislada.
- c. Identificar los elementos de respuesta en el promotor de *CcSERK1*

2. Analizar la expresión del gen *SERK1* de *Coffea canephora* L. en condiciones fisiológicas

- a. Construir los vectores binarios pCcSERK1::GUS con el promotor nativo, mutado y con deleciones.
- b. Transformar explantes de *Coffea canephora* L. con los vectores binarios pCcSERK1::GUS.

3. Evaluar la funcionalidad fisiológica del promotor del gen *SERK1* de *Coffea canephora* L.

- a. Analizar la expresión del sistema reportero pCcSERK1::GUS como respuesta a la adición exógena de auxinas.
- b. Evaluar el efecto de mutaciones en los elementos responsivos a auxina dentro de la secuencia del promotor del gen *CcSERK1*, sobre los niveles de expresión.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

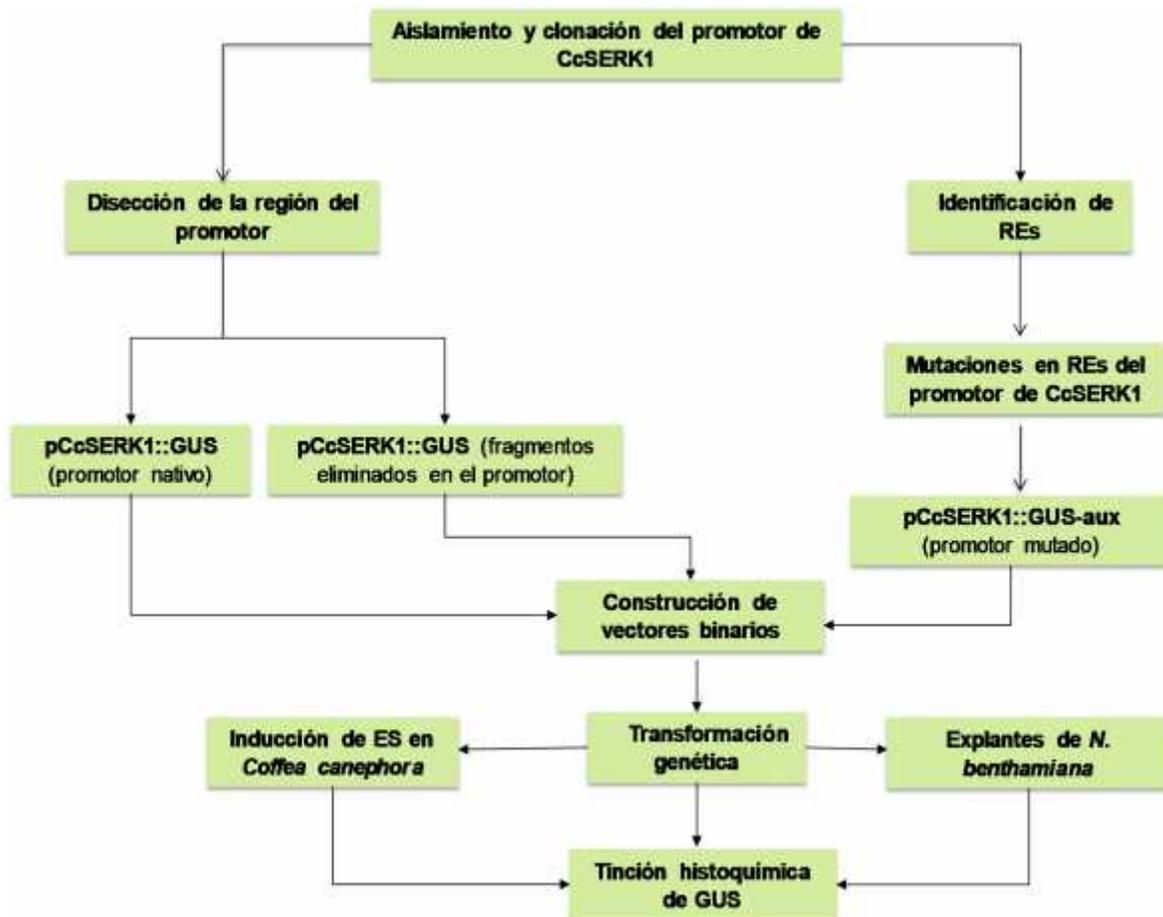


Figura 1.4 Estrategia experimental para el estudio de regulación de la expresión del gen *SERK1* de *Coffea canephora* L.

CAPÍTULO II

AISLAMIENTO Y CLONACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN *SERK1* DE *Coffea canephora* L.

Los resultados presentados en este capítulo forman parte del artículo:

“Cloning of the *Coffea canephora* *SERK1* promoter and its molecular analysis during the cell-to-embryo transition”, por Doribet Jiménez-Guillen^a, Daniel Pérez-Pascual^a, Ramón Souza-Perera^a, Gregorio Godoy-Hernández^a, José Juan Zúñiga-Aguilar^{b*}.

^aUnidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México. ^bInstituto Tecnológico Superior de los Ríos, Km 3 carretera Balancán-Villahermosa, Tabasco 86930, México.

* Autor de correspondencia.

Este artículo ha sido aceptado para su publicación en la revista Electronic Journal of Biotechnology (SCOPUS SciteScore: 2.19; JCR impact factor 2017: 1.881).

2.1 INTRODUCCIÓN

La embriogénesis somática *in vitro* de *C. canephora* se ha convertido recientemente en un modelo adecuado para estudiar la regulación molecular de la diferenciación celular, porque es altamente eficiente y reproducible (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006) y se ha publicado la secuencia de DNA genómico de *C. canephora* (Denoëud *et al.*, 2014). Por lo tanto, los análisis de los genes implicados en la regulación molecular de la diferenciación celular se pueden estudiar en este modelo. Estos genes incluyen los factores de transcripción *WUS* (Zuo *et al.*, 2002), *AGL15* (Harding *et al.*, 2003), *LEC2* (Stone *et al.*, 2001), *BBM* (Boutilier *et al.*, 2002), *ANT* (Mizukami *et al.*, 2000) y *SERK1*.

Se han descritos homólogos del gen *SERK1* en muchas especies, donde también funcionan como marcadores moleculares de la competencia embriogénica (Nolan *et al.*, 2009; Hecht *et al.*, 2001), son esenciales para el desarrollo de la embriogénesis (Kwaaitaal and de Vries

2007) y su expresión ectópica se encontró que aumenta la competencia embriogénica (Hecht *et al.*, 2001). En *M. truncatula*, la expresión de *MtSERK1* está asociado con la ES, EC y la rizogénesis *in vitro*. En la ES la expresión de *MtSERK1::GUS* se detectó después de 2 días de cultivo en el borde del explante y alrededor del tejido vascular; la expresión en el borde del explante se intensificó en los días subsecuentes y luego se perdió desde el borde hacia adentro con la formación de callo. Cuando se formaron los embriones somáticos, la expresión se produjo en todo el desarrollo del embrión. En embriones cigóticos se encontró la expresión hasta la etapa de corazón, mientras que la expresión *in planta* estuvo asociada con los meristemos primarios, incluyendo el procámbium (Wang *et al.*, 2011; Nolan *et al.*, 2009).

Por otra parte, la activación ectópica de las proteínas codificadas por los genes SERK en la membrana plasmática requiere no solamente la transformación con el gen sino además se requiere la presencia de las señales moleculares que actúan como ligando para estos receptores de la superficie celular. Cuando estos ligandos se unen al dominio extracelular de SERK o a su co-receptor, mediada por el motivo LRR, se activa la cascada de señalización dentro de la célula (Pandey *et al.*, 2014). Esta señal es transducida hasta el núcleo, provocando la alteración del patrón de expresión génica existente.

Con base en estos antecedentes, el objetivo de este proyecto fue aislar y clonar el promotor del gen *SERK1* de *C. canephora*, para utilizarlo como herramienta para estudiar la regulación de la expresión del gen *CcSERK1* durante el proceso de ES de *C. canephora*.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico

Como material biológico se emplearon plántulas de *C. canephora* L. cultivadas *in vitro* a 25 ± 2 °C en fotoperiodo 16/8h ($150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), en medio MS (Murashige and Skoog, 1962) suplementado con tiamina-HCl $4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, L-myo-inositol $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, L-cysteina $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ácido nicotínico $1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, sacarosa $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ y Gelrite 0.25 % (w/v), pH 5.

2.2.2 Aislamiento del promotor del gen *SERK1*

2.2.2.1 Diseño de cebadores específicos

Se diseñaron 2 cebadores reversos a partir de la secuencia codificante del extremo 5' del gen *CcSERK1* (Anexo I.I) (Pérez-Pascual *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Construcción de las bibliotecas de *Coffea canephora*.

2.2.2.2.1 Extracción de DNA genómico de *Coffea canephora*

Para la construcción de las bibliotecas se extrajo DNA genómico (gDNA) a partir de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* mediante el método de CTAB, descrito en el Anexo I.II. Las muestras de gDNA se purificaron utilizando la metodología del Nucleo Spin Tissue Genomic DNA Purification, descrito en el anexo I.III.

2.2.2.2.2 Restricción de DNA genómico de *Coffea canephora*.

Se realizó la restricción de gDNA con las enzimas *DraI*, *EcoRV*, *PvuII* y *StuI* y como testigo positivo se digirió gDNA de humano (Kit) con la enzima *PvuII*. La reacción de restricción se realizó de la siguiente manera (cuadro 2.2):

Cuadro 2.1 Reacción de restricción

Componentes	Volumen (μL)
gDNA (2.5 μg)	7.54
Enzima de restricción (10 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)	8.00
Amortiguador de enzima de restricción (10X)	10.00
H_2O desionizada	74.46
Volumen final	100

Se incubó a 37 °C por 2 h y se agitó la reacción suavemente durante 5-10 segundos y se colocó nuevamente a 37 °C durante 16 h.

2.2.2.2.3 Purificación de DNA genómico-digeridos de *Coffea canephora*

Se realizó la purificación de gDNA digeridos, con la metodología del Nucleo Spin Gel and PCR Clean-Up (Clontech), descrito en el anexo I.IV.

2.2.2.2.4 Ligación de los adaptadores GenomeWalker al DNA genómico digerido

Se realizó la ligación de los adaptadores GenomeWalker al gDNA digerido, de la siguiente manera:

1. De cada reacción de digestión se tomó 4.8 μL y se transfirió a tubos de 0.5 mL por separados, posteriormente a cada tubo se le adicionó la siguiente reacción de ligación:

Cuadro 2.2 Reacción de ligación

Componentes	Volumen (μL)
GenomeWalker adaptor (25 μM)	1.9
Amortiguador de ligación 10X	0.8
T4 DNA ligasa (6 $\text{U}/\mu\text{L}$)	0.5

2. Se incubó a 16 °C toda la noche.
3. Posteriormente se incubó a 70 °C por 5 min.
4. A cada tubo se le adicionó 32 µL de TE (10/1, pH 7.5) para un volumen final de 40 µL.

2.2.2.3 Amplificación del promotor del gen *SERK1* de *Coffea canephora*

2.2.2.3.1 Primera reacción de PCR

La amplificación del promotor del gen *CcSERK1* se realizó a partir de las bibliotecas generadas mediante la técnica de PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), utilizando cebadores específicos, la reacción se realizó de la siguiente manera:

1. Para la primera PCR se tomó 1.0 µL de cada biblioteca y se preparó la siguiente mezcla principal de PCR para cada reacción.

Cuadro 2.3 Mezcla de PCR

Componentes	Volumen (µL)	6 reacciones (µL)
H ₂ O desionizada	19.5	117
Amortiguador 10X advantage 2 PCR	2.5	15
dNTP (10 mM)	0.5	3.0
Cebador AP1 (10 µM)	0.5	3.0
Mezcla advantage 2 polymerase (50X)	0.5	3.0
Volumen final	23.5	141

2. A cada uno de los tubos (marcados como 1A-6A) se le adicionó 23 µL de la mezcla principal de PCR.
3. Para las reacciones de 1A-4A (reacción para cada una de las bibliotecas) se le adicionó 0.5 µL (10µM) de GSP1 (cebador específico para el gen *CcSERK1*) a cada tubo. Para las reacciones 5A-6A, se le adicionó 0.5 µL (10 µM) de PCP1 a cada tubo (cebador específico para el control positivo).
4. Posteriormente se le adicionó 1.0 µL de cada biblioteca (incluyendo los controles positivos) a los tubos debidamente etiquetados.

- Los productos de PCR se fraccionaron en un gel de agarosa al 1.0 % y se tiñeron con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio (BrEt).

2.2.2.3.2 Segundo PCR (PCR anidado)

El PCR anidado, se realizó de la siguiente manera:

- Como templado se tomó el primer PCR (incluyendo los controles positivos), del cual se tomó $1.0 \mu\text{L}$ de cada reacción y se diluyó en $49.0 \mu\text{L}$ de H_2O desionizada.
- Se preparó la siguiente mezcla principal de PCR:

Cuadro 2.4 Mezcla de PCR

Componentes	Volumen (μL)	6 reacciones (μL)
H_2O desionizada	19.5	117.0
Amortiguador 10X advantage 2 PCR	2.5	15.0
dNTP (10 mM)	0.5	3.0
Cebador AP2 (10 μM)	0.5	3.0
Advantage 2 polymerase (50X)	0.5	3.0
Volumen final	23.5	141.0

- Se adicionó $23.5 \mu\text{L}$ de la mezcla principal de PCR a cada tubo.
- A las reacciones etiquetada como 1B a 4B (reacción de cada biblioteca generada), se le adicionó $0.5 \mu\text{L}$ (10 μM) de GSP2 (cebador específico para el gen *CcSERK1*) a cada tubo. Para las reacciones 5B a 6B, se le adicionó $0.5 \mu\text{L}$ (10 μM) de PCP2 (cebador específico para el control positivo) a cada tubo.
- Posteriormente se le adicionó $1.0 \mu\text{L}$ de la dilución (del Paso 1) a los tubos marcados apropiadamente.
- Los productos de PCR anidado se fraccionaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio (BrEt).

2.2.2.3.3 Extracción y purificación de ácidos nucleicos de geles de agarosa

La extracción y purificación del cDNA del gel de agarosa se realizó mediante la metodología del NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Clontech), descrita en el anexo I.IV.

2.2.2.4 Ligación de los productos de PCR en el vector pGEM-T-Easy®

Los productos de PCR purificados se ligaron directamente en el vector pGEM-T-Easy® (Promega). La ligación se realizó de la siguiente manera para cada fragmento:

Cuadro 2.5 Reacción de ligación

Componentes	Volumen (µL)
Amortiguador de ligación 2X	5.0
Vector pGEM-T-Easy® (50 ng).	1.0
Inserto DNA (150 ng)	3.0
T4 DNA ligasa (3U)	1.0
H ₂ O	-----
Volumen final	10.0

- Se incubó a T/A por 1 h., posteriormente se realizó la transformación de células competentes de *E. coli*.

2.2.2.4.1 Transformación de *E. coli* por choque térmico

La transformación genética se realizó mediante choque térmico, de acuerdo con el siguiente protocolo:

1. Se descongeló las células competentes en hielo (100 µL de células competentes).
2. Se adicionó 1.0 µL de plásmido (~5 ng DNA) a las células, se mezcló suavemente y se incubó en hielo por 30 min.
3. Se aplicó a las células un choque térmico por 45 seg. a 42°C en baño maría, se colocó inmediatamente en hielo por 2 min.
4. Se adicionó 0.9 mL de medio LB y se colocó en agitación a 200 rpm por 1 h a 37 °C.

5. Se sembró masivamente 100 μL del cultivo en cajas petri con medio LB sólido conteniendo 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ampicilina. Se incubó toda la noche a 37 °C.

2.2.2.4.2 Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina

Se realizó el aislamiento de DNA plasmídico (pDNA) a partir de un cultivo de bacterias transformadas, de acuerdo con la metodología de lisis alcalina descrita en el anexo I.V.

2.2.2.4.3 Análisis de identidad del DNA plasmídico

A las colonias transformadas con los fragmentos del promotor del gen *CcSERK1* se les realizó los siguientes análisis de identidad:

- a) Liberación de insertos con las enzimas de restricción.
- b) Re-amplificación del inserto de interés mediante PCR.
- c) Secuenciación de las clonas positivas.

2.2.3 Análisis bioinformático del promotor del gen *CcSERK1*

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se realizó utilizando diferentes programas diseñados para el análisis de promotores en plantas, como PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>), PLANT-PAN (<http://plantpan2.itps.ncku.edu.tw/>) web tools, PLANT-CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

La alineación de la secuencia de DNA del promotor del gen *CcSERK1* aislado en este trabajo con la secuencia de DNA correspondiente al del genoma de café se realizó utilizando el programa MultAlin On Line (Corpet, 1988).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Aislamiento y clonación del promotor del gen *CcSERK1*

Para el aislamiento del promotor del gen *CcSERK1* se utilizó la metodología del GenomeWalker Universal, que permite obtener secuencias de DNA río arriba a partir de un fragmento conocido. En primer lugar, se construyeron las bibliotecas de GenomeWalker a partir de DNA genómico de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*.

La integridad del gDNA se verificó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, (Figura 2.1) y la pureza se determinó mediante absorción espectrofotométrica (Nanodrop 2000).

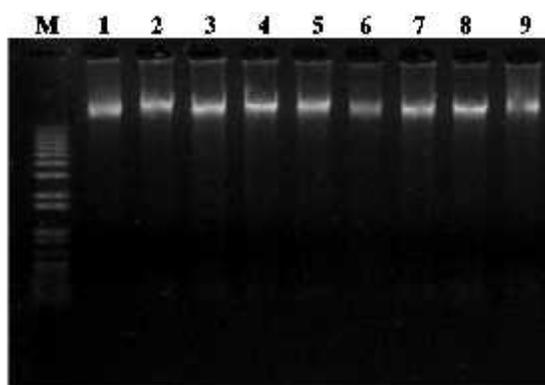


Figura 2.1 Aislamiento de DNA genómico de plántulas de *C. canephora*. Una alícuota de 2.0 μL de gDNA fue fraccionada por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y teñida con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1-9: Diferentes muestras de gDNA.

2.3.1.1 Purificación y digestión de DNA genómico de *Coffea canephora*

Se realizó la purificación de gDNA con la finalidad de eliminar los residuos de los componentes de la extracción. La integridad de las muestras purificadas se muestra en la figura 2.2A. A continuación, se realizó la digestión de gDNA con enzimas de restricción que generan extremos romos (*DraI*, *EcoRV*, *PvuII*, *StuI*), se utilizó 2.5 μg de gDNA para cada

enzima. Como control positivo se realizó la digestión de gDNA de humano (Kit) con la enzima *PvuII*. Los resultados de las digestiones se muestran en el anexo I.VI. Posteriormente, las muestras de gDNA digeridas se purificaron para eliminar todos los componentes de la reacción de digestión, para que no causaran algún problema al momento de hacer las ligaciones con los adaptadores. Como puede apreciarse en la figura 2.2B, el gDNA digerido libre de residuos de los componentes de la digestión.

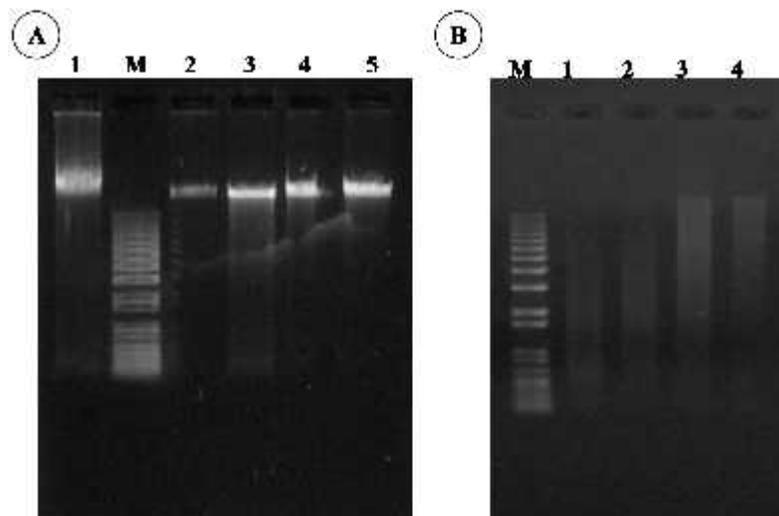


Figura 2.2 Purificación y Digestión de DNA genómico. Una alícuota de 3.0 μL de gDNA fue fraccionada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 % y teñida con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) Purificación de gDNA; Carril 1: gDNA Control; Carril 2: gDNA sin purificar; Carril 3-5: gDNA purificado. B) Purificación de gDNA digerido. Carril 1: gDNA digerido con la enzima *DraI*; Carril 2: gDNA digerido con la enzima *EcoRV*; Carril 3: gDNA digerido con la enzima *PvuII*; Carril 4: gDNA digerido con la enzima *StuI*. M: Escalera de peso molecular de 1 Kb.

Una vez que se corroboró el éxito en la digestión enzimática, se continuó con la ligación de los adaptadores a las muestras de gDNA digeridas con las diferentes enzimas, teniendo como resultado la construcción de las cuatro bibliotecas GenomeWalker.

2.3.1.2 Amplificación del promotor del gen *CcSERK1*

Se realizó la amplificación del promotor del gen *CcSERK1* mediante la técnica de PCR a partir de las bibliotecas generadas, utilizando cebadores específicos (GSP1) y universales (AP1). Los resultados se muestran en la figura 2.3A. Se amplificó una serie de bandas difusas en todas las bibliotecas, con tamaños que van de 200 pb hasta 7,000 nucleotidos. En la biblioteca generada con la enzima *DraI* (carril 3), se obtuvo un fragmento discreto y abundante de aproximadamente 800 pb, mientras que en la biblioteca generada con la enzima *StuI* (carril 6) se amplificó una banda de 2,000 pb. Se procedió entonces a realizar una segunda PCR (PCR anidado), tomando como templado la primera reacción de PCR con pares de cebadores específicos y universales más internos (GSP2 y AP2). Los resultados de esta segunda reacción se muestran en la figura 2.3B.

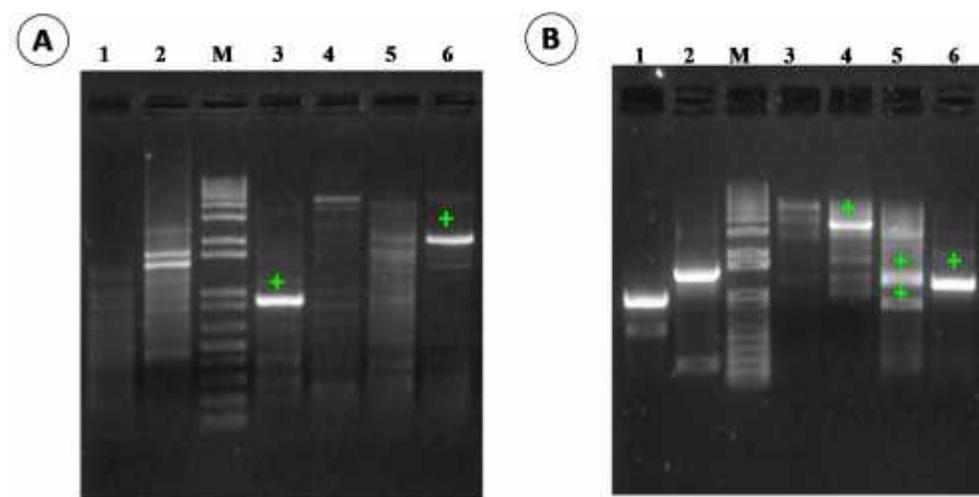


Figura 2.3 Amplificación del promotor del gen *CcSERK1* a partir de las bibliotecas GenomeWalker. Una alícuota de 5.0 μL de las amplificaciones de PCR como posibles segmentos del promotor de *CcSERK1* fue fraccionada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 % y teñida con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio y fotografiadas. A): Primer PCR; B): PCR anidado: Carril 1-2: Control positivo, carril 3: Amplificación a partir de la biblioteca generada con *DraI*; Carril 4: Amplificación a partir de la biblioteca generada con *EcoRV*; Carril 5: Amplificación a partir de la biblioteca generada con *PvuII*; Carril 6: Amplificación a partir de la biblioteca generada con *StuI*. M: Escalera de peso molecular de 1 Kb.

Como resultado del PCR anidado, ya no se obtuvieron las bandas obtenidas en la primer PCR, pero se obtuvieron otras bandas discretas. En tres de las bibliotecas se obtuvieron bandas de aproximadamente 3,000 pb, 1,500 pb, 1,300 pb y 8,00 pb excepto en la biblioteca generada con la enzima *DraI* (carril 3), en donde no se obtuvo ninguna amplificación específica. En los testigos positivos se obtuvo los fragmentos del tamaño esperado (carril 1 y 2). Se continuó con la extracción y purificación de los fragmentos a partir del gel de agarosa (marcados con una cruz verde), con la metodología de NucleoSpin Gel and PCR Clean-Up (Clontech), descrita en el anexo I.IV.

2.3.1.3 Clonación de los fragmentos del promotor de CcSERK1 en el vector pGEM-T-Easy

Se realizó la ligación de los fragmentos purificados (150 ng de cada fragmento) en el vector pGEM-T-Easy®, mediante la enzima T4 DNA ligasa, se incubó por 1 h a temperatura ambiente, posteriormente, se transformó células competentes de *E. coli* DH5 por choque térmico con los productos de la ligación. Se continuó con la selección de colonias transformadas en un medio selectivo con ampicilina mediante la selección fenotípica (actividad de lac Z).

2.3.1.4 Análisis de clonas recombinantes positivas mediante amplificación por PCR

Se realizó el aislamiento de pDNA a partir de un cultivo de bacterias transformadas (anexo I.VII). Previo al envío para la secuenciación de las clonas positivas, se corroboró mediante PCR el tamaño de los fragmentos clonados, utilizando cebadores universales M13. Los resultados se muestran en la figura 2.4.

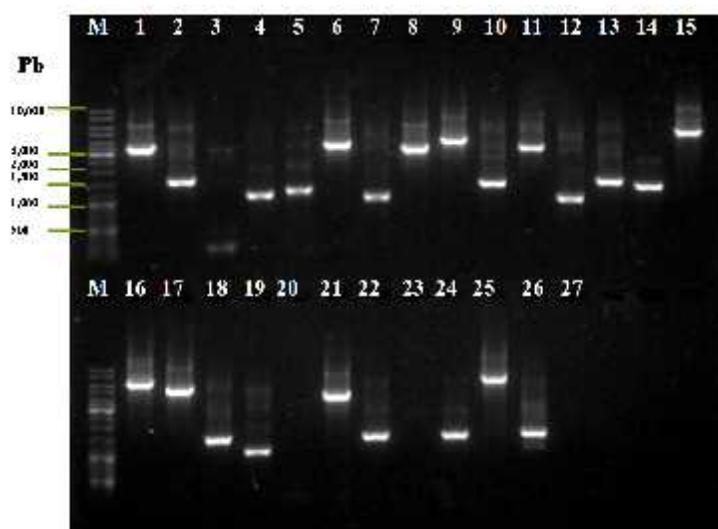


Figura 2.4 Amplificación del promotor del gen *CcSERK1* a partir de pDNA. Una alícuota de 5.0 μ L de las amplificaciones de PCR a partir de colonias positivas transformadas con los fragmentos correspondientes a segmentos putativos del promotor de *CcSERK1* fue fraccionada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.0 % y teñida con 1 μ g·mL⁻¹ de bromuro de etidio y fotografiadas. Carril 1, 6, 8, 9, 11, 21: Fragmentos de 3,000 pb; Carril 2, 10, 13: Fragmentos de 1,500 pb; Carril 3, 14, 18, 22, 24, 26: Fragmentos de 1,300 pb; Carril 4, 6, 7, 12, 19: Fragmentos de 1,000 pb. M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

Se obtuvo los fragmentos del tamaño esperado, excepto las clonas del carril 15, 16, 17 y 25 que tienen un tamaño mayor a 5,000 pb, los cuales no coinciden con los tamaños de los fragmentos que fueron ligados. Una vez que se verificó la identidad de los pDNA, se enviaron 19 clonas para su secuenciación a la empresa Davis Sequencing (Sacramento, California).

2.3.2 Análisis bioinformático de las secuencias clonadas como promotor putativo del gen *CcSERK1*

La secuencia más grande que se obtuvo es de -1,244 pb. Se realizó el alineamiento de esta secuencia con los cebadores con el que se amplificó (anexo I.VIII). Los cebadores se alinearon correctamente, así como la secuencia codificante de *CcSERK1* (110 pb) del cual se partió

para el diseño de los cebadores. También se realizó el alineamiento de la secuencia obtenida con la region UTR-5' de *CcSERK1* y los resultados son los que se muestran en la figura 2.5, la region UTR alineó correctamente con la nueva secuencia.

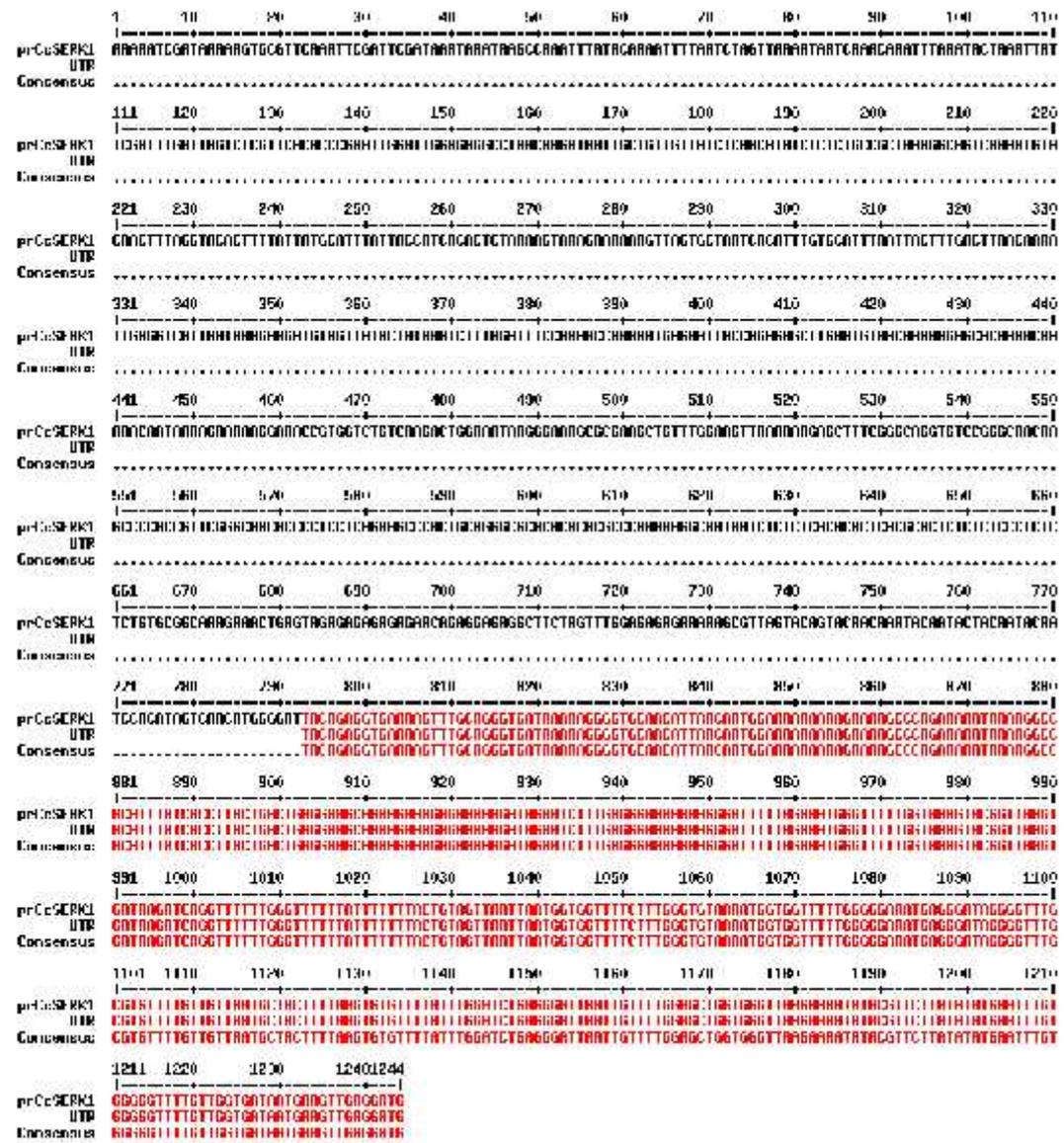


Figura 2.5 Alineamiento de la secuencia del promotor del gen *CcSERK1* con la region 5'-UTR de *CcSERK1* (secuencia en color rojo). El alineamiento se realizó con el programa *multalin* (Corpet, 1988).

Por otra parte, una vez publicado el genoma de café (<http://coffee-genome.org/>), se pudo realizar un análisis adicional de alineamiento de la secuencia aislada en este trabajo con la reportada en la base de datos (anexo I.IX). El alineamiento demostró que ambas secuencias tienen una identidad del 98 %. Con base en ello, se decidió clonar un fragmento más grande del promotor del gen *CcSERK1*, de -1,620 pb (-2,072 pb si se incluye la región no traducible 5' del gen [Figura 2.6]), debido a que un fragmento mayor ofrece mayores posibilidades para aislar el promotor completo y permite también hacer un mejor análisis de disección del promotor.

Con la secuencia de -1,620 pb se realizó el análisis bioinformático utilizando el programa PLACE y PLANT PAN 2.0. Como resultado de ese análisis se encontraron diferentes elementos en *cis* (anexo I.X) en la secuencia del promotor, como ejemplo se puede mencionar que se encontró la caja CAAT, la caja TATTA, las cuales forman parte del promotor mínimo y son importantes para el inicio de la transcripción, se encontraron elementos de respuestas (REs por sus siglas en inglés) a factores biótico y abióticos, elementos de tejidos específicos (OSE2ROOTNODULE, POLLEN1LELAT52), así como REs reguladores de crecimiento vegetal (RCV) como citocinina (ARR1AT), auxina (AuxRE), etileno (EIN3, ERELEE4, ERF), giberelinas (GRAS, GAREAT, MYBGAHV) y ácido abscísico (AREB2; ABF4). Se encontraron REs específicos para reguladores homeóticos, el *prCcSERK1* contiene REs para *BABY BOOM* (*BBM*), *WUSCHEL* (*WUS*) y *ANTEGUMENTA* (*ANT*), *AGAMOUS-like 15* (*AGL15*) y contiene múltiples REs para *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*). En la tabla 2.1 y figura 2.6 se muestra algunos REs presentes en el promotor de *CcSERK1*.

presentes en el promotor del gen *CcSERK1*. La secuencia de DNA de -1,620 pb del promotor de *CcSERK1* se analizó con el software PLACE y Plant Pan 2.0. El codón inicial de Met ATG está subrayado. El sitio de inicio de la transcripción se indica con una flecha en la posición +1. Los REs de BBM, WUSCHELL y ANT están enmarcados con una doble línea, los REs a LEC1 están en marcados con una línea. Los cuatro AuxRE están enmarcados con una línea en negrita y la caja predicha de TATA está doblemente subrayada.

Tabla 2.1 Elementos responsivos en *Cis* presentes en el promotor del gen *CcSERK1*

Elementos en <i>cis</i>	Secuencia	Posición (cadena)	Función	Referencias
AGAMOUS-like 6,8, 10, 11, 13, 14, 17, 18;	caatggaaaaaaAGA AAagc	-388, 1,328 (+)	Sitio de unión de la proteína AGAMOUS.	Huang <i>et al.</i> , 1996;
AGAMOUS-like 15	CAA AAATATG CATTtaatag	-1,585, 1,613 (+)	Sitio de unión de la proteína AGAMOUS-like 15	de Folter <i>et al.</i> , 2006; Tang <i>et al.</i> , 2003;
Aintegumenta (ANT)	gttcacaCCCGAat	-702 (+)	Proteína del ciclo de la división celular.	Nole-Wilson <i>et al.</i> , 2000; Krizek <i>et al.</i> , 2000; Elliott <i>et al.</i> , 1996; Klucher <i>et al.</i> , 1996;
AREB2; ABF4	ACACAtgt ACAATttt	-545, 1,561, 5,45 (+)	Elemento Responsivo a ácido abscísico.	Busk <i>et al.</i> , 1998; Shen <i>et al.</i> , 1995;
ARF; IAA22	TaCGACAaa	-1,165 (+)	Factor responsive auxina (ARF).	Weirauch <i>et al.</i> , 2014;
ARR1AT	CGATT	-402, 634, 660, 665, 748, 809, 846, 1406 (+)	ARR1 participa en la vía de señalización de citocinina.	Ross <i>et al.</i> , 2004; Sakai <i>et al.</i> , 2000;
AUXRETGA1GMGH3	TGACTaaa TGAAGtat TGAGGtca	-445, 459, 1,069, 1,261 (+)	Elemento responsivo a auxina.	Liu <i>et al.</i> , 1994;
BBM	cgGCACAagttccattg gcaa	-963 (+)	Sitio de unión de la proteína BABY BOOM.	Matys <i>et al.</i> , 2006;
CCA1	aacATATCtc cAGATAcgtc	-1,010, 1,406 (+)	Asociado al reloj circadiano 1.	Wang <i>et al.</i> , 1997;
CDC5	accGCTGAgcc	-1,300 (+)	Proteína del ciclo de la división celular 5.	Monaghan <i>et al.</i> , 2009;
ERELEE4	ATTTCAA	-1,063 (+)	ERE (Elemento responsivo a etileno).	Tapia <i>et al.</i> , 2005; Itzhaki <i>et al.</i> , 1994;
GAREAT	TAACAag	-157, 323, 419, 1,167, 1,262, 1,538 (+)	GARE (Elemento responsivo a ácido Giberelico).	Ogawa <i>et al.</i> , 2003;
GT1CORE	GGTTAA	-190, 1,083, 1,279 (+)	Elemento responsive a Luz.	Villain <i>et al.</i> , 1996; Gilmartin <i>et al.</i> , 1990;

LEC1	CCAAT	-1620, 1573, 1,509,	Proteína LEAFY COTYLEDON1 [LEC1]. Actúa como un regulador central de la embriogénesis.	Matys <i>et al.</i> , 2006;
	CAAAT	1421, 1,347, 1,328,		
	CCTAT	1,291, 1,191, 1,190,		
	CCATT	1,180, 1,160, 1105,		
	CGAAT	1,059, 1,001, 969,		
	CCTAAT	952, 943... (+)		
LS7ATPR1	ACGTCATAGA ACGACaaata AGGTCattaa	-443, 1,164, 1,287 (+)	Elemento responsivo a ácido salicílico.	Johnson <i>et al.</i> , 2003; Després <i>et al.</i> , 2000; Niggeweg <i>et al.</i> , 2000;
OSE2ROOTNODULE	AAGAG	-1,499 (+)	Elemento específico de órgano (OSE).	Fehlberg <i>et al.</i> , 2005; Vieweg <i>et al.</i> , 2004;
POLLEN1LELAT52	AGAAA	-441, 662, 702, 756, 896, 948, 1,170, 1,346 (+)	Expresión específica en el polen.	Filichkin <i>et al.</i> , 2004; Bate <i>et al.</i> , 1998;
RAV1	tctCAACAtatc	-38, 93, 97, 219, 239, 597, 827, 843, 948, 1,079, 1,229, 1,441, 1,539 (+)	Factor de transcripción responsivo a etileno.	Hu <i>et al.</i> , 2004; Fowler <i>et al.</i> , 2003;
RHERPATEXPA7	TCACGa	-812	RHEs (elemento específico de raíz).	Kim <i>et al.</i> , 2006;
WRKY71OS	TGAC	-459, 724, 1,261, 1,303, 1,527, 1,541 (+)	Represor transcripcional de la vía de señalización de giberelinas.	Xie <i>et al.</i> , 2005; Zhang <i>et al.</i> , 2004;
W-box	TTGAC	-460, 1,528 (+)	Sitio de unión de proteínas WRKY.	Eulgem <i>et al.</i> , 2000; Rushton <i>et al.</i> , 1996; de Pater <i>et al.</i> , 1996;
WRKY	tcGTCAAcaa	-313, 569, 829 (+)	Sitio de unión de WRKY 61.	Eulgem <i>et al.</i> , 2000;
WUSAT (WUS)	TTAATcc	-931 (+)	Proteína WUSCHEL. Juega un papel central durante la embriogénesis temprana, la ovogénesis y la floración. Requerido para especificar la identidad de la célula madre en los meristemos, como el meristemo apical del brote (SAM).	Kamiya <i>et al.</i> , 2003;
ATWOX13	ttTAATTact	-470 (+)	WUSCHEL-relacionado con homeobox 13. Factor de transcripción que puede estar involucrado en varios procesos de desarrollo.	Franco-zorrill <i>et al.</i> , 2014;

2.4 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Mediante la tecnología “Genome Walking” se logró aislar una secuencia localizada corriente arriba del inicio de la transcripción del gen *CcSERK1*. Debido a que el alineamiento de la secuencia aislada tuvo un alto nivel de similitud con la secuencia genómica recientemente reportada en bases de datos, se puede confirmar que el DNA genómico clonado de -1,620 pb debe contener la región del promotor del gen *CcSERK1*. La alta similitud de ambas secuencias constituye una prueba de calidad que confirma la eficiencia con la que se realizó

la clonación de la región del promotor, lo cual se realizó antes de la publicación del genoma de *C. canephora* (<http://coffee-genome.org/>).

En la secuencia genómica de -1,620 pb se identificaron diferentes elementos de respuesta en *cis*, que pudieran estar regulando la expresión del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis somática y en otros procesos de diferenciación presentes en el desarrollo de la planta de *C. canephora* L.

En estudios anteriores, durante el aislamiento y el análisis subsiguiente del complejo de la proteína SERK1, se identificaron dos proteínas que no habían sido previamente aisladas como interactores de SERK1 y se demostró que estaban presentes en el complejo de la proteína SERK1: una proteína dedos de zinc de la familia CONSTANS y el factor de transcripción AGL15 (Karlova *et al.*, 2006.).

Por ejemplo, el promotor de *CcSERK1* tiene sitios de unión de factores de transcripción como AGL15, ANT, BBM, WUSHEL, WOX13, WRKY. Existen evidencias que sugieren que entre las múltiples secuencias reguladoras presentes en los promotores de los genes *SERK* de plantas, las de los factores de transcripción *WUS*, *BBM* y *ANT* pueden inducir el destino embrionario o aumentar el desarrollo embrionario cuando se expresan ectópicamente en tejidos transformados. Zuo *et al.* (2002) demostraron que en *Arabidopsis* *WUS* mantiene la identidad de las células madre embrionarias y su sobreexpresión promueve una transición de vegetativo a embriogénico. La expresión ectópica de homólogos de *BBM* induce la embriogénesis somática en plántulas de *A. thaliana* y *B. napus*, pero no en *Nicotiana tabacum* (Srinivasan *et al.*, 2007). *ANT* es un factor de transcripción sensible al etileno AP2 que forma parte de un sistema molecular que regula la división celular durante el desarrollo del óvulo, el crecimiento de órganos florales (Nole-Wilson *et al.*, 2005; Elliott *et al.*, 1996,) y coordina señales de patrones con proliferación celular y crecimiento de órganos durante la embriogénesis (Krizek, 2009; Nole-Wilson *et al.*, 2009). La sobreexpresión del gen *ANT* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* y tabaco aumenta el número de células en embriones y órganos de brotes (Krizek, 1999).

También se identificó REs para los RCV GAREAT (ácido giberelico), ARR1 (citocinina) y AUXRE (auxina), que son claves para el establecimiento exitoso de la embriogénesis somática en diferentes especies de plantas como *Coffea canephora*.

Estos resultados sugieren que la secuencia del gDNA de -1,620 pb posee la capacidad para regular la expresión del gen *CcSERK1* como respuesta a diferentes señales bióticas y abióticas, por lo que es importante investigar cuáles de estas señales regulan la expresión de *CcSERK1* durante el inicio y el desarrollo de la ES en *C. canephora*.

CAPÍTULO III**ESTUDIO DE LA FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR DEL GEN *SERK1* de *Coffea canephora* L.**

Los resultados presentados en este capítulo forman parte del artículo:

“Cloning of the *Coffea canephora* *SERK1* promoter and its molecular analysis during the cell-to-embryo transition”, por Doribet Jiménez-Guillen^a, Daniel Pérez-Pascual^a, Ramón Souza-Perera^a, Gregorio Godoy-Hernández^a, José Juan Zúñiga-Aguilar^{b*}.

^aUnidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México. ^bInstituto Tecnológico Superior de los Ríos, Km 3 carretera Balancán-Villahermosa, Tabasco 86930, México.

* Autor de correspondencia.

Este artículo ha sido aceptado para su publicación en la revista Electronic Journal of Biotechnology (SCOPUS SciteScore: 2.19; JCR impact factor 2017: 1.881).

3.1 INTRODUCCIÓN

En *Arabidopsis thaliana*, la localización de la proteína AtSERK1 bajo su propio promotor se encontró en los mismos tejidos y etapas de desarrollo en la que fue detectado el ARNm de AtSERK1 mediante hibridación *in situ* por Hecht *et al.* 2001, en célula central del saco embrionario, en el óvulo y durante el desarrollo del polen. En las etapas posteriores de desarrollo de la antera, la proteína AtSERK1-YFP se encontró exclusivamente en el tejido vascular conectivo de la antera y era baja o ausente en los granos de polen. Después de la fertilización, la proteína AtSERK1-YFP se encontró en el embrión globular, y sorprendentemente, la proteína fluorescente se encontró en la epidermis y las células vasculares del embrión en etapa torpedo y cotiledón. Durante el desarrollo de las plántulas, AtSERK1-YFP se detectó en el meristemo de la raíz. En etapa de desarrollo avanzado de la raíz diferenciada, la fluorescencia se restringió por completo al tejido vascular de la raíz. La fluorescencia de AtSERK1-YFP fue mayor durante las primeras etapas de la formación

de raíces laterales y se encuentra predominantemente en el tejido vascular (Kwaaitaal *et al.*, 2005). Por lo tanto, el papel de la señalización de AtSERK1 no se limita a la formación de células embriogénicas (Hecht *et al.* 2001; Schmidt *et al.* 1997).

Otros estudios, mostraron que además de la expresión durante la embriogénesis somática, SERK1 desempeñaba un papel en la pluripotencia (Sanova *et al.*, 2011; Kwaaitaal, 2007; Nolan *et al.*, 2003), formación *in vitro* de brotes (Thomas *et al.*, 2004) y organogénesis (Sharma *et al.*, 2008). El argumento de un papel de SERK en pluripotencia se desarrolló aún más a través de los datos de expresión en *Arabidopsis*. *SERK1* se expresa en las células pluripotentes del procámbium vascular, y se especuló que la función de SERK1 es mantener el carácter pluripotente de las células procambial (Kwaaitaal, 2007). Dado que las células del procámbium son el origen de los embriones somáticos en zanahoria, surge la hipótesis de que SERK1 es un marcador de las células pluripotentes, células que después del tratamiento con las moléculas adecuadas (auxina) son capaces de adquirir totipotencia e iniciar la Embriogénesis Somática (ES) (Kwaaitaal y De Vries, 2007).

En nuestro modelo de estudio se ha analizado previamente el nivel de expresión del gen *CcSERK1* de *C. canephora* durante la embriogénesis somática, encontrándose que el gen se expresa entre los cinco y los diez días después de la inducción del proceso, presentando un pico de expresión a los 25 días, para disminuir después de los 30 días de la inducción (Villanueva-Alonzo, 2006).

En otro estudio, durante el desarrollo del embrión cigótico, *CcSERK1* se transcribe durante el periodo post-antesis (después de la apertura floral), presentando dos picos transcripcionales al primer y siete días post antesis (DPA). Posteriormente, los transcritos de *CcSERK1* se incrementan en la etapa globular o corazón, disminuyendo en las etapas torpedo y cotiledonar. Por otra parte, la sobreexpresión de *CcSERK1* causó un incremento del doble en el potencial embriogénico de los explantes de hojas y además indujo la producción adicional de embriones en la vena central. Sin embargo, la supresión de *CcSERK1* provocó una inhibición casi total de la respuesta embriogénica, en este mismo estudio demostraron que *CcSERK1* es un regulador clave de la iniciación y del avance de la ES y que al menos parte del mecanismo por el cual la cinasa SERK1 de *C. canephora* ejerce su función es a través de la activación del metabolismo de auxinas (Pérez-Pascual

et al., 2018).

Debido a que después de los 25 días comienzan a aparecer las primeras estructuras embrionarias, es probable que la actividad de *CcSERK1* en esa etapa sea decisiva para la transición somática-embrionaria, por lo que el análisis funcional de los elementos de respuesta en su promotor, mediante su disección, puede indicar cuáles son los mecanismos que regulan esta transición.

En el presente trabajo se separó el promotor putativo del gen *CcSERK1* para analizar la funcionalidad de los elementos de respuesta localizados en su secuencia, identificados previamente mediante análisis de informática. Para ello, la secuencia completa, así como una serie de deleciones hacia el extremo 5', se fusionaron al gen reportero *uidA* (- glucuronidasa, GUS) y se transformaron explantes embriogénicos de hojas para evaluar la actividad del promotor durante etapas clave de la embriogénesis somática de *C. canephora*.

Figura 3.1 Mapa del vector pCAMBIA1301. El vector contiene el gen de resistencia a kanamicina para la selección en bacteria, el gen de resistencia a higromicina B para la selección de plantas y el gen reportero *GUSA*, el gen de selección de plantas en el vector pCAMBIA 1301 es dirigido por el promotor CaMV35S. El vector contiene sitios de restricción para modificaciones modulares de plásmidos. pVS1 replicón para alta estabilidad en *Agrobacterium*, la construcción *GUSA* con un intrón (del gen de la catalasa) dentro de la secuencia codificante para asegurar que la expresión de la actividad glucuronidasa se deriva de células eucariotas, no de la expresión por células residuales de *A. tumefaciens*.

3.2.2.1. Eliminación del promotor 35S del vector binario pCAMBIA1301

Se eliminó el promotor 35S del vector pCAMBIA1301 con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*, para sub-clonar los fragmentos del promotor de CcSERK1. La reacción de restricción se realizó de la siguiente manera:

Cuadro 3.1 Reacción de restricción

Componentes	Volumen (µL)
10x Digestión rápida	4.0
Enzimas <i>KpnI/NcoI</i> (1 U)	1.0
pDNA (pCAMBIA1301) (1.0 µg)	1.0
H ₂ O	14.0
Volumen final	20.0

- Se incubó a 37 °C por 1:30 h. Se inactivó a 65 °C por 15 minutos.
- Se fraccionó en un gel de agarosa al 0.6%

Posteriormente, el pDNA digerido (pCAMBIA1301 sin el promotor 35S) se fragmentó por electroforesis, se extrajo y purificó del gel de agarosa, utilizando la metodología del Nucleo Spin Gel and PCR Clean-Up (Clontech), como se describe en el anexo I.IV.

3.2.2.2. Adición de sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *NcoI* a las versiones completa y eliminadas del promotor de CcSERK1

Para la subclonación del promotor de CcSERK1 completo (pCcSERK1::GUS-FL) y de los fragmentos eliminados (pCcSERK1::GUS-1,620, pCcSERK1::GUS-1,048, pCcSERK1::GUS-791 y pCcSERK1::GUS-618) hacia el vector binario pCAMBIA1301 digerido (sin el promotor 35S), se adicionaron sitios de restricción para las enzimas *KpnI* y *NcoI* en los extremos de cada fragmento, mediante amplificación por PCR. Para ello, se diseñaron cebadores a partir de la secuencia del promotor del gen *CcSERK1* con sitios de restricción *KpnI* y *NcoI* (anexo I. XI). La reacción de amplificación, que incluyó en todos los casos la secuencia 5'-UTR del gen *CcSERK1* (de 452 pb), se realizó a partir del fragmento clonado en pGEM T-Easy® (-1,070 y -1,244 pb) o de gDNA (-1,500 y -2,072 pb), de la siguiente manera (cuadro 3.2):

Cuadro 3.2 Reacción de amplificación del promotor de CcSERK1.

Componentes	Volumen (μL)
10 x PCR (Mg ²⁺)	1.0
MgCl ₂ (50mM)	0.3
Mezcla de dNTP's (10mM)	0.2
Cebador-dir. <i>KpnI</i>	0.3
Cebador-rev. <i>NcoI</i>	0.3
Taq polimerasa	0.2
pDNA promotor CcSERK1 (50 ng) o gDNA (200 ng)	-
H ₂ O	-
Volumen final	10.0

3.2.2.3 Sub-clonación de los fragmentos del promotor de CcSERK1 en el vector binario pCAMBIA1301

La sub-clonación del fragmento completo y los fragmentos eliminados del promotor de CcSERK1 se realizaron mediante ligación individual de cada fragmento en el vector binario pCAMBIA1301. Tanto los fragmentos como el vector fueron digeridos previamente con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*. La reacción de ligación se realizó de la siguiente

manera:

Cuadro 3.3 Reacción de ligación

Componentes	Volumen (μL)
Amortiguador de ligación 2x	5.0
Vector pCAMBIA1301 (50 ng)	1.0
Inserto DNA (150 ng)	3.0
T4 DNA ligasa (3U)	1.0
H ₂ O cbp	10.0

- Se incubó a temperatura ambiente por 1 h.
- Posteriormente se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico como se describió anteriormente.
- Se realizó la extracción de pDNA mediante lisis alcalina, descrito en el anexo I.V.

3.2.2.4. Análisis de identidad de DNA plasmídico

El análisis de identidad de las diferentes construcciones pCcSERK1::GUS generadas se realizó mediante la liberación de un inserto del tamaño esperado con enzimas de restricción *KpnI/NcoI* y mediante la amplificación por PCR y verificación del tamaño del amplicón.

3.2.3 Transformación de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones pCcSERK1::GUS

Se realizó la transformación de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con las construcciones pCcSERK1::GUS por el método de congelación-descongelación (Jyothishwaran, *et al.*, 2007), como se describe a continuación:

Para la transformación se tomó un tubo con una alícuota de 100 μL de células competentes de *A. tumefaciens* y se le adicionó el DNA de interés a una concentración de 1 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, congelándose en nitrógeno líquido por 5 min. Posteriormente, se descongelaron las células y se mantuvieron a 37 °C durante 25 min. Transcurrido este tiempo se agregó 900 μL de

medio YEB y se incubó por 3 horas a 28 °C con agitación suave. Finalmente, se centrifugó la mezcla durante 1 min a 10,000 x g, descartando la mayoría del sobrenadante y se re-suspendieron las bacterias en el sobrenadante residual (aproximadamente 200 µL) para sembrarlas en placas que contenían medio YEB-sólido conteniendo los antibióticos de selección estreptomycinina 100 µg·µL⁻¹, rifampicina 10 µg·µL⁻¹ (genes de resistencia presentes en el plásmido residente), y kanamicina 50 µg·µL⁻¹ (gen de resistencia presente en el vector binario).

A las colonias de *A. tumefaciens* obtenidas de la transformación se les realizó un análisis de identidad de las construcciones generadas, mediante la amplificación por PCR de los fragmentos clonados y la verificación del tamaño de amplicón mediante su fragmentación por electroforesis en gel de agarosa.

3.2.4 Transformación genética de explantes de *C. canephora* con las construcciones pCcSERK1::GUS

Una vez que se obtuvieron las cepas transformadas de *A. tumefaciens* con las construcciones generadas, se procedió a la transformación de los explantes foliares de *C. canephora* por el método de infiltración al vacío y co-cultivo, como se describe a continuación:

Los explantes foliares obtenidos de plantas pre-acondicionadas con ANA y KIN, fueron colocados en un tubo falcón conteniendo los cultivos bacterianos de *A. tumefaciens* transformados con las construcciones génicas (pCcSERK1::GUS-FL, pCcSERK1::GUS-1048, pCcSERK1::GUS-792, pCcSERK1::GUS-618), y fueron sometidos a infiltración al vacío (400 mm de Hg) durante 5 minutos. Después de la agroinfiltración, los explantes fueron co-cultivados durante 48 hrs en medio MS líquido sin antibióticos, en oscuridad a 28 °C. Posteriormente, las bacterias fueron eliminadas del explante mediante 4 lavados con cefotaxima 1,0 g·L⁻¹ y timetina 400 mg·L⁻¹ en agitación, por períodos de 12 horas. Después del último lavado, los explantes fueron colocados en medio de inducción para continuar con el proceso de embriogénesis somática (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

3.2.5 Análisis de funcionalidad del promotor de CcSERK1 durante la embriogénesis somática de *C. canephora* L.

El análisis de funcionalidad de pCcSERK1::GUS-FL y los fragmentos pCcSERK1::GUS-1048, pCcSERK1::GUS-792, pCcSERK1::GUS-618 se realizó mediante la tinción histoquímica de GUS a los 25, 35, 50 y 60 días después de la inducción (DDI) de los explantes transformados al proceso de embriogénesis somática. La reacción histoquímica de GUS se realizó de la siguiente manera:

El tejido transformado se colocó en la solución de tinción [NaH₂PO₄ 200 mM, Na₂EDTA 10 mM, K₄Fe (CN)₆·3H₂O 0.5 mM, K₃Fe (CN)₆ 0.5 mM, Triton X-100 0.2%, pH 7.0. Se adicionó metanol (20% v/v) para eliminar cualquier evento endógeno o expresión de interferencia del gen GUS no integrado (Leroy *et al.*, 2007)], protegiendo las muestras de la luz, ya que la solución es fotosensible. Se incubó toda la noche a 37 °C. Posteriormente se removió la solución de tinción y se eliminó la clorofila de los explantes foliares con lavados sucesivos con una mezcla de metanol:acetona (3:1, v:v) hasta que no se detectó el color verde en el tejido. Para su conservación, los explantes fueron embebidos en una solución de glicerol al 80% en H₂O.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Análisis de funcionalidad del promotor del gen *CcSERK1*

3.3.1.1 Construcción de los vectores binarios pCcSERK1::GUS

El análisis de funcionalidad del promotor putativo de *CcSERK1* se realizó mediante su disección y posterior análisis de la capacidad de los diferentes fragmentos (pCcSERK1::GUS-FL, pCcSERK1::GUS-1048, pCcSERK1::GUS-792, pCcSERK1::GUS-618) para dirigir la expresión del gen reportero *uidA* en explantes transformados de *C. canephora*. Lo primero que se hizo fue corroborar la identidad del vector pCAMBIA1301, linearizándolo mediante la digestión de 1 µg de pDNA con la enzima de restricción *KpnI*. Como puede observarse en la figura 3.2A, la digestión generó una banda de aproximadamente 11,850 pb, que es el tamaño esperado para el vector linearizado. A continuación se eliminó del vector el promotor 35S (762 pb), mediante la digestión de 1 µg de pDNA con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*. Los resultados se muestran en la figura 3.2B.

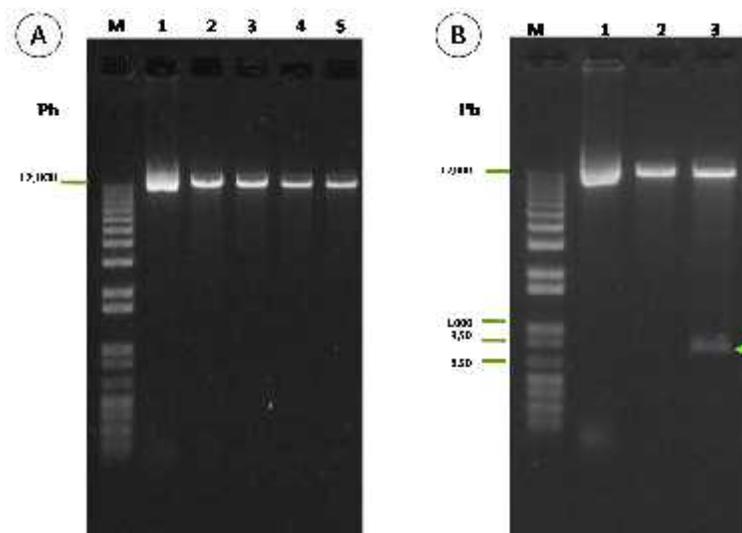


Figura 3.2 Eliminación del promotor 35S del vector pCAMBIA1301. Alícuotas de 3.0 µL del plásmido pCAMBIA1301 digerido con diferentes enzimas de restricción fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidas con 1 µg·mL⁻¹ de bromuro de etidio. A: Carril 1: Plásmido sin

digerir; Carriles 2-5: Plásmido digerido con *Kpn*I. B: Carril 1: Plásmido sin digerir; Carril 2: Plásmido digerido con *Kpn*I; Carril 3: Doble digestión del plásmido con *Kpn*I y *Nco*I. M: Escalera de DNA de 1 kb.

Una vez que se corroboró la eliminación del promotor 35S del vector pCAMBIA1301, el pDNA linearizado se extrajo del gel de agarosa y se purificó para las reacciones de ligación.

A continuación, se amplificaron por PCR los diferentes fragmentos del promotor de *CcSERK1*, con los cebadores diseñados con sitios de corte para las enzimas de restricción *Kpn*I y *Nco*I. En la figura 3.3A se muestra la amplificación de los fragmentos del tamaño esperado de -1,070 pb y de -1,244 pb (que incluyen la región 5'-UTR de 452 pb), los cuales fueron aislados y clonados en este trabajo mediante la metodología del GENOME WALKER. En la figura 3.3B se muestra la amplificación de los fragmentos del tamaño esperado de -1,500 pb (carril 1) y de -2,072 pb (carril 3), los cuales fueron aislados y clonados a partir de gDNA. Los fragmentos amplificados se digirieron con las enzimas *Kpn*I y *Nco*I y se purificaron para eliminar los componentes de la digestión. Posteriormente, los diferentes fragmentos del promotor de *CcSERK1* fueron clonados en el vector binario pCAMBIA1301 linearizado, carente del promotor 35S.

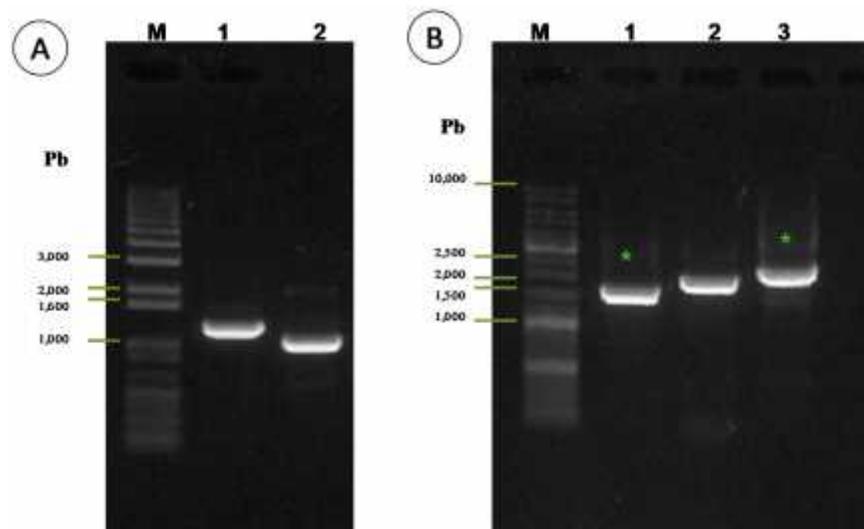


Figura 3.3 Amplificación de los fragmentos del promotor del gen *CcSERK1* con sitios de enzimas de

restricción *KpnI/NcoI*. Alícuotas de 5.0 μL de los productos de PCR fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidas con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A): Carril 1: promotor CcSERK1-1,244 pb; Carril 2: promotor CcSERK1-1,070 pb. B): Carril 1: promotor CcSERK1-1,500 pb; Carril 3: promotor CcSERK1-2,072 pb. M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

Por consiguiente, se procedió a la obtención de pDNA de las diferentes construcciones generadas (pCcSERK1::GUS-FL, pCcSERK1::GUS-1048, pCcSERK1::GUS-792 y pCcSERK1::GUS-618), por lo tanto se transformó la cepa DH5 de *E. coli* con dichas construcciones mediante la técnica de choque térmico descrito en materiales y métodos del capítulo II. Las colonias positivas detectadas por alfa complementación (colonias blancas) fueron picadas y se cultivaron en medio LB líquido para la extracción de pDNA de acuerdo con la metodología de lisis alcalina descrita en el anexo I.V.

La corroboración preliminar de la identidad de los pDNA (pCcSERK1::GUS) se hizo por PCR y mediante la liberación del inserto con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*. Los resultados de este análisis se muestran en las figuras 3.4 y 3.5. En la figura 3.3 solo se muestra los resultados de tres clonas (en el anexo I.XII se muestra el análisis por PCR de todas las clonas obtenidas) con el fragmento del promotor de -1,244 pb.

Los resultados fueron positivos en las tres clonas analizadas por PCR, se obtuvo el fragmento del tamaño esperado de -1,244 pb, compárandola con el testigo positivo (pCcSERK1-pGEM-T-Easy). Como testigo negativo se realizó la amplificación a partir del vector pCAMBIA1301 sin inserto, para descartar que los cebadores pudieran alinear en la secuencia del vector. Como resultado, no hubo amplificación con el vector vacío (Figura 3.4A). Con respecto a la prueba de digestión enzimática, los resultados también fueron positivos, pues se obtuvo la liberación del fragmento del promotor de CcSERK1 del tamaño esperado (Figura 3.4B).

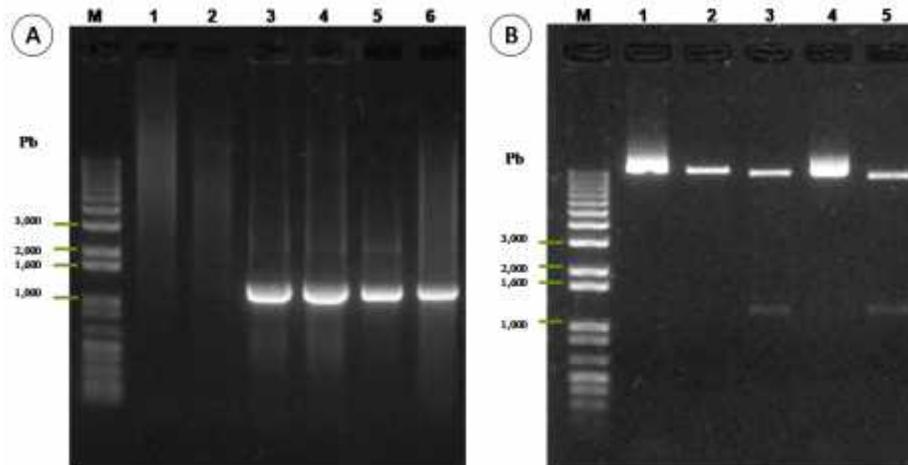


Figura 3.4 Análisis de identidad de las construcciones pCcSERK1::GUS. Una alícuota de 5.0 μL de los productos de PCR (A) o de digestión enzimática (B) fue fraccionada por electroforesis en agarosa al 1% y teñida con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) Amplificación por PCR: Carriles 1 y 2: Vector pCAMBIA1301 vacío; Carriles 3-5: pCcSERK1::GUS-1,244 pb; Carril 6: Testigo positivo pGEM/prCcSERK1. B) Digestión enzimática. Carril 1: Plásmido pCAMBIA1301 sin digerir; Carriles 2 y 4: pCcSERK1::GUS-1,244 sin digerir; Carriles 3 y 5: pCcSERK1::GUS-1,244 digerido con *KpnI* y *NcoI*; M: Escalera de DNA de 1 kb.

En la figura 3.5A se muestra las amplificaciones de las construcciones pCcSERK1::GUS con los fragmentos de -1,500 pb y -2,070 pb (Incluyendo la región 5'-UTR-452 pb) del prCcSERK1. En la figura 3.5B se muestra los resultados de la liberación de los fragmentos con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*, solo en una clona no hubo liberación de inserto (carril 10). Como se puede observar en la figura se obtuvo la liberación de los fragmentos del tamaño esperado. Con estos resultados se puede afirmar que se logró clonar las construcciones con el promotor nativo y con las eliminaciones (deleciones) en el promotor del gen *CcSERK1*.

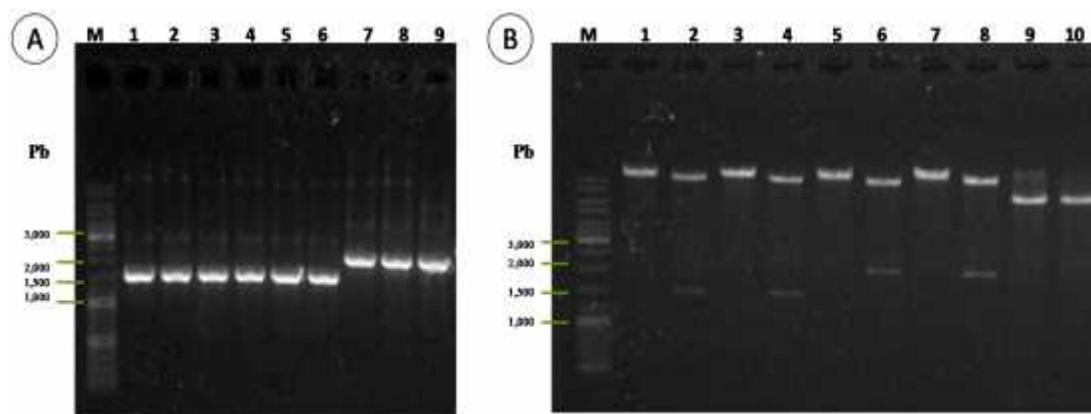


Figura 3.5 Análisis de identidad de las construcciones pCcSERK1::GUS. Alícuotas de 5.0 μL de los productos de PCR y de la digestión enzimática fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidas con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) PCR: Carril 1-6: pCcSERK1::GUS-1,048 pb; Carril 7-9: pCcSERK1::GUS-FL (-1,620 pb); B) Digestión: Carril 1,3: pCambia1301 sin digerir; Carril 2, 4: pCcSERK1::GUS-1,048 pb digerido con *KpnI/NcoI*; Carril 5, 7, 9: pCambia1301 sin digerir; Carril 6, 8, 10: pCcSERK1::GUS-FL (-1,620). M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

3.3.1.2 Transformación de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* con las construcciones pCcSERK1::GUS

Se realizó la transformación de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con las diferentes construcciones pCcSERK1::GUS generadas y con el vector vacío (Figura 3.8). La transformación se corroboró mediante la técnica de PCR a partir de colonias transformadas, utilizando cebadores específicos para la amplificación de los fragmentos del pCcSERK1. Los resultados se muestran en las figuras 3.6A, 3.6B, 3.7A y 3.7B. En la figura 3.6A se muestra la amplificación de un fragmento de -1,244 pb correspondiente al tamaño esperado de la construcción pCcSERK1::GUS-1,244. Como testigo negativo se usó una clona transformada con el vector vacío pCambia1301, la cual se corroboró utilizando cebadores específicos para el gen reportero *uidA*, dando como resultado el fragmento esperado de 593 pb, (Figura 3.6A, carril 8).

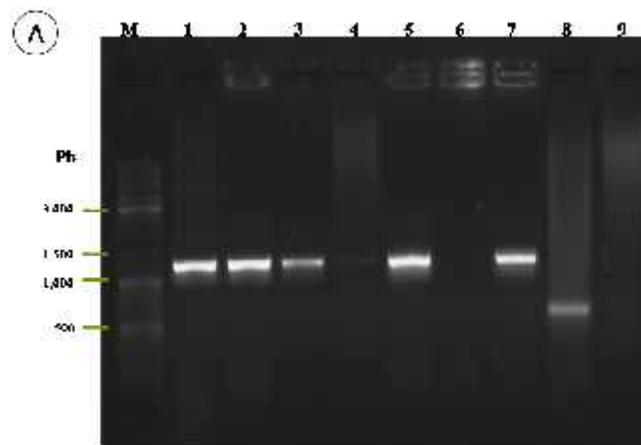


Figura 3.6 PCR de la transformación de *A. tumefaciens* con pCcSERK1::GUS. Alícuotas de 5.0 μL de los productos de PCR fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidas con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A): Carril 1: Control positivo (pCcSERK1::GUS); Carril 2-7: pCcSERK1::GUS-792 pb; Carril 8: pCAMBIA1301 sin inserto; Carril 9: Control negativo. M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

En las figuras 3.7A y B se muestran los resultados de la amplificación de los fragmentos de -1,070 pb, -1,500 pb y -2,072 pb, a partir de las correspondientes colonias transformadas de *A. tumefaciens*.

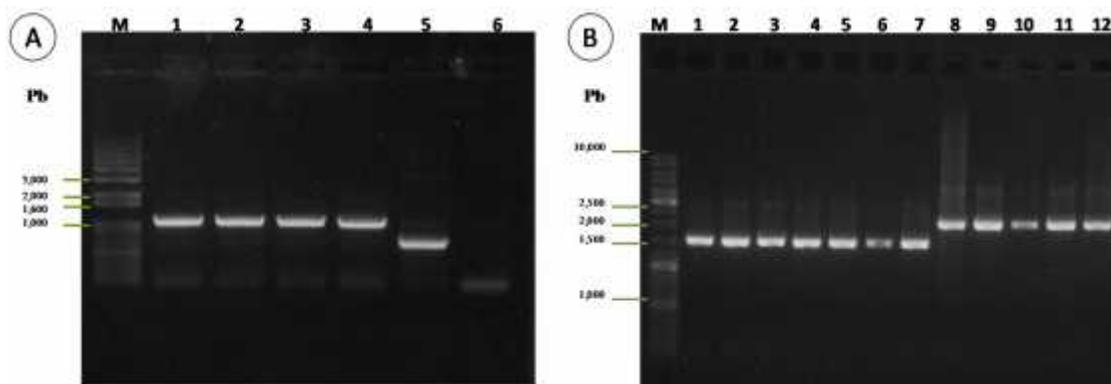


Figura 3.7 PCR de la transformación de *A. tumefaciens* con las construcciones pCcSERK1::GUS. Alícuotas de 5.0 μL de los productos de PCR fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñidas con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) Carril 1-4: pCcSERK1::GUS-618 pb; Carril

5: pCAMBIA1301 sin inserto; Carril 6: Control negativo. B) Carril 1-7: pCcSERK1::GUS-1,048 pb; Carril 8-12: pCcSERK1::GUS-1,620 pb. M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

Una vez que se corroboró la transformación de *A. tumefaciens* con las construcciones correctas, se procedió a la transformación genética de los explantes correspondientes, para realizar el análisis funcional del promotor del gen *CcSERK1*. Se utilizaron explantes de hoja de *C. canephora* y plantas de *N. benthamiana* de 6 semanas de edad cultivadas *in vitro*.

3.3.1.3 Transformación genética de explantes de *C. canephora* con pCcSERK1::GUS

Como ya se mencionó, el análisis de la funcionalidad del promotor del gen *CcSERK1* se realizó mediante el monitoreo de la actividad de la β -glucuronidasa (tinción histoquímica de GUS), en etapas clave del proceso embrionario (25, 35, 50 y 60 DDI), en explantes embriogénicos de hojas de *C. canephora*, transformados genéticamente con las construcciones pCcSERK1::GUS (promotor completo [pCcSERK1::GUS-FL] y eliminado [pCcSERK1::GUS-1048, pCcSERK1::GUS-792, pCcSERK1::GUS-618]). En la figura 3.8 se muestra un esquema del tamaño de estos plásmidos y de los REs presentes en cada uno de ellos.

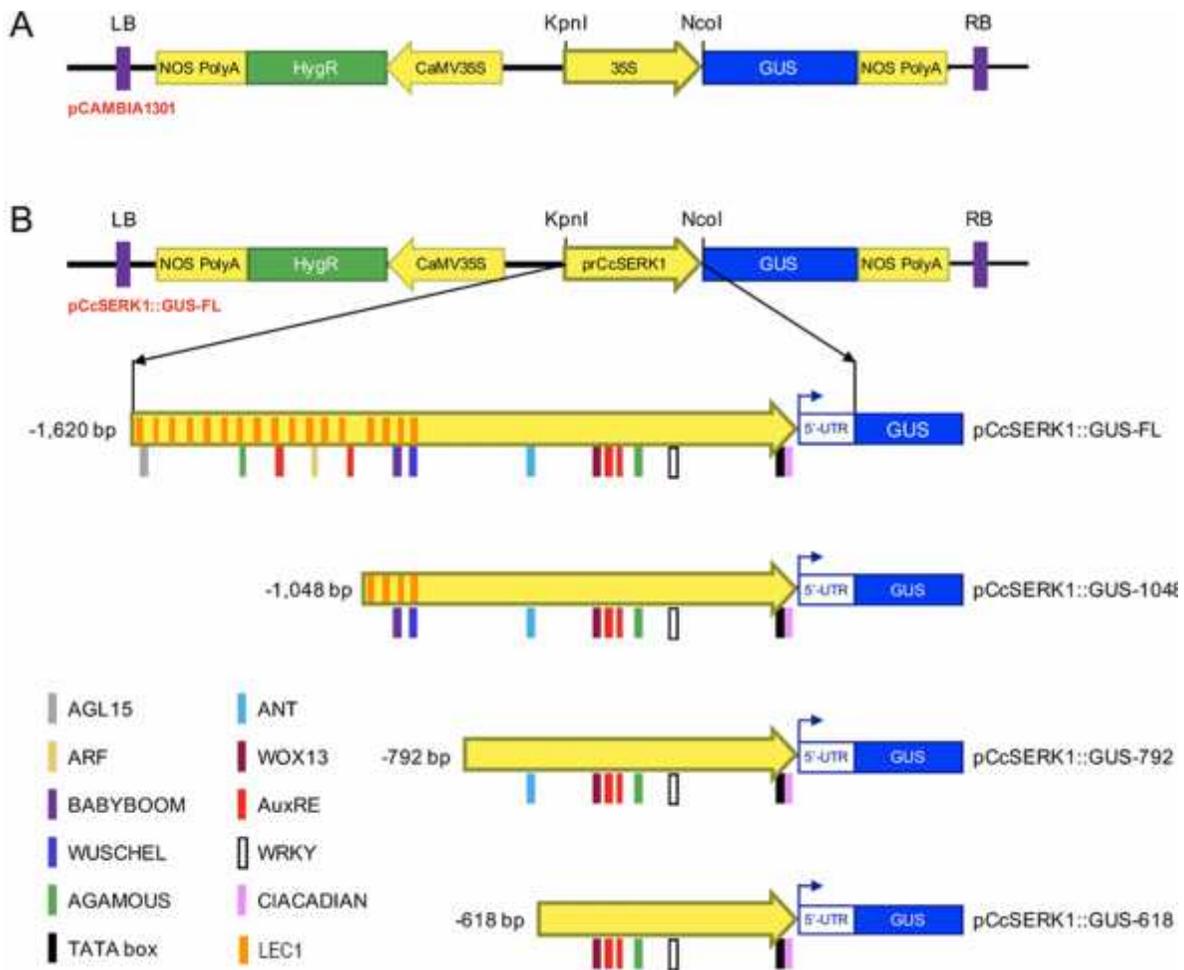


Figura 3.8 Diagrama de los vectores pCcSERK1::GUS. A) Se muestra un esquema del T-DNA presente en el plásmido binario pCAMBIA1301, con los elementos regulatorios del gen de selección (HygR) y del gen reportero (GUS). B) En las series se muestra cada región del promotor putativo del gen *CcSERK1* que reemplazó al promotor 35S que dirige originalmente la expresión del gen reportero. Las barras coloridas representan la ubicación de los elementos de respuesta con actividad relevante durante la embriogénesis, reportados previamente en la literatura.

Los resultados se muestran en la figura 3.9. Con el fragmento completo de -1,620 pb (pCcSERK1::GUS-FL), que contiene todos los elementos de respuesta, se observó una ligera expresión del gen reportero *uidA* a partir de los 25 días en la formación de masa pre-embriogénica, así como en las venas central y secundarias de las hojas. A los 35 DDI, la

expresión del gen reportero se incrementó notablemente en las mismas estructuras, así como en las primeras estructuras embrionarias presentes (globulares), la expresión siguió manteniéndose a los 50 y 60 DDI en las diferentes estructuras embriogénicas (globular, corazón, torpedo y cotiledonar). Los resultados fueron similares con el fragmento del promotor putativo de -1,048 pb (pCcSERK1::GUS-1,048), a pesar de que este fragmento carece de los REs para los factores transcripcionales AGL15 y AGAMOUS y ARF. Además, carece de 13 de los 17 REs para el factor transcripcional LEC1 y dos de los REs de respuesta a auxinas (AuxRE).

Los resultados con el fragmento del promotor (eliminación de un fragmento) de CcSERK1 de -792 pb (pCcSERK1::GUS-792) fueron diferentes. No se detectó la expresión del gen reportero *uidA* observada previamente en las venas o en la masa pre-embriogénica de los explantes analizados a los 25 y 35 DDI. Sin embargo, a los 50 y 60 DDI se observó la expresión del gen reportero en las diferentes estructuras embrionarias, tanto en callo embriogénico como en embriones en desarrollo. Especialmente, se observó una fuerte expresión en estructuras globular y corazón, disminuyendo en torpedo y cotiledonar. Es importante observar que además de los REs ausentes en la región -1,048, en la región -792 están ausentes los REs para BBM y WUS.

Por otra parte, los resultados con el fragmento más pequeño del promotor de -618 pb se demostró que esta secuencia no es suficiente para inducir la expresión del gen *uidA* en ninguna estructura del desarrollo embrionario, en ninguno de los tiempos analizados (25, 35, 50 y 60 DDI) (Figura 3.9).

En la figura 3.9 también se muestran los resultados de los testigos positivo y negativo. La expresión del gen *uidA* bajo el promotor constitutivo 35S se observó en todas las estructuras del explante y en todas las etapas analizadas, mientras que en los explantes sin transformar no se observa tinción de GUS en ninguna etapa ni estructura.

Un análisis más detallado de la funcionalidad de las diferentes versiones del promotor putativo del gen *CcSERK1* durante el desarrollo de los embriones se muestra en la figura 3.10.



Figura 3.9 Análisis de funcionalidad de las eliminaciones en el promotor putativo del gen *CcSERK1* en la embriogénesis somática de *C. canephora*. A) Análisis de expresión del gen reportero *gus* en explantes transformados con las eliminaciones en el promotor de *CcSERK1* (-618, -792, -1,048, -1,620 pb) a los 25, 35, 50 y 60 días después de inducción al proceso de embriogénesis somática.

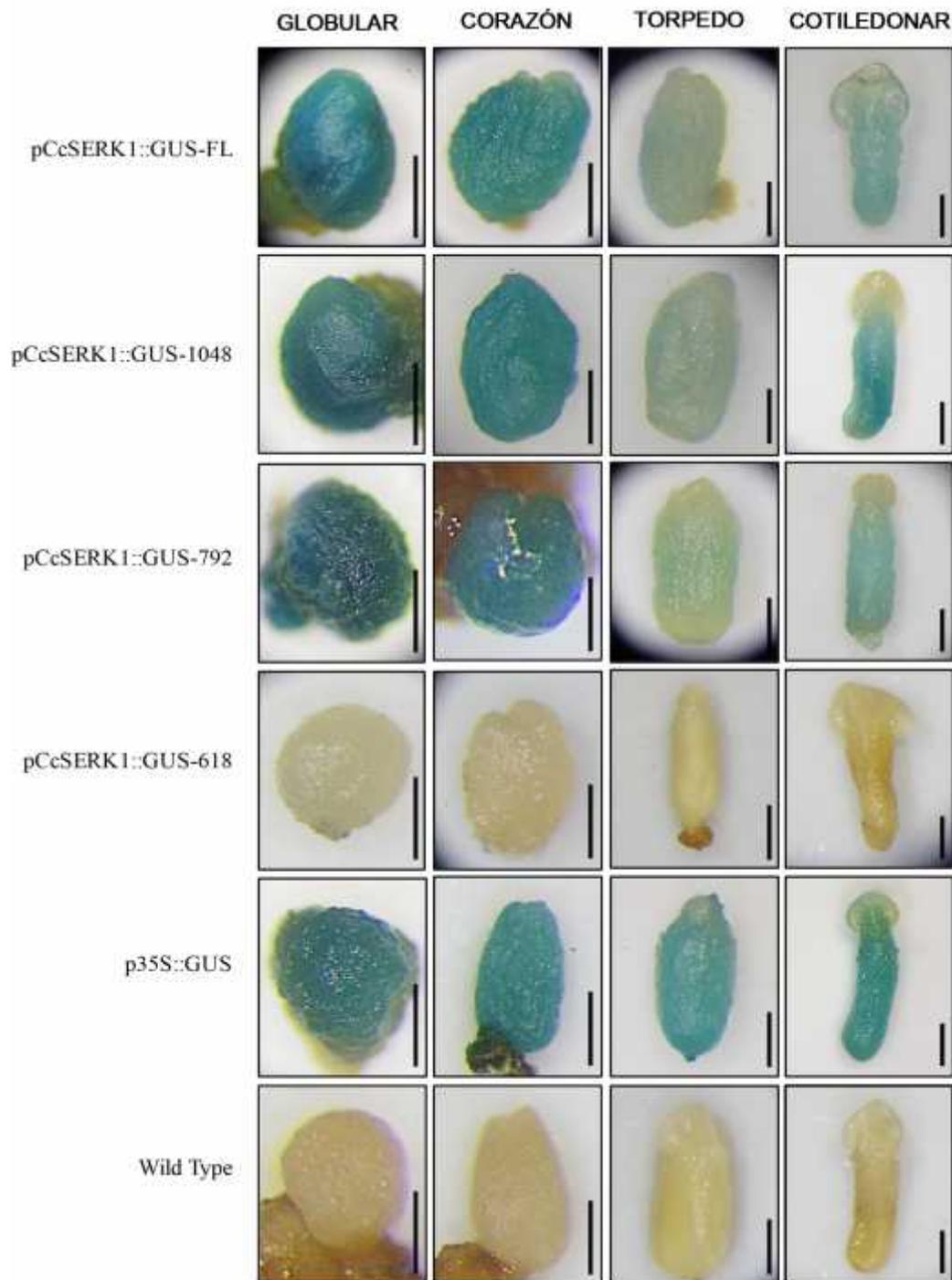


Figura 3.10 Análisis funcional de las eliminaciones en el promotor putativo del gen *CcSERK1*. Se muestra la tinción de GUS en diferentes etapas de desarrollo de embriones somáticos (globular, corazón, torpedo y cotiledonar) de *C. canephora*, transformados con las construcciones

pCcSERK1::GUS-FL, pCcSERK1::GUS-1048, pCcSERK1::GUS-792 y pCcSERK1::GUS-618, respectivamente. La tinción de GUS fue analizada en por lo menos tres experimentos y se muestran imágenes representativas. Cada barra representa 100 μm .

Como puede observarse, los niveles de expresión del gen reportero *gus* bajo el promotor de CcSERK1 observados en diferentes estadios de desarrollo del embrión somático coincide con los niveles de expresión cuantitativos de CcSERK1 en los diferentes estadios de desarrollo del embrión somático realizados por RT-PCR (Pérez Pascual *et al.*, 2018) habiendo una mayor expresión de *CcSERK1* en embrión en estadio globular y disminuyendo en etapas más tardías de desarrollo del embrión somático. Con estos resultados se confirmó indirectamente que el gen *CcSERK1* se expresa en etapas tempranas de desarrollo del embrión somático de *C. canephora*.

3.4 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este trabajo se realizó el análisis funcional de las eliminaciones del promotor putativo del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *C. canephora*, con el objetivo de determinar su tamaño funcional y el papel de las regiones promotoras en dicho proceso. Para tal análisis se realizaron las construcciones pCcSERK1::GUS-FL con las secuencias completa (-1,620 pb) y eliminadas (pCcSERK1::GUS-618, -792, -1,048 pb).

Los resultados obtenidos en explantes transformados con los fragmentos del promotor de -1,620 y -1,048 pb en callo embriogénico, en las diferentes estructuras embriogénicas globular, corazón, torpedo y cotiledonar, así como en las venas central y secundarias de las hojas, coinciden con estudios ya reportados donde han utilizado el promotor del gen *SERK1* para análisis de su expresión en tejidos específicos. En *A. thaliana*, se examinó de manera indirecta el patrón de expresión de *AtSERK1* bajo la dirección de un fragmento de DNA genómico de 2,0 kb, que incluyó la región 5'-UTR del ARN mensajero, fusionado al gen reportero *uidA*. La expresión de *AtSERK1::GUS* fue detectada durante el desarrollo post-embriogénico, en los haces vasculares de las hojas cotiledonar de las hojas primarias, de los hipocótilo y de las raíces. Este patrón de expresión vascular también se encontró en los haces vasculares de otros órganos de la planta madura, como las raíces, los tallos, las hojas, las raíces laterales, el pedicelo y los pétalos (Hecht *et al.*, 2001).

Nolan *et al.* (2009) analizaron indirectamente la expresión del gen *MtSERK1* durante las embriogénesis somática y cigótica de *M. truncatula*, fusionando una secuencia genómica de 1,5 kb (incluyendo la región 5'-UTR) al gen reportero *uidA*, encontrando que *MtSERK1* se expresa fuertemente en las primeras etapas de desarrollo de los embriones somático y cigótico, hasta los respectivos estadio corazón, disminuyendo la expresión en las siguientes etapas de desarrollo del embrión. En *A. thaliana*, *AtSERK1* se expresa en la megasporogenesis y en todas las células del saco embrionario hasta la fase de la fertilización, después se expresa en todas las células del embrión en desarrollo hasta el estadio de corazón (Hecht *et al.*, 2001). Estos datos coinciden con lo encontrado en nuestro trabajo, la tinción de GUS fue detectada en embriones somáticos en las diferentes etapas de desarrollo, habiendo una mayor actividad de GUS en embriones en estadio globular y corazón, disminuyendo la expresión en etapas más tardías de desarrollo del embrión

somático, torpedo y cotiledonar. En *Arabidopsis*, la expresión *AtSERK1* no se limita a las células embriogénicas, pero es característico de las células capaces de responder a las señales hormonales y células competentes capaces de formar embriones somáticos (Hecht *et al.*, 2001).

En raíces de *A. thaliana*, Du *et al.* (2012) analizaron la expresión de cuatro miembros de la familia *SERK* mediante su promotor fusionado al gen reportero *uidA* para analizar la expresión en tejidos específicos, encontrando que estos genes se expresan en las raíces, pero sus patrones de expresión son diferentes. *BAK1* (*SERK3*) se expresa de forma ubicua en las raíces y más abundantemente en los meristemos radiculares. *SERK1* exhibe un alto nivel de expresión principalmente en los tejidos vasculares de la raíz en plantas de seis días de edad, mientras que *SERK2* no se expresa en la punta de la raíz sólo en la zona de elongación. *BKK1* (*SERK4*) se expresa sólo en la zona de elongación y la zona cercana madura de las raíces. Por otra parte, triples mutantes de *BAK1*, *SERK1*, *BKK1* muestra un fenotipo extremadamente reducido (corto) de la raíz. El tamaño del meristemo de la raíz se reduce drásticamente, que es probablemente el resultado de defectos en la división celular en la triple mutante. Estos resultados sugieren que los genes *SERK* pueden controlar diferencialmente el desarrollo de las raíces (Du *et al.*, 2012).

Por otra parte, entre los diferentes REs de genes homeóticos encontrados en el promotor putativo del gen *CcSERK1*, tanto *AGL15* como *WOX13* parecen ser prescindibles para la expresión de *uidA* en las etapas de la ES de *C. canephora* analizadas. En otras especies, el gen *AGL15* parece jugar un papel importante durante la embriogénesis somática (Zheng *et al.*, 2013; Thakare *et al.*, 2008). En *A. thaliana*, se identificó a la proteína *AGL15* como un componente de un complejo de proteínas que incluye a *SERK1* (Karlova *et al.*, 2006). Además, un análisis de la secuencia de nucleótidos del promotor de *MtSERK1* reveló la existencia de un REs para *AGL15* (Nolan *et al.*, 2009); este resultado y el hecho de que tanto los homólogos de *SERK1* como *AGL15* se inducen después del tratamiento con auxinas, implica que los productos de ambos genes podrían tener una relación estrecha en la vía de transducción de señales de la embriogénesis (Zhu y Perry, 2005; Gazzarrini *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2003). Sin embargo, los datos de nuestro trabajo indican que, por la ubicación de los REs de *AGL15* (-1,613 pb) y de *WOX13* (-468 pb) en regiones que son prescindibles para la expresión temprana o tardía del gen reportero *uidA*, lo que sugiere

que no participan en el control de la expresión de *CcSERK1* durante el desarrollo de la embriogénesis somática de *C. canephora*.

Los REs de *BBM* (-963 pb) y de *WUS* (-931 pb) se encuentran dentro de la región comprendida entre -1,048 y -792 pb (ver Figura 3.8). Cuando se eliminó esta región, la actividad de *GUS* se eliminó de las venas central y de la masa pro-embriogénica en etapas de la embriogénesis previas a la transición somática-embriogénica, pero todavía estaba presente en las diferentes estructuras embriogénicas que se desarrollan en etapas tardías. Estos resultados indican que se requiere de *BBM* o *WUS* o ambos para la expresión temprana de *CcSERK1* durante la embriogénesis temprana, pero no son necesarios en etapas tardías cuando el proceso de embriogénesis se ha desencadenado y la diferenciación celular conduce a la formación de las diferentes estructuras del embrión. Informes en la literatura indican que cuando los homólogos de *BBM* o *WUS* se sobreexpresan ectópicamente, promueven el cambio de un destino vegetativo a embriogénico (Boutillier *et al.*, 2002; Zuo *et al.*, 2002), lo que implica que tienen una función crucial durante la diferenciación de células somáticas a embriogénicas.

Los REs para los factores transcripcionales *GATA*, *ARR1AT* y *ANT* están presentes en la región entre -792 y -618 pb (Figura 3.8: pCcSERK1::*GUS*-792 y pCcSERK1::*GUS*-618), una región que resultó ser requerida para la expresión del gen reportero *uidA* una vez que el desarrollo del embrión ha comenzado, pero no antes del inicio de la embriogénesis. *ANT* es un factor crítico que mantiene la competencia meristemática de las células durante la organogénesis (Krizek, 1999). Se ha propuesto que los sitios de unión del factor de transcripción en las regiones promotoras del gen *SERK1*, pero no los presentes en el gen *SERK2*, evolucionaron exclusivamente para su expresión espacial durante la ES (Pandey *et al.*, 2014); específicamente, los autores mencionan que el sitio de unión del factor de transcripción *ANT* en el promotor de *AtSERK1* es prominentemente más accesible que el del promotor de *AtSERK2*. Debido a que el sitio de unión *ANT* también está presente en la secuencia reguladora del gen *MtSERK1*, los autores postularon que los factores de transcripción *ANT* evolucionaron hacia un papel preciso en la adquisición de la ES a través de las especies. Sin embargo, los resultados del presente trabajo sugieren que el sitio de unión de *ANT* en el promotor del gen *CcSERK1* es necesario para la expresión de *CcSERK1* durante el desarrollo del embrión, pero no antes de la transición somática-

embriogénica.

Por otro lado, aunque el promotor del gen *CcSERK1* tiene múltiples REs para el factor LEC1, distribuidos a lo largo de la secuencia de nucleótidos, la mayoría de ellos (13 de 17 REs) se encuentran entre las regiones -1,620 y -1,048 pb (Figura 3.8: pCcSERK1::GUS-FL), una región que resultó ser prescindible para la inducción del gen *uidA* antes o después del inicio de la embriogénesis. Estos resultados sugieren que los REs LEC1 no tienen una influencia en la expresión de *CcSERK1* que se produce en etapas tempranas de la embriogénesis o que los cuatro REs LEC1 restantes (Figura 3.8: pCcSERK1::GUS-1,048) son suficientes para conducir la expresión de *CcSERK1*. Esta hipótesis está respaldada por el hecho de que la sobreexpresión de *CcSERK1* durante los primeros diez días de la embriogénesis somática en *C. canephora* reprimió a *CcLEC1* e indujo a *CcBBM* y a *CcWUS* (Pérez-Pascual *et al.*, 2018). Además, aunque la expresión ectópica de *AtLEC1* confiere características embrionarias a las plántulas y es suficiente para inducir el desarrollo de embriones somáticos a partir de células vegetativas (Lotan *et al.*, 1998). Se ha demostrado que *LEC1* se necesita en etapas tardías de la embriogénesis, para la adquisición de tolerancia a la desecación, la acumulación de reservas de almacenamiento (Peng and Weselake, 2011), la especificación de la identidad del cotiledón y para la finalización de la maduración del embrión (West *et al.*, 1994).

CAPÍTULO IV

EVALUACIÓN DE LA FUNCIONALIDAD FISIOLÓGICA DEL PROMOTOR DEL GEN SERK1 DE *Coffea canephora* L.

Los resultados presentados en este capítulo forman parte del artículo:

“Cloning of the *Coffea canephora* *SERK1* promoter and its molecular analysis during the cell-to-embryo transition”, por Doribet Jiménez-Guillen^a, Daniel Pérez-Pascual^a, Ramón Souza-Perera^a, Gregorio Godoy-Hernández^a, José Juan Zúñiga-Aguilar^{b*}.

^aUnidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., Calle 43 No. 130, Chuburná de Hidalgo, Mérida 97200, Yucatán, México. ^bInstituto Tecnológico Superior de los Ríos, Km 3 carretera Balancán-Villahermosa, Tabasco 86930, México.

* Autor de correspondencia.

Este artículo ha sido aceptado para su publicación en la revista Electronic Journal of Biotechnology (SCOPUS SciteScore: 2.19; JCR impact factor 2017: 1.881).

4.1 INTRODUCCIÓN

Se ha demostrado que existen varios factores que influyen de forma positiva en la inducción de la ES, entre los que se encuentran la adición de RCV. Las auxinas y las citocininas (solas o en combinación) son los principales reguladores del crecimiento involucrados en la regulación de la división y diferenciación celular. La influencia de las auxinas aplicadas exógenamente en la inducción de la ES está bien documentada, sobre todo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Dudits *et al.*, 1991; Yeung, 1995). Mediante análisis de expresión diferencial se han identificado genes que responden a RCV (Ikeda *et al.*, 2006).

Por ejemplo, el efecto de las auxinas sobre la expresión del gen *SERK1* ha sido demostrado previamente. En *A. thaliana* se encontró que la expresión del gen *AtSERK1* aumenta en el lado adaxial de los cotiledones, en el meristemo apical y en el tejido vascular de las plántulas como respuesta a la adición de auxina (Hecht *et al.*, 2001). En las raíces, el

tratamiento con 2,4-D dio como resultado un aumento en la transcripción de *AtSERK1* y en los niveles de su proteína solo en los haces vasculares de la raíz. En ese mismo estudio, la aplicación prolongada de 2,4-D en hipocótilos dio lugar a proliferación desorganizada extensa de células que expresan *AtSERK1* procedentes del procámbium (Kwaaitaal and de Vries, 2007). En cultivos celulares de *D. carota* producidos a partir de explantes de hipocótilo, las células agrandadas procedentes del tejido provascular expresan al gen *DcSERK1* y son las que adquieren la competencia embriogénica (Schmidt *et al.*, 1997). En *M. truncatula*, *MtSERK1* es inducido por la adición de 2,4-D tanto en líneas embriogénicas como no embriogénicas (Nolan *et al.*, 2003). Estos resultados parecen indicar que la expresión del gen *SERK1* marca las células madre pluripotentes en los haces vasculares, células que después del tratamiento con las moléculas adecuadas tales como auxinas son capaces de adquirir totipotencia y son capaces de iniciar la embriogénesis somática (Kwaaitaal y de Vries, 2007). De acuerdo con los antecedentes, la señalización mediada por la proteína *SERK1* es parte de varios procesos de desarrollo.

En la secuencia del promotor del gen *CcSERK1* clonado en este trabajo, se identificaron diferentes elementos de respuesta a RCV como giberelinas, citocininas, ácido abscísico, así como elementos responsivos auxina (AUXRE), los cuales podrían regular la expresión de *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *C. canephora*, así como en otros procesos de diferenciación celular de la planta. En particular, las auxinas son esenciales en nuestro modelo de estudio para que se inicie la embriogénesis somática en *C. canephora*. Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue demostrar la funcionalidad fisiológica del promotor putativo clonado, mediante la evaluación de su inducibilidad como respuesta a la adición de auxinas.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material biológico

Como material biológico se utilizaron plántulas de *Nicotiana benthamiana* de seis semanas de edad cultivadas *in vitro* en medio MS suplementado con 100 mg·L⁻¹ mio-inositol, 2 mg·L⁻¹ glicina, vitaminas (0.5 mg·L⁻¹ ácido nicotínico, 0.5 mg·L⁻¹ piridoxina, 0.1 mg·L⁻¹ tiamina-HCl), 3 % sacarosa, 0.2 % (w/v) Gelrite, pH 5.7.

4.2.2 Análisis de la actividad del promotor putativo del gen *CcSERK1* como respuesta a la adición exógena de auxinas.

Con el análisis bioinformático de la secuencia del promotor del gen *CcSERK1*, se identificaron cajas de respuestas a RCV. En el presente estudio se evaluó la funcionalidad de los elementos de respuesta a auxinas sobre los niveles de expresión de *CcSERK1*, ya que en diferentes modelos se ha demostrado el papel de las auxinas en el establecimiento de la embriogénesis somática, así como para inducir el proceso de embriogénesis somática de *C. canephora*.

Para evaluar el efecto de las auxinas sobre la activación del promotor putativo aislado en el presente trabajo, se investigó si la adición exógena de auxinas puede conducir a la inducción del gen reportero *uidA* que está bajo la regulación del promotor putativo del gen *CcSERK1*, como se ha reportado para los genes *SERK1* de otras especies. Además, se evaluó si la expresión del gen reportero depende de la presencia de los elementos AUXRE del promotor putativo. Para estos análisis se transformaron explantes de hojas y de tallos de *N. benthamiana* con las construcciones pCcSERK1::GUS que contienen al promotor nativo y al promotor mutado en los cuatro AuxRE (AUXRETGA1GMGH3) (Liu *et al.*, 1997). Los explantes de *N. benthamiana*, empleados como sistemas de validación heteróloga fueron transformados mediante infiltración al vacío con *A. tumefaciens*, empleando una modificación al protocolo reportado por Canche Moo *et al.*, (2006). El efecto de la adición exógena de auxinas sobre la actividad del promotor de *CcSERK1* (nativo y mutado en los elementos responsivos auxina) se evaluó adicionando diferentes concentraciones (0.1 y

0.54 μM , cada una) de las auxinas ácido 1-naftalenacético [NAA (Sigma)] y ácido 2,4-diclorofenoxiacético [2,4-D (Sigma)] a los explantes transformados, y midiendo la tinción de GUS en diferentes tiempos (0, 12, 24 y 26 h) después de la adición de auxinas. Las mutaciones se realizaron mediante sustitución de bases, los elementos mutados fueron cuatro (TGACT→TaAaT, TGAAG→TaAAaT, TGACT→TaAaT, TGAGG→TaAaG) (Figura 4.1B). El diseño de las mutaciones se realizó *in silico* y la secuencia completa con las cuatro mutaciones fue sintetizada químicamente (<https://www.genscript.com/>).

4.2.2.1 Transformación de *E. coli* por choque térmico con el plásmido pUC57::promotor CcSERK1-aux(-) (promotor mutado)

La secuencia sintetizada del promotor mutado [CcSERK1-aux(-)], clonado en el vector pUC57, se re-suspendió en 20 μL de H_2O , se cuantificó y con una alícuota correspondiente a 50 ng de pDNA se transformó la cepa DH5 de *E. coli* para la generación del plásmido pUC57::promotor CcSERK1-aux(-). La transformación se realizó como se describió en la metodología del Capítulo II. Posteriormente se realizó el aislamiento de DNA plasmídico [pUC57::promotor CcSERK1-aux(-)] a partir de un cultivo de bacterias transformadas, de acuerdo con la metodología de lisis alcalina descrita en el anexo I.V. Se corroboró la identidad de los plásmidos mediante la liberación de inserto con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*. La reacción de restricción se realizó de la siguiente manera:

Cuadro 4.1 Reacción de restricción

Componentes	Volumen (μL)
pDNA 1.0 μg	6.4
Enzimas de restricción <i>KpnI/NcoI</i> (10 U/ μL)	1.0
Amortiguador de enzima de restricción (10X)	2.0
H_2O desionizada	10.6

Volumen final 20.0

La reacción se incubó a 37°C por 1 h. y se inactivó a 65 °C por 15 min.

4.2.2.2 Purificación del promotor CcSERK1-aux(-) a partir del gel de agarosa

Mediante digestión enzimática se liberó el promotor mutado (-2,072 pb incluyendo la región UTR-452 pb) del vector pUC57, el fragmento del promotor CcSERK1-aux(-) fue purificado a partir del gel de agarosa utilizando la metodología del Nucleo Spin Gel and PCR Clean-Up (Clontech), descrito en el anexo I.IV.

4.2.2.3 Sub-clonación del promotor CcSERK1-aux(-) en el vector pCAMBIA1301

Se eliminó el promotor 35S del vector pCAMBIA1301 con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*, la reacción de restricción se realizó como se describió en la metodología del capítulo III. Posteriormente, se realizó la sub-clonación del promotor CcSERK1-aux(-) en el vector de expresión pCAMBIA1301 para generar la construcción pCcSERK1::GUS-aux(-), la reacción de ligación es la siguiente:

Cuadro 4.2 Reacción de ligación

Componentes	Reacción (μL)
2x Amortiguador de ligación	5.0
Vector pCAMBIA1301 (50 ng).	1.0
Inserto DNA (3:1)	3.0
T4 DNA ligasa (3U)	1.0
H ₂ O	-----
Volumen final	10.0

- Se incubó a temperatura ambiente por 1 h.
- Posteriormente, se realizó la transformación de células competentes de *E. coli* por choque térmico como se describió anteriormente.

- Se realizó la extracción de pDNA mediante lisis alcalina, descrito en el anexo I.V.
- El análisis de identidad de las construcciones pCcSERK1::GUS-aux(-) se realizó mediante:
 - La liberación de insertos con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*
 - Mediante amplificación del inserto por PCR.

Con ambas técnicas, el tamaño del inserto o amplicón se utilizó para corroborar la clonación exitosa.

4.2.2.4 Transformación de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con las construcciones pCcSERK1::GUS-FL y pCcSERK1::GUS-aux(-).

Se transformó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con las construcciones pCcSERK1::GUS-FL y pCcSERK1::GUS-aux(-) por el método de congelación-descongelación (Jyothishwaran, *et al.*, 2007), como se describió en el capítulo III de este trabajo. La identidad de las colonias de *A. tumefaciens* obtenidas de la transformación se realizó mediante la amplificación del promotor mutado por PCR. La reacción de amplificación se realizó de la siguiente manera:

Cuadro 4.3 Reacción de amplificación

Componentes	Reacción (μL)
10 x PCR (Mg ²⁺)	1.0
MgCl ₂ (50mM)	0.3
Mezcla dNTP's (10mM)	0.2
Cebador-dir. <i>KpnI</i>	0.3
Cebador-rev. <i>NcoI</i>	0.3
Taq polimerasa	0.2
gDNA (200 ng)	0.4
H ₂ O	7.3
Volumen final	10.0

4.2.2.5 Transformación genética de explantes de *N. benthamiana* con el promotor putativo nativo (pCcSERK1::GUS-FL) o mutado [pCcSERK1::GUS-aux(-)].

Se transformaron explantes de hojas y tallos de plántulas de *N. benthamiana* de 6 semanas de edad mediante co-cultivo con *A. tumefaciens*, con las construcciones génicas pCcSERK1::GUS (promotor nativo), pCcSERK1::GUS-aux(-) (promotor mutado) y p35S::GUS (promotor constitutivo como testigo positivo de la transformación) por el método de infiltración al vacío. Los explantes de hojas y tallos fueron transferidos al cultivo bacteriano de *A. tumefaciens* (D.O. 0.6) transformadas con las diferentes construcciones génicas. Posteriormente, los explantes fueron sometidos a infiltración al vacío (300 mm de Hg) durante 5 minutos. Después de la agroinfiltración, los explantes fueron colocados en cajas petri con papel filtro estéril y se dejaron en co-cultivo a 25 °C por 72 h en oscuridad.

4.2.10 Efecto de la adición de auxinas exógenas sobre la actividad del promotor putativo del gen *CcSERK1*.

Después de tres días de co-cultivo, los explantes de *N. benthamiana* transformados con las diferentes construcciones fueron colocados en medio líquido Murashige and Skoog (MS) en presencia de NAA (0.1 o 0.54 μ M) o de 2,4-D (0.1 o 0.54 μ M) e incubados en oscuridad a 25 °C por diferentes períodos (0, 12, 24 y 36 h). Al finalizar cada período se realizó la tinción histoquímica de GUS a los explantes sometidos a los diferentes tratamientos.

4.2.2.7 Análisis histoquímico de GUS

Para la detección histoquímica de GUS, el tejido transformado se colocó en la solución de tinción X-Gluc (NaH₂PO₄ 200 mM, Na₂EDTA 10 mM, K₄Fe(CN)₆·3H₂O 0.5 mM, K₃Fe(CN)₆ 0.5 mM, Triton X-100 0.2%, pH 7.0). A esta solución se le adicionó metanol (20% v/v) para eliminar cualquier evento endógeno o expresión de interferencia del gen *uidA* no integrado (Leroy *et al.*, 2007), protegiendo las muestras de la luz, ya que la solución es fotosensible. Se incubó toda la noche a 37 °C. Posteriormente se removió la solución de tinción X-Gluc y se eliminó la clorofila del explante mediante lavados sucesivos con una mezcla de

metanol:acetona (3:1, v:v) hasta que no se detectara el color verde en el tejido y en la solución. Para su conservación, el explante se embebió en glicerol al 80%.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Efecto de la auxina exógena sobre la actividad del promotor putativo del gen *CcSERK1*

En este estudio se evaluó el efecto de la auxina exógena sobre los niveles de expresión del promotor putativo del gen *CcSERK1* fusionado al gen reportero GUS (-glucuronidasa). Para este análisis se mutaron los cuatro elementos de respuesta a auxinas (AuxRE) identificados en la secuencia del fragmento de DNA genómico de -1,620 pb. Estos elementos fueron mutados por sustitución de dos bases en cada REs AUXRE (Figura 4.1B). Además, a la secuencia genómica se le diseñaron sitios de corte para las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI* para sub-clonarlo en el vector de expresión pCAMBIA1301.

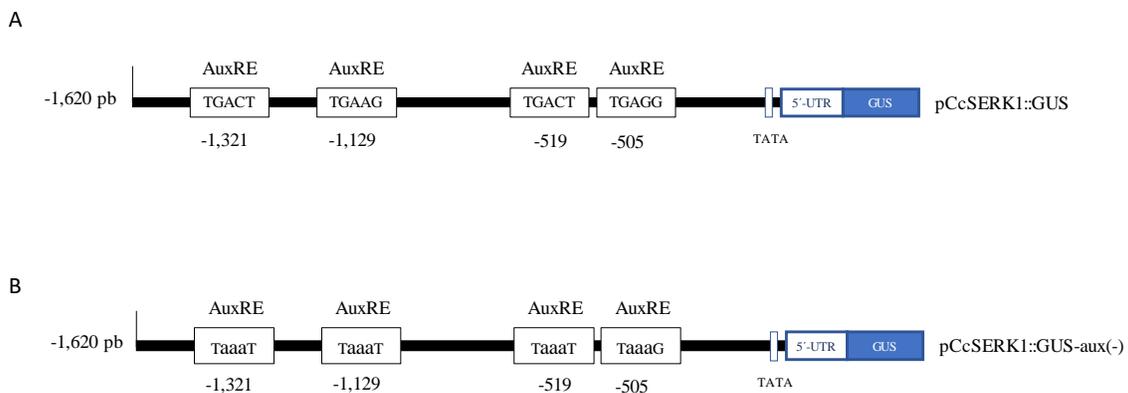


Figura 4.1 Diseño esquemático de las mutaciones en los elementos responsivos a auxina en el promotor de *CcSERK1*. A) Se muestra la secuencia nativa de los elementos responsivos a auxinas AuxRE; B) Se muestra la secuencia de los AuxRE mutados. Los números bajo las cajas AuxRE representan la posición con respecto al origen de la transcripción.

Una vez realizado el diseño *in silico* de las mutaciones en la secuencia genómica, ésta fue sintetizada químicamente por la empresa GenScript (<https://www.genscript.com/>). La secuencia fue denominada promotor *CcSERK1*-aux(-) y se entregó clonada en el vector de clonación pUC57 (Figura 4.2A). El plásmido conteniendo la secuencia genómica mutada,

denominado pUC57::promotor CcSERK1-aux(-), fue enviado como gota en una hoja de papel.

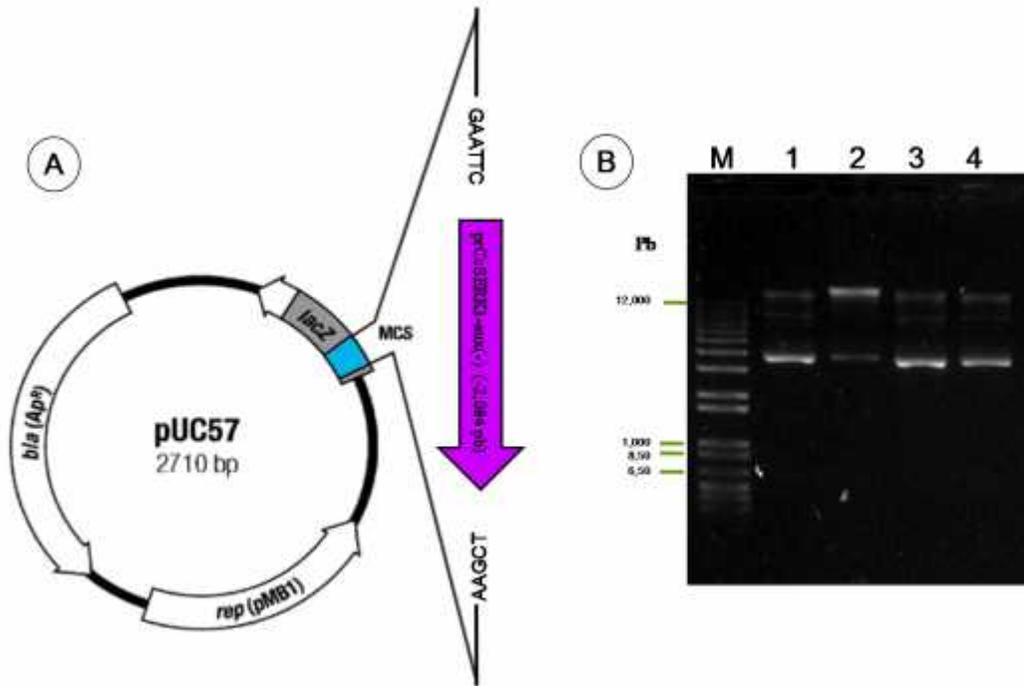


Figura 4.2 DNA plasmídico pUC57::promotor CcSERK1-aux(-). A) Mapa del vector pUC57 con el inserto de interés promotor CcSERK1-aux(-), clonado con los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*. B) una alícuota de 5.0 μL DNA plasmídico pUC57::promotor CcSERK1-aux(-) aislado de colonias transformadas fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio; Carriles 1-4: pDNA de diferentes colonias; M: Escalera de DNA de 1 kb.

4.3.1.1 Transformación de *E. coli* con el plásmido pUC57::promotor CcSERK1-aux(-)

Se realizó la transformación de la cepa DH5 de *E. coli* con el plásmido pUC57::promotor CcSERK1-aux(-) por choque térmico (como se describe en el capítulo II). Con la finalidad de tener una mayor cantidad de DNA plasmídico para la sub-clonación de la secuencia genómica mutada al vector binario pCAMBIA1301. Posteriormente, se realizó la extracción

de pDNA pUC57::promotor CcSERK1-aux(-) a partir de cultivos bacteriano transformados (Figura 4.2B). La identidad de los plásmidos se realizó mediante digestión enzimática y detección del patrón de digestión esperado. Los plásmidos extraídos se linearizaron con la enzima *KpnI* del cual se esperaba un tamaño de 4,794 pb (la suma del tamaño del vector y del inserto). En la figura 4.3 (carriles 2, 4, 6 y 8) se muestran los resultados, obteniendo el plásmido linearizado del tamaño esperado. Se corroboró la identidad de los plásmidos mediante la liberación del inserto de 2,084 pb con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*. En la figura 4.3 (carriles 3, 5, 7 y 9) se muestran los resultados de la digestión de los cuatro plásmidos extraídos de diferentes colonias.

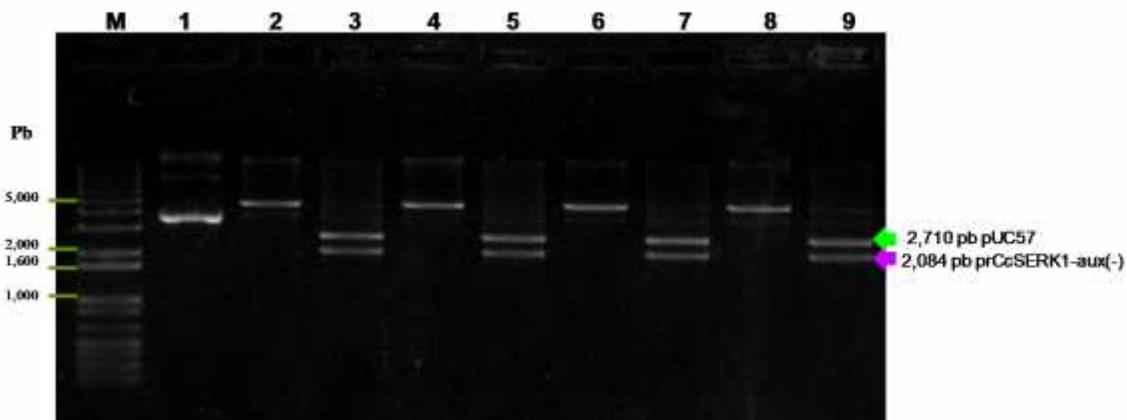


Figura 4.3 Digestión de pDNA del promotor CcSERK1-aux(-) con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI*. Una alícuota de 5.0 μ L del producto de la digestión fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 μ g·mL⁻¹ de bromuro de etidio. Carril 1: Plásmido del promotor CcSERK1-aux(-) sin digerir; Carril 2, 4, 6, 8: Plásmidos linearizados con la enzima de restricción *KpnI*; Carril 3, 5, 7, y 9: Doble digestión, plásmidos digeridos con *KpnI* y *NcoI*. M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

Se obtuvo la liberación del fragmento de interés de -2,084 pb que es el tamaño que se esperaba en los cuatro plásmidos analizados. Con estos resultados se confirmó que los plásmidos obtenidos contienen el promotor putativo del gen *CcSERK1* mutado en los elementos responsivos a auxina.

Posteriormente, se realizó la purificación del fragmento generado [promotor CcSERK1-aux(-)] a partir del gel de agarosa, utilizando el NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit descrito en el anexo I.IV.

4.3.1.2 Construcción del vector binario pCcSERK1::GUS-aux(-)

Se realizó la eliminación del promotor 35S que dirige la expresión del gen reportero *uidA* en el vector pCAMBIA1301, para subclonar posteriormente el fragmento del promotor mutado de CcSERK1-aux(-). Se realizaron tres reacciones de restricción independientes para tener una mayor cantidad de pDNA (Figura 4.4, carriles 3-5), debido a que estos fragmentos serían purificados y al momento de hacer la purificación los rendimientos de pDNA son bajos. La liberación del promotor 35S se realizó con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI* (Figura 4.4), se obtuvo el fragmento liberado del promotor 35S del tamaño esperado (762 pb). Posteriormente, se realizó la purificación del vector pCAMBIA1301 (sin 35S) a partir del gel de agarosa mediante el procedimiento descrito anteriormente.

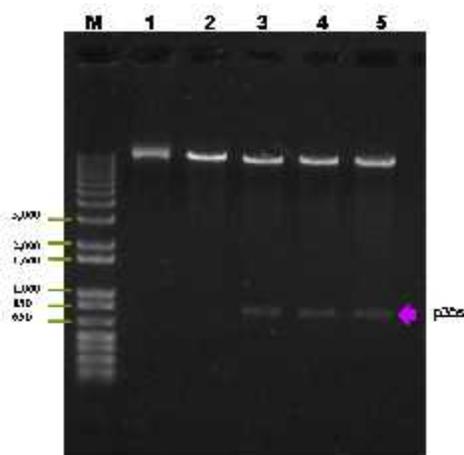


Figura 4.4 Eliminación del promotor 35S del vector pCAMBIA1301. Una alícuota de 5.0 μL del producto de la digestión fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1: pCAMBIA1301 sin digerir; Carril 2: pCAMBIA1301 digerido con *KpnI*; Carril 3,4, 5: Doble digestión de pCAMBIA1301 con *KpnI* y *NcoI*. M: Escalera de peso

molecular de 1 kb.

4.3.1.3 Sub-clonación del promotor CcSERK1-aux(-) en el vector pCAMBIA1301

La sub-clonación de promotor CcSERK1-aux(-) hacia el vector de expresión pCAMBIA1301 se realizó mediante ligación de vector e inserto (1:3) con extremos cohesivos *KpnI/NcoI*, generando el plásmido denominado pCcSERK1::GUS-aux(-). Posteriormente, se transformó la cepa DH5 α de *E. coli* con pCcSERK1::GUS-aux(-) y se corroboró la identidad de tres pDNA (de diferentes colonias) mediante la liberación del inserto con las enzimas de restricción *KpnI* y *NcoI* (Figura 4.5B). Como resultados, se obtuvo la liberación del inserto del tamaño esperado de -2,084 pb en dos plásmidos (carriles 2 y 6).

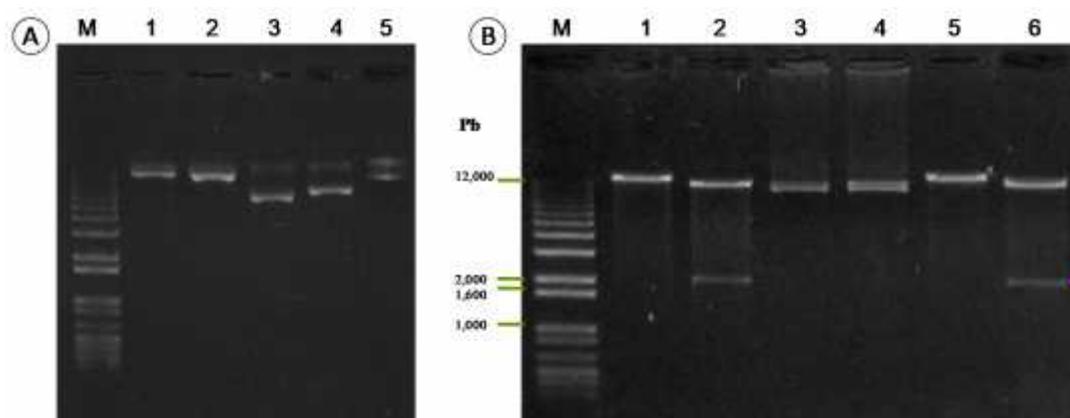


Figura 4.5 Digestión del plásmido pCcSERK1::GUS-aux(-). Una alícuota de 5.0 μ L del producto de la digestión fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 μ g·mL⁻¹ de bromuro de etidio. A) pDNA pCcSERK1::GUS-aux(-). B) Digestión enzimática de pDNA pCcSERK1::GUS-aux(-); Carril 1, 3, 5: pDNA linearizado con *KpnI*; Carril 2, 4, 6: Doble digestión de pDNA con *KpnI* y *NcoI*. M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

4.3.1.4 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pCcSERK1::GUS-aux(-)

Se transformó la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con el plásmido pCcSERK1::GUS-aux(-)

). La identificación de colonias recombinantes se realizó mediante la amplificación de la secuencia mutada por PCR. En la figura 4.6 se muestra el resultado de la amplificación de un fragmento del tamaño esperado del promotor mutado que es de -2,072 pb, a partir de 10 colonias analizadas.

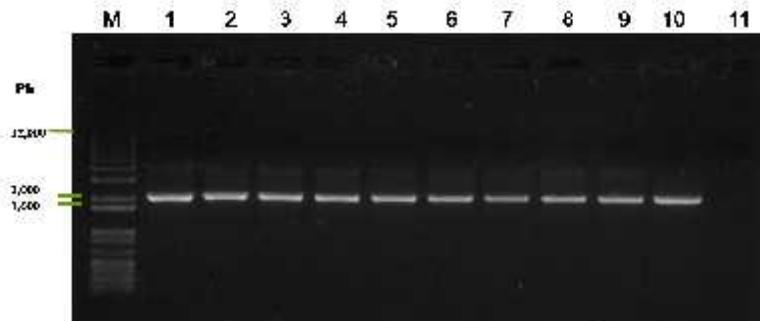


Figura 4.6 Identificación de colonias recombinantes transformadas con el plásmido pCcSERK1::GUS-aux(-). Una alícuota de 5.0 μL de los productos de PCR a partir de colonias de transformadas de *A. tumefaciens* fueron fragmentadas por electroforesis en un gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1-10: Amplificación del promotor CcSERK1-aux(-) a partir de diferentes colonias; Carril 11: Testigo negativo. M: Escalera de peso molecular de 1 kb.

4.3.1.5 Efecto de la auxina exógena sobre la actividad del promotor de CcSERK1

El efecto de la adición exógena de las auxinas NAA y 2,4-D sobre la actividad del promotor de CcSERK1 fue analizado mediante la expresión del gen reportero *uidA* en explantes de hojas y tallos de *N. benthamiana* transformados con las secuencias nativa o mutada del promotor putativo del gen *CcSERK1*, como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados con el pCcSERK1::GUS se muestran en la figura 4.7.

Como puede observarse, la adición exógena de NAA a una concentración de 0.1 μM indujo la expresión del gen reportero *uidA* a partir de las 24 h, habiendo una mayor expresión del gen reportero a las 36 h; Sin embargo, cuando esta auxina se adicionó en un concentración de 0.54 μM , la expresión del gen reportero *uidA* fue observada a partir de las 12 h, habiendo

una mayor expresión a las 36 h (Figura 4.7A) observándose la expresión del gen reportero en todo el explante de la hoja.

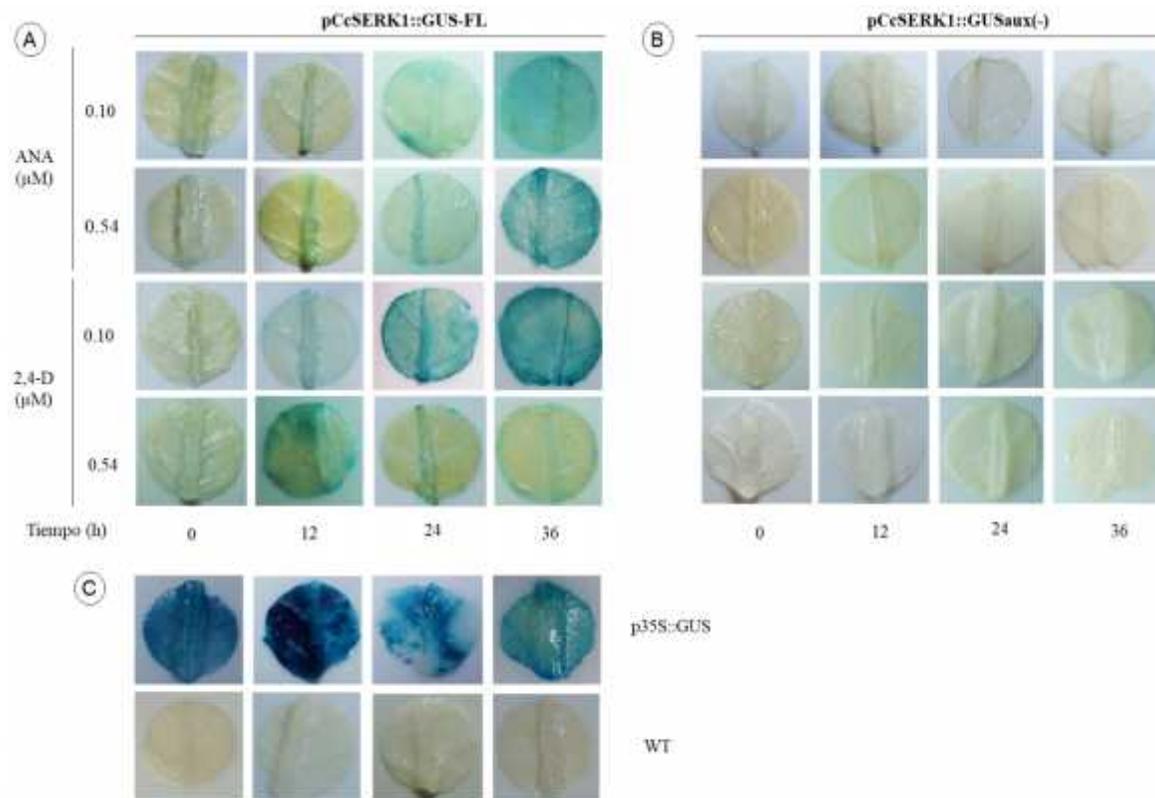


Figura 4.7 Análisis del efecto de auxinas exógenas sobre la actividad del promotor de CcSERK1. Se muestra la tinción de GUS en discos foliares de *N. benthamiana* transformados con pCcSERK1::GUS-FL o pCcSERK1::GUS-aux(-). Se observa el efecto de la exposición a diferentes tiempos (0, 12, 24 y 36 h) y a dos concentraciones de NAA y 2,4-D (0.1 y 0.54 M) sobre la actividad del promotor de CcSERK1 nativo (A) o mutado (B). Como testigo negativo se expusieron discos foliares sin transformar (WT) y como testigo positivo se utilizó el promotor constitutivo 35S (C).

En cuanto a los resultados con la adición de la auxina 2,4-D, con la concentración de 0.1 μM se observó la expresión del gen reportero *uidA* a partir de las 12 h, encontrándose una mayor expresión a las 36 h. La expresión de *uidA* fue observada en todo el disco de la hoja (Figura 4.7A). Con la concentración de 0.54 μM se observó una mayor expresión de *uidA* a las 12 h en toda la hoja (Figura 4.7A), pero después de este tiempo la expresión del

reportero disminuyó. Con la concentración de 0.54 μM de 2,4-D también se detectó la expresión del gen reportero en las primeras horas analizadas, pero mucho menor comparada con la concentración de 0.1 μM .

Como puede observarse, el 2,4-D a una concentración de 0.1 μM tuvo un mejor efecto, ya que la expresión del gen reportero se vio más fuerte a las 36 h comparada con NAA a 0.54 μM que fue con la que se observó una mayor expresión del gen reportero *uidA*.

Este mismo análisis de expresión se realizó con el promotor mutado en las secuencias AuxRE [pCcSERK1::GUS-aux(-)], tanto en presencia como en ausencia de los reguladores de crecimiento auxina (NAA y 2,4-D), utilizando las mismas concentraciones y condiciones evaluadas con el promotor nativo (pCcSERK1::GUS-FL). Como resultado de este análisis, no se detectó expresión del gen reportero *uidA* en ninguno de los explantes analizados con los dos reguladores de auxina en los diferentes tiempos (Figura 4.7B).

Estos mismos resultados fueron observados en tallo como se puede observar en la figura 4.8A (promotor nativo) y en la figura 4.8B (promotor mutado).

Con base en estos resultados, puede afirmarse que las auxinas regularon positivamente la actividad del promotor putativo del gen *CcSERK1* dirigiendo la expresión de un gen reportero en un sistema heterólogo. Con ello puede afirmarse que la secuencia genómica aislada es funcional fisiológicamente y que se comporta como el promotor del gen *SERK1* de otras especies.

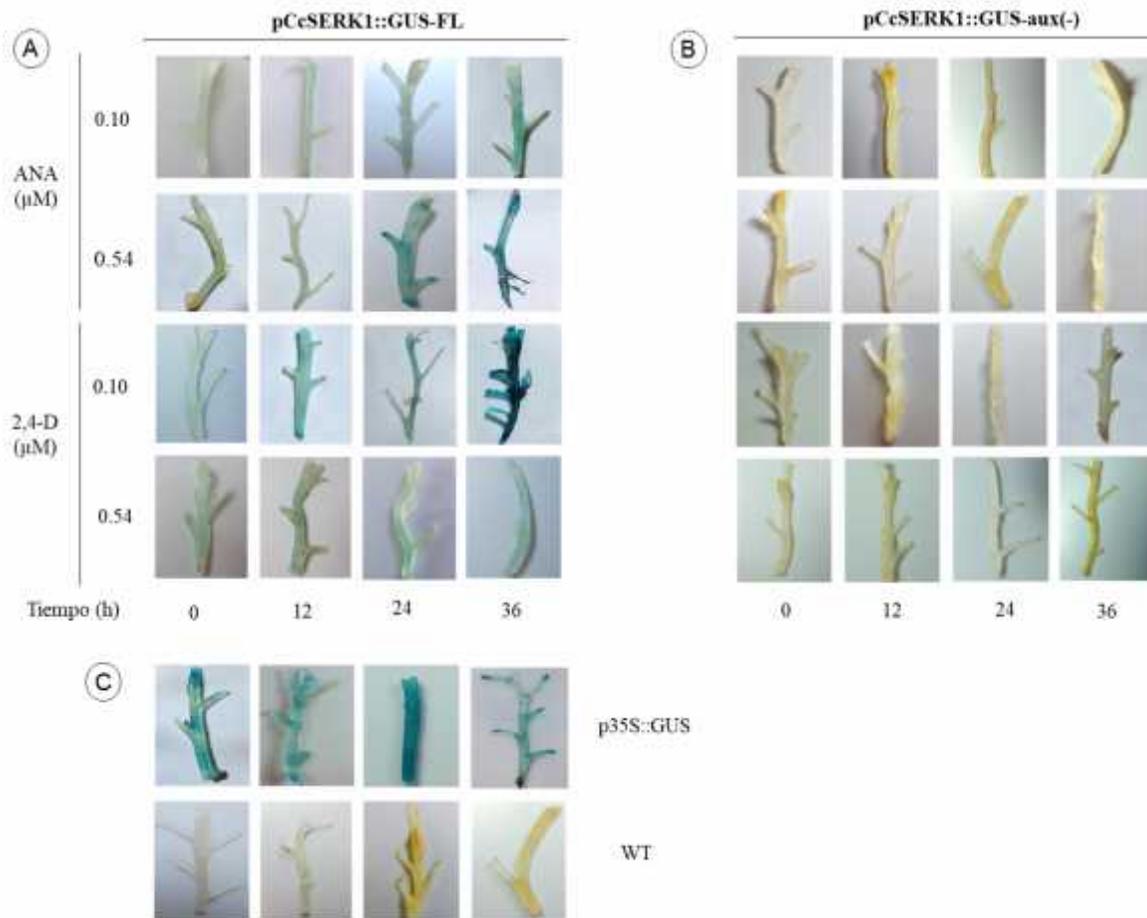


Figura 4.8 Análisis del efecto de auxinas exógenas sobre la actividad del promotor de CcSERK1. Se muestra la tinción de GUS en tallos de *N. benthamiana* transformados con pCcSERK1::GUS-FL o pCcSERK1::GUS-aux(-). Se observa el efecto de la exposición a diferentes tiempos (0, 12, 24 y 36 h) y a dos concentraciones de NAA y 2,4-D (0.1 y 0.54 M) sobre la actividad del promotor de CcSERK1 nativo (A) o mutado (B). Como testigo negativo se expusieron tallos sin transformar (WT) y como testigo positivo se utilizó el promotor constitutivo 35S (C).

4.4 DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

En este estudio se evaluó el efecto de adición exógena de las auxinas NAA y 2,4-D sobre la actividad del promotor putativo del gen *CcSERK1*.

Las auxinas juegan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Las auxinas controlan muchos aspectos de la morfología de las plantas y la fisiología (Steffen y Theologis, 1996; Steffen *et al.*, 1995). Por otra parte, las auxinas controlan la expresión génica (Guilfoyle y Key, 1986; Theologis, 1986).

Los cultivos embriogénicos somáticos son por lo general iniciados por la adición externa de RCV. En el modelo de embriogénesis somática de *C. canephora*, la competencia embriogénica se logra en las plantas mediante un pre-acondicionamiento de 14 días en un medio suplementado con ANA y KIN. Sin embargo, la posterior diferenciación embriogénica se induce mediante la adición de BA al medio de cultivo. En este modelo no se producen embriones en ausencia del pre-tratamiento con auxinas ni la inducción con citocininas.

En el trabajo del presente capítulo se aisló una secuencia genómica localizada corriente arriba del gen *CcSERK1* y se demostró que es activada fisiológicamente por la adición de auxinas. La ligación de la secuencia genómica nativa al gen reportero *uidA* y la transformación genética de explantes heterólogos condujo a la inducción de la tinción de GUS, cuando esos explantes transformados fueron expuestos a diferentes concentraciones de ANA o 2,4-D, en una manera dependiente del tiempo y de la dosis; sin embargo, la exposición a las mismas auxinas no generó tinción de GUS en los explantes de *N. benthamiana* que fueron transformados con la secuencia genómica mutada en los cuatro AuxRE (Han *et al.*, 2012; Ulmasov *et al.*, 1997).

En este sistema de expresión heterólogo se detectó una tinción basal de GUS en el tiempo cero de la adición de auxina en los explantes transformados con la secuencia genómica nativa, pero no se detectó actividad de GUS cuando se usó la secuencia mutada. Por lo tanto, la actividad basal de GUS que se observó en el tiempo cero puede ser producida por la presencia de las auxinas endógenas del explante.

El efecto positivo de las citocininas y las auxinas sobre la expresión del gen *SERK1* durante

el desarrollo de las plantas se han demostrado en otras especies (Kwaaitaal y de Vries 2009). Nolan y col. (2003) encontraron que la adición externa de ANA aumentó la expresión de *MtSERK1*, pero la adición de BA sola no tuvo ningún efecto; no obstante, la adición simultánea de ANA y BA provocó un incremento de dos veces de la expresión de *MtSERK1*, en comparación con la aplicación de auxina sola. En *Cattleya maxima* (Lindl.), la adición de thidiazuron (TDZ, un compuesto con efectos tipo citocinina) aumentó la expresión de *CmSERK1* en la punta y la herida de las hojas desprendidas, pero la adición de NAA solo indujo a *CmSERK1* en el sitio de la herida foliar (Cueva-Agila *et al.*, 2016). En *Citrus sinensis* (naranja dulce var. Valencia), el gen *CitSERK1* es inducido por NAA y 2,4-D durante las primeras etapas del desarrollo del callo embriogénico; a partir de entonces, la expresión de *CitSERK1* disminuyó, lo que sugiere que su expresión es desencadenada por auxinas y disminuye más tarde cuando los callos se vuelven insensibles a las auxinas (Ge *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, el tratamiento de la raíz con 2,4-D mejoró la transcripción del gen *AtSERK1* y también produjo un incremento moderado en la proteína SERK1 solo en los haces vasculares. En los hipocótilos, la adición de 2,4-D produjo un incremento en el tamaño celular y en la proliferación del periciclo parenquimatoso (Kwaaitaal *et al.*, 2007). En *Triticum aestivum*, la adición de 2,4-D a explantes de hojas indujo la embriogénesis somática y también incrementa los niveles de transcripción del gen *TaSERK1*. Los autores propusieron que la inducción de la embriogénesis somática por la adición de 2,4-D en el trigo está mediada por la vía SERK1 (Singla *et al.*, 2008).

En este estudio se demostró que los REs a auxina juega un papel importante en la actividad del promotor del gen *CcSERK1*, estos son unos de los elementos en *cis* que pudieran estar regulando la expresión de *CcSERK1* en el proceso de embriogénesis somática de *C. canephora*. Por otra parte, el promotor clonado y validado funcionalmente en este estudio sería un candidato ideal para la ingeniería genética y la búsqueda de elementos responsables de la regulación de la expresión de *CcSERK1* en diferentes procesos biológicos.

CAPÍTULO V

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

En este trabajo se clonó, se disectó y se estudió funcionalmente una secuencia del genoma de *C. canephora*, localizada -1,620 pb corriente arriba del homólogo del gen *CcSERK1*, considerada aquí como el promotor putativo de este gen. Debido a que en la actualidad no es posible determinar la longitud funcional de un promotor, la secuencia genómica de -1,620 pb fue disectada para encontrar el tamaño mínimo funcional y para identificar elementos de respuesta requeridos para controlar la inducción del gen *CcSERK1* en el momento de la transición somática-embriogénica y posteriormente durante el desarrollo de las estructuras embrionarias.

El uso del gen *uidA* como reportero permitió evaluar indirectamente la funcionalidad del promotor de *CcSERK1* durante la embriogénesis somática y en sistemas heterólogos. Empleando este sistema, se obtuvieron datos que permiten proponer que una región de -1,048 pb es suficiente para dirigir la expresión del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis somática, con patrones idénticos a los reportados para homólogos de *SERK1* de otras especies. La región comprendida entre -1,048 y -1,620 bp es necesaria para la expresión de *CcSERK1* en etapas cercanas a la diferenciación de células somáticas a embrionarias, pero no durante las etapas de diferenciación embrionaria, presumiblemente porque en esta región se encuentran los elementos de respuesta *BBM* y *WUS*. La región localizada entre -792 y -618 pb controla la expresión de *CcSERK1* durante las etapas de diferenciación del embrión, donde se localiza el elemento de respuesta para el factor transcripcional *ANT*. Un segmento más pequeño que -618 pb no puede controlar la expresión de *CcSERK1* durante la embriogénesis somática. Con base en estos datos, se puede concluir que el promotor del gen *CcSERK1* en *C. canephora* tiene una longitud de al menos -1,620 pb y que en esta secuencia los REs para *BBM* y *WUS* controlan la expresión del gen en la etapa de transición somática-embriónica, mientras que el REs para *ANT* regula la expresión de *CcSERK1* después que esta transición ha tenido lugar, cuando los embriones se encuentran en proceso de formación. Adicionalmente, en el modelo de embriogénesis somática de *C.*

canephora, los REs para *AGL15* y *LEC1* parecen no participar en la regulación de la expresión de *CcSERK1* en estas etapas del desarrollo embrionario.

El promotor *CcSERK1* es fisiológicamente sensible a la adición externa de auxinas, como se detectó por su expresión ectópica en el sistema heterólogo de *N. benthamiana*, donde la adición de ANA y 2,4-D potenciaron la actividad del promotor al inducir el gen *uidA*, como ha sido reportado previamente. La corroboración de la dependencia de auxinas se confirmó cuando se mutaron los cuatro AuxRE presentes en el promotor de *CcSERK1*, aboliendo por completo la actividad de GUS.

La clonación del homólogo del promotor de *CcSERK1* y su posterior análisis dentro del protocolo de embriogénesis somática altamente eficaz de *C. canephora* constituye una herramienta valiosa para potenciar el valor del gen *SERK1* como marcador molecular de la embriogénesis. De esta manera, el modelo de embriogénesis somática de *C. canephora*, por su alta reproducibilidad y eficiencia, demuestra ser más valioso que los protocolos de especies modelo, como *Arabidopsis* y tabaco.

5.2 PERSPECTIVAS

Con el aislamiento y caracterización del promotor del gen *SERK1* de *Coffea canephora*, se puede realizar otro tipo de estudios para comprender mejor el papel regulatorio del gen *CcSERK1*, tanto en el proceso de la embriogénesis somática como en otros procesos de diferenciación celular en los que se le ha ubicado.

El sistema reportero pCcSERK1::GUS se puede usar para monitorear con precisión la expresión de *CcSERK1* durante la diferenciación de órganos del embrión.

El promotor de *CcSERK1* también puede ser útil como sistema reportero para investigar la identidad de la señal externa que induce la expresión de *CcSERK1*, así como para identificar intermediarios de la cascada de transducción de señales que son responsables de transducir la señal unida por *SERK1* y su(s) correceptor(es).

Con el promotor de *CcSERK1* se puede diseñar experimentos que permitan realizar la detección *in vivo* y el posible aislamiento del complejo de señalización de *CcSERK1* durante el proceso de embriogénesis somática de *C. canephora*.

Se puede realizar estudios de regulación transcripcional de *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *C. canephora*, mediante interacciones proteína-DNA, utilizando las técnicas de ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA) o ensayos de levadura de uno o doble híbrido, entre otros.

Se puede analizar la regulación de la expresión del gen *CcSERK1*, bajo diferentes señales detectadas en la secuencia de su promotor, en otros procesos o etapas de diferenciación de la planta de *C. canephora*.

Se puede localizar la proteína *SERK1* a nivel sub-celular en diferentes procesos.

ANEXOS
Anexo I.I Oligonucleótidos para el aislamiento del promotor del gen *CcSERK1*
Cuadro 2.1 Oligonucleótidos para el aislamiento del promotor del gen *CcSERK1*

Nombre	Secuencia
CcSERK 1R	5'- GCAAAGCATCACCTTCCATGTTAGCAA-3'
CcSERK 2R	5'- AAAGCAGCATTACCCAGATCTACTCTT-3'

Anexo I.II Método de extracción de DNA genómico por método CTAB (Doyle y Doyle, 1987).

1. Se pulverizó 0.2 g de tejido de la muestra en un mortero con N₂ y se le agregó 400 µL de solución de extracción recién preparada, más 2% de β-mercaptoetanol (8 µL) y se incubó a 60°C por 1 h en el termoblock.
2. Se agregó un volumen igual de cloroformo–alcohol isoamílico (24:1) y se mezcló por inversiones.
3. Se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min y se transfirió la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo.
4. Se repitió los dos pasos anteriores y se mezcló por inversiones.
5. Para la eliminación del RNA, se trató con RNAasa (10 mg/mL) incubando durante 30 min. a 37°C. En seguida se le agregó 0.7 vol de isopropanol (-20°C) de acuerdo con el volumen extraído, y se colocó a -20°C por 1 h para precipitar el DNA.
6. Se Centrifugó nuevamente a 10,000 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante, se lavó la pastilla con 500 µL de solución de lavado.
7. Se secó a temperatura ambiente y se resuspendió en H₂O estéril.

Anexo I.III Nucleo Spin Tissue Genomic DNA purification Kit

1. Se colocó de 150-200 µL de gDNA en una columna de Nucleo Spin® Tissue. Se centrifugó a 11,00 g x 1 minuto y se descartó el flujo colectado en el tubo.

2. Se lavó la membrana de sílica: 1^{er} lavado: Se le adicionó 500 µL del amortiguador BW a la membrana (columna). Se centrifugó por 1 min a 11,000 g y se descartó el flujo colectado en el tubo. 2^{do} lavado: Se le adicionó 600 µL del amortiguador B5 a la columna y se centrifugó a 11,000 g x 1 min y se descartó el flujo colectado en el tubo.
 - Se secó la membrana de sílica: Se centrifugó por 1 min a 11,000 g la columna para terminar de remover los residuos de etanol.
3. Elución del DNA purificado: Se colocó la columna Nucleo Spin® Tissue en el tubo de microcentrífuga de 1.5 mL y se le adicionó 100 µL del amortiguador BE previamente calentado a 70 °C. Se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó a 11,000 g x 1 min.

Anexo I.IV

Nucleo Spin Gel and PCR Clean-Up (Clontech).

1. Se mezcló 90 µL de la muestra (gDNA digerido) con 200 µL de amortiguador NT1
2. Se colocó la columna Nucleo Spin gel dentro de un tubo de 2 mL y se adicionó la muestra del paso 1 a la columna.
 - Se centrifugó a 11,000 g x 30 seg. Se descartó el fluido colectado y se colocó nuevamente la columna en un tubo de 2 mL.
3. Se adicionó 700 µL del amortiguador NT3 a la columna Nucleo Spin. Se centrifugó a 11,000 g x 30 seg. Se descartó el fluido colectado y se colocó nuevamente la columna en un tubo de 2 mL.
4. Se centrifugó por 1 min. a 11,000 g para terminar de remover completamente el amortiguador NT3.
5. Elución del DNA: Se colocó la columna Nucleo Spin Gel en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL. Se adicionó 20 µL del amortiguador NE (previamente calentado a 70°C) se incubó a temperatura ambiente (18 -25 °C) por 1 min. Y se centrifugó a 11,000g por un minuto.
6. Se fraccionó el DNA: por cada reacción se fraccionó 3 µL en un gel al 0.6% de

agarosa.

Anexo I.V

Extracción de DNA plasmídico mediante lisis alcalina

1. Se centrifugó 3 mL de un cultivo de bacterias *E. coli* por 10 seg., a 10,000 rpm y se tomó el sobrenadante.
2. Se adicionó 200 µL de solución de resuspensión (Tris, pH=8, 50 mM, EDTA 10mM y RNAsa a 100 µg/mL). Se resuspendió la pastilla con vortex.
3. Se adicionó 200 µL de solución de lisis (NaOH 200 mM, SDS 1%), se invirtió el tubo suavemente asegurándose que el lisado sea aclaro.
4. Se adicionó 200 µL de solución de neutralización (acetato de potasio 3 M, pH=5.5), se invirtió el tubo varias veces.
5. Se centrifugó la muestra en microcentrífuga a máxima velocidad por 5 min.
6. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo conteniendo 200 µL de la suspensión de sílica. Se invirtió varias veces para mezclar perfectamente.
7. Se centrifugó la muestra a máxima velocidad por 10 seg., y se removió el sobrenadante.
8. Se adicionó 0.5 mL (500 µL) de solución de lavado (NaCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM, pH=7.5, EDTA 2.5 mM, 50% etanol), y se resuspendió la pastilla con vortex.
9. Se centrifugó la muestra a máxima velocidad por 10 seg., se removió el sobrenadante y se centrifugó brevemente para bajar el líquido de las paredes del tubo.
10. Se secó la pastilla por 2 min. A 55 °C.
11. Se resuspendió la pastilla de sílica en 35 µL de H₂O, y se calentó a 55 °C por 2 min.
12. Se centrifugó la muestra a máxima velocidad por 30 seg., se transfirió 30 µL del sobrenadante a un tubo limpio, evitando aspirar partículas de sílica.

Anexo I.VI

Digestión de los gDNA de *C. canephora*

En la figura 1A se muestra los resultados obtenidos de la digestión de gDNA. No se logró que el gDNA digirieran completamente excepto la muestra digerida con la enzima *DraI* carril 4, por consiguiente las muestras digeridas con la enzima *PvuII* y con la enzima *StuI* se le adicionó 2.0 μL más de enzima y se colocaron nuevamente a 37 °C por 2 hrs, los resultados se muestran en la figura 1B, no se logró la digestión completa del gDNA, pero aun así se continuo con la purificación de estas muestras y la ligación de los adaptadores a los gDNA digeridos, descrito en resultado.

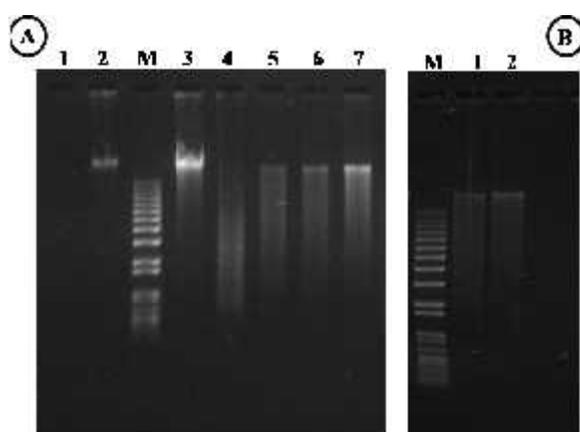


Figura 1 Digestión de DNA genómico. Una alícuota de 5.0 μL del producto de la digestión fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A): Carril 1: gDNA Control digerido con la enzima *PvuII*; Carril 2: gDNA control; Carril 3: gDNA de café; Carril 4: gDNA digerido con la enzima *DraI*; Carril 5: gDNA digerido con la enzima *EcoRV*; Carril 6: gDNA digerido con la enzima *PvuII*; Carril 7: gDNA digerido con la enzima *StuI*. B): Carril 1: gDNA digerido con la enzima *PvuII*; Carril 2: gDNA digerido con la enzima *StuI*. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb.

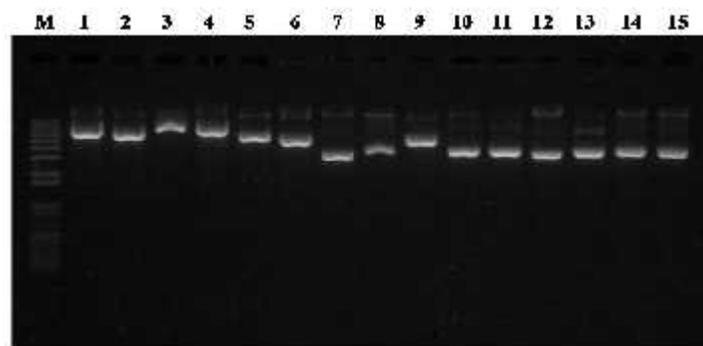
Anexo I.VII**Aislamiento de DNA plasmídico del promotor de CcSERK1**

Figura 2 Aislamiento de DNA plasmídico del promotor de CcSERK1. Una alícuota de 5.0 μL de pDNA fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1-15: pDNA de diferentes colonias. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb.

Anexo I.VIII

Alineamiento de los cebadores con la secuencia del promotor de CcSERK1

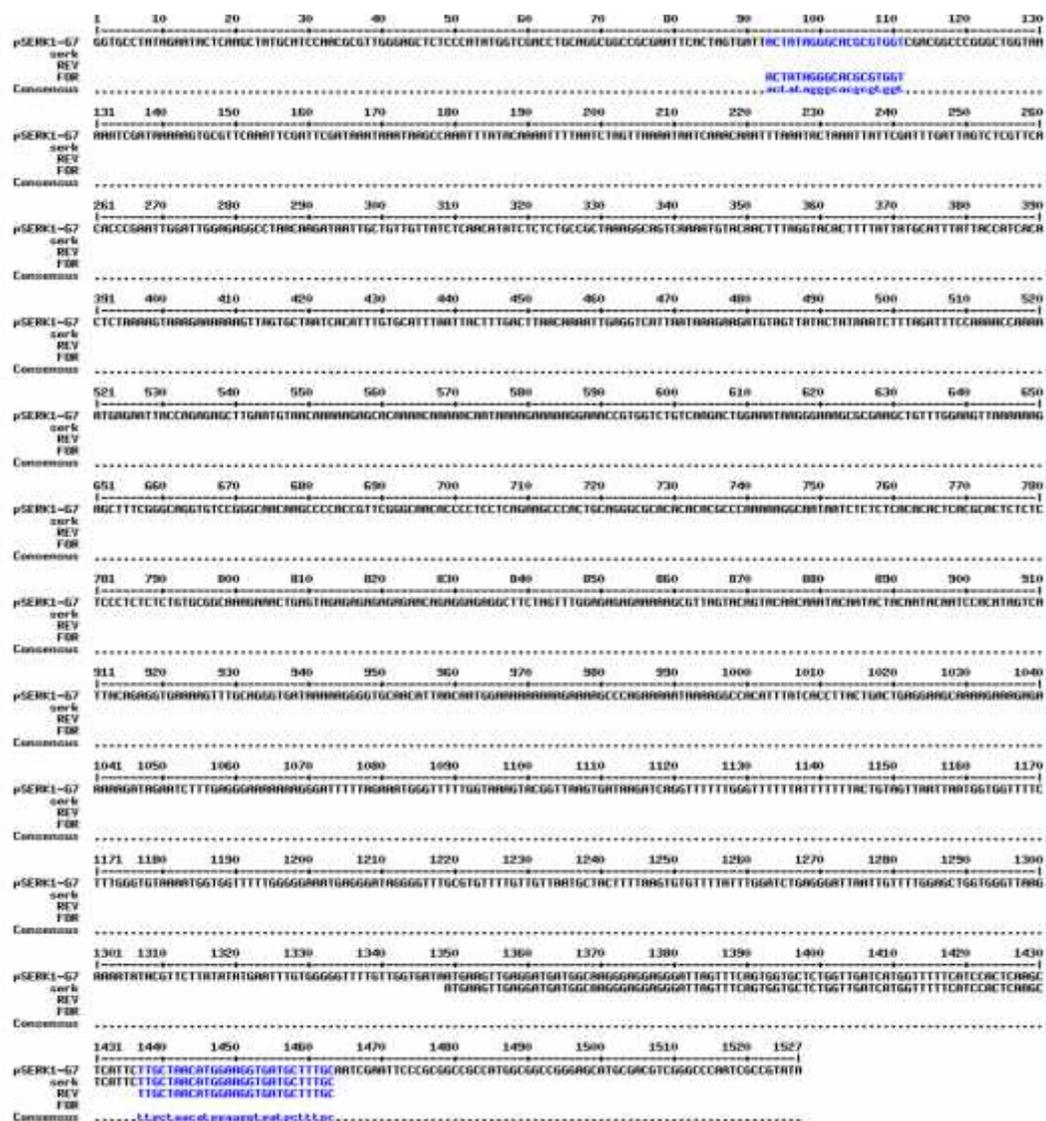


Figura 3 Alineamiento de los cebadores (utilizados en el aislamiento del promotor) con la secuencia obtenida del promotor del gen *CcSERK1*. Región en azul alineamiento de los cebadores. El alineamiento se realizó con el programa *multalin* (Corpet, 1988).

Anexo I.IX

Alineamiento de la secuencia nucleotídica del promotor de CcSERK1 obtenida en este trabajo con la reportada en la base de datos.



Figura 4 Alineamiento de la secuencia del promotor del gen *CcSERK1* aislada en este trabajo (Marcada en color Rojo) con la reportada en la base de datos del genoma de café (<http://coffee-genome.org/>). El alineamiento se realizó con el programa *multalin* (Corpet, 1988).

Anexo I.X

Tabla de elementos de respuesta en *Cis* localizados en el promotor del gen *CcSERK1*

Elementos en <i>Cis</i>	Secuencia	Cadena (+)	Función	Referencias
Agamous	taagCCAAAtttatacaa	293, 620, 326, 426, 889, 1,221,1,227, 1,231, 1,445;	Necesario para el patrón normal de la división celular, expansión y diferenciación durante la morfogénesis.	Huang <i>et al.</i> , 1996;
AGAMOUS-like 6, 8, 10, 17, 11, 14, 13,18;	caatggaaaaaaaAGA AAagc cCAAAAgaga	293, 330;	Promueve la identidad del meristema floral temprano con APETALA1 y CAULIFLOWER. Necesario para el patrón normal de la división celular, expansión y diferenciación durante la morfogénesis.	Huang <i>et al.</i> , 1996
BBM	cgGCACAagttccattgg caa	658;	Proteína BABY BOOM; Promueve la proliferación celular, la diferenciación y la morfogénesis, especialmente durante la embriogénesis.	Matys <i>et al.</i> , 2006;
CARGCW8GAT	CAAAAatatg	8, 36;	Sitio de unión de AGAMOUS-like 15;	de Folter <i>et al.</i> , 2006; Tang <i>et al.</i> , 2003;
LEC1	CCAAT	1, 48, 104, 112, 147, 200, 274, 293,330, 430, 431, 441, 451, 461, 516, 562, 620, 652, 669, 678.....;	Proteína LEAFY COTYLEDON1. Actúa como regulador central de la embriogénesis. Requerido para la especiación de la identidad del cotiledón y la finalización de la maduración del embrión. Participa en las vías de señalización de la luz azul y del ácido abscísico.	Matys <i>et al.</i> , 2006;
WUSATAg	TTAATcc	690;	Proteína WUSCHELL. Juega un papel central durante la embriogénesis temprana y la floración. Requerido para especificar la identidad de células del vástago del meristemo, tal como el meristemo apical (SAM). Se requiere para la organogénesis en el meristemo floral.	Kamiya <i>et al.</i> , 2003;
ATWOX13	ttTAATTact	1,151;	Homeobox 13 (WOX13) relacionado con WUSCHEL. Factor de transcripción involucrado en muchos procesos de desarrollo.	Weirauch <i>et al.</i> , 2014; Franco-zorrill <i>et al.</i> , 2014;
BIHD1OS	TGTCA	378, 1,312;	<i>OsBIHD1</i> , gen de arroz que codifica un factor de transcripción homeodominio BELL, en respuestas de resistencia a enfermedades.	Luo <i>et al.</i> , 2005;
GCCCORE	GCCGct	1,041;	Caja GCC en muchos genes responsivos a patógenos;	Brown <i>et al.</i> , 2003; Chakravarthy <i>et al.</i> , 2003;
MYB1AT	AAACCA	1,228;	El sitio de reconocimiento de MYB se encuentra en los promotores del gen <i>rd22</i> sensible a la deshidratación y muchos otros genes en <i>Arabidopsis</i> .	Franco-zorrill <i>et al.</i> , 2014;
MYB2CONSENSU SAT	TAAC TG	281, 345, 470;	El sitio de reconocimiento de MYB se encuentra en los promotores del gen <i>rd22</i> sensible a la deshidratación y muchos otros genes en <i>Arabidopsis</i> .	Abe <i>et al.</i> , 2003;
MYBGAHV	TAACAAA	1,167, 1,262;	Elemento central de Giberelina (GA)	Gubler <i>et al.</i> , 1999; Morita <i>et al.</i> , 1998;
GT1GMSCAM4	GAAAAA	1,120, 1,565.....;	"Moivo GT-1" Juega un papel en la expresión del gen <i>SCaM-4</i> inducida por patógenos y sal.	Park <i>et al.</i> , 2004;
WBOXATNPR1	TTGAC	93, 1,161;	"W-box" encontrado en el promotor del gen <i>NPR1</i> de <i>Arabidopsis</i> ; Fueron reconocidos específicamente por proteínas de unión al ADN (WRKY) inducidas por ácido salicílico (SA).	Chen <i>et al.</i> , 2002; Yu <i>et al.</i> , 2001;

WBOXNTCHN48	CTGACT	79;	NtWRKY1, NtWRKY2 y NtWRKY4 unidos a W box; NtWRKYs posiblemente implicados en la transcripción de genes de defensa responsivos a elisitor en tabaco.	Eulgem <i>et al.</i> , 2000; de Pater <i>et al.</i> , 1996;
DPBFCOREDCDC3	ACACCCG	132, 602;	Secuencia central de unión de factores de transcripción bZIP, que pueden ser inducidos por ABA	Finkelstein <i>et al.</i> , 2000; López-Molina <i>et al.</i> , 2000;
AUXRETGA1GMGH3	TGACTaaa	360, 552, 1,162, 1,176;	TGA-box Elemento responsivo a auxina (AXURE) en el promotor GH3 de soya.	Liu <i>et al.</i> , 1994;
ARF: ARF11; ARF19; IAA22	TaCGACAaa TGCTC	456;	Factor de respuesta auxina 19 (proteína Auxin-responsiva IAA22). Modula la expresión temprana de los genes de respuesta auxina.	Weirauch <i>et al.</i> , 2014;
AREB2; ABF4	ACACAgt	60, 1,076;	Elementos responsivos a ácido abscísico.	Busk <i>et al.</i> , 1998; Shen <i>et al.</i> , 1995;
EIN3; AtEIN3	ttATGCAtt	1,085;	Protein ETHYLENE INSENSITIVE 3. Actua como regulador positivo en la vía de respuesta a etileno.	Chang <i>et al.</i> , 2013;
ELRECOREPCR1	TTGACC	93;	EIRE (Elemento reponsivo a elicitor).	Chen <i>et al.</i> , 2000; Rushton <i>et al.</i> , 2002;
ERELEE4	ATTTCAA	558;	"ERE (Elemento responsivo a etileno)"	Tapia <i>et al.</i> , 2005; Itzhaki <i>et al.</i> , 1994;
PYRIMIDINEBOX OSRAMY1A	AAAAGG	97;	Caja de pirimidina, parcialmente implicados en la represión del azúcar.	Morita <i>et al.</i> , 1998;
PROLAMINBOXOS	TGCAAAG	132;	"Prolamine box"	Wu <i>et al.</i> , 2000;
ATWRKY61, 65,71	tcGTCAAcaa	792, 793, 1,051, 1,052, 1,307;	Proteína de unión al DNA-WRKY 61	Eulgem <i>et al.</i> , 2000;
WRKY71OS	TGAC	318, 897, 80, 94, 319, 360, 1,162;	"W-box que contiene TGAC"; Sitio de unión WRKY71 de arroz, un represor transcripcional de la vía de señalización de giberelina; Las proteínas WRKY se unen específicamente a los elementos W box que contienen TGAC en los genes relacionados con la patogénesis (PR-10).	Xie <i>et al.</i> , 2005; Zhang <i>et al.</i> , 2004;
SURECOREATSU LTR11	GTCTC	32, 214, 270, 300, 327, 418, 447, 532, 613, 774, 993, 995, 1,238, 1,249, 1,300, 1,316, 1,454, 1,513...;	Núcleo del elemento sensible al azufre (SURE) que se encuentra en el promotor de SULTR1.	Maruyama-Nakashita <i>et al.</i> , 2005;
DR5GMGH3	CCTTTgccta	97;	DR5; Elemento altamente activo de respuesta auxina sintetica.	Ulmasov <i>et al.</i> , 1997;
RAV (TEM1; EDF1	tCAACAta	1,026;	Factor de transcripción responsivo a etileno; Represor.	Hu <i>et al.</i> , 2004; Fowler <i>et al.</i> , 2003;
AP2; ADAP	cgGCACAagttccattgg caa	658;	Factor de transcripción responsivo a etileno; Activador.	Weirauch <i>et al.</i> , 2014;
YAB5	taATCAT	306;	YABBY5; Factor de transcripción específico de plantas.	Franco-zorrill <i>et al.</i> , 2014;
TEM2; AtRAV2	tCAACAta	1,026;	Factor de transcripción responsivo a etileno.	Weirauch <i>et al.</i> , 2014;
GATABOX	GATAC	43, 425, 447, 613, 730, 836, 852, 879, 1,007;	Requerido para alto nivel, regulada por luz, y expresión específica de tejido.	Reyes <i>et al.</i> , 2004; Teakle <i>et al.</i> , 2002;
GT1CONSENSUS	GGAAAT	1,007, 1,120, 1,322...;	GT-1 Sitio consenso de unión en muchos genes regulados por la luz.	Le <i>et al.</i> , 1999; Buchel <i>et al.</i> , 1999;
GT1CORE	GGTTAA	342, 538;	Elemento responsivo a la luz	Villain <i>et al.</i> , 1996; Gilmartin <i>et al.</i> , 1990;
SORLIP1AT	GCCAC	878;	Secuencias sobre-representadas en promotores inducidos por luz.	Jiao <i>et al.</i> , 2005; Hudson <i>et al.</i> , 2003;
CIACADIANLELHC	CAATACAATC	1,602;	Región necesaria para la expresión circadiana del gen <i>Lhc</i> del tomate;	Piechulla <i>et al.</i> , 1998;

ATML1	TAAATgta	67, 413, 491, 717;	Involucrado en la especificación y la formación de patrones celulares durante la embriogénesis.	Weirauch <i>et al</i> 2014;
OSE2ROOTNODULE	AAGAG	122;	Uno de los motivos de secuencia consenso de elementos específicos de órganos (OSE) característicos de los promotores activados en células infectadas de nódulos de raíz;	Fehlberg <i>et al.</i> , 2005; Vieweg <i>et al.</i> , 2004;
Aintegumenta (ANT)	gttcacaCCCGAat	972;	Regula la división celular	Nole-Wilson <i>et al.</i> , 2000; Krizek <i>et al.</i> , 2000;
ATHB15	AtaATTATtt	85;	Factor de transcripción involucrado en la regulación del desarrollo del meristemo para promover la formación de órganos laterales. Puede regular la formación o el mantenimiento de los tejidos procambiales y vasculares.	Mathelier <i>et al.</i> , 2013; Matys <i>et al.</i> , 2006;
CCA1	aacATATCtc	215;	Proteína CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 [CCA1]. Factor de transcripción involucrado en el reloj circadiano y en la regulación del fitocromo.	Wang <i>et al.</i> , 1997;
CDC5	accGCTGAgcc	321;	Proteína-tipo 5 del ciclo de la división delular.	Monaghan <i>et al.</i> , 2009; Hirayama <i>et al.</i> , 1996;
RAV1	tctCAACAatc	180, 542, 563, 743, 778, 829, 392, 673, 794, 1,024, 1,382, 1,402, 1,582;	Factor de transcripción que responde al etileno RAV1 (Regulador negativo).	Hu <i>et al.</i> , 2004; Fowler <i>et al.</i> , 2003;
RVE1	aacATATCtc	1,028;	Factor de transcripción que integra el reloj circadiano y las vías de auxina. No actúa dentro del reloj central, sino que regula los niveles de auxina libre de una manera específica del tiempo del día. Regula positivamente la expresión de <i>YUC8</i> durante el día, pero no tiene efecto durante la noche.	Franco-zorrill <i>et al.</i> , 2014;
ERF	ctGCCGctaa	1,039;	Factor de transcripción responsivo a etileno; (Activador).	Chang <i>et al.</i> , 2013;
Dof1, Dof2, Dof3	cgcTAAAGgca	694, 1,043, 1,113, 1,185, 1,329....;	Factor de transcripción de dedo de zinc Dof1/ MNBI. Participa en el control de la germinación de las semillas.	Yanagisawa, S., 2000, 2001;
PBF	ataAAAAGtgc	293, 708, 853...;	Prolamin box binding factor	Franco-zorrill <i>et al.</i> , 2014;
TEIL	ATGTAAca	64, 70, 437...;	Tipo- EIN3 de tabaco	
ACGTATERD1	ACGT	616;	Secuencia ACGT requerida para la expresión de <i>erd1</i> inducida por etiolación (respuesta temprana a la deshidratación) en <i>Arabidopsis</i> .	Nakashima <i>et al.</i> , 2006; Simpson <i>et al.</i> , 2003;
AGMOTIFNTMYB2	TTGGATCT	426;	Motivo-AG en -114 del promotor del gen <i>NtMyb2</i> ; <i>NtMyb2</i> es un regulador de retrotransposon de tabaco Tto1 y el gen de la fenilalanina amonio liasa relacionada con la defensa (PAL), que son inducidos por estrés, tales como diversas heridas o inductor de tratamiento; sitio de unión de AGP1.	Matys <i>et al.</i> , 2006;
AP1	TTTTTAG	158;	Las cajas de CARG en el promotor del gen <i>APETALA3</i> de <i>Arabidopsis</i> , (identidad de órgano floral).	
ARR10	AGATAATT	215, 612, 775, 1,006;	Regulador de respuesta 10; Podría activar directamente algunos reguladores de respuesta tipo A en respuesta a citocininas.	Franco-Zorrilla <i>et al.</i> , 2014;
ARR11	tcAGATAcgt	610;	Regulador de respuesta 11; Podría activar directamente algunos reguladores de respuesta tipo A en respuesta a citocininas.	Franco-Zorrilla <i>et al.</i> , 2014;
ARR14	caGATACgtc	46, 611;	Regulador de respuesta 14;	Franco-Zorrilla <i>et al.</i> , 2014;
ARR18; RR18	aacaTATCTctct	1,028;	Regulador de respuesta 18;	Franco-Zorrilla <i>et al.</i> , 2014;

ARR-B; ARR1AT	CGATT ataGAATCtt	215, 775, 812, 873, 956, 961, 987, 1,219;	Elemento responsivo a citocinina.	Ross <i>et al.</i> , 2004; Sakai <i>et al.</i> , 2000;
ASF1NTPARA	TTATGcattattaccat	1,085;	ASF-1 (factor nuclear de unión a 1). Encontrado en regiones que responden a las auxinas.	Franco-zorrill <i>et al.</i> , 2014;
CCAATBOX1	ATTGG	1, 620;	Secuencias que se encuentran en las regiones 5' no codificantes de los genes eucariotas; "Caja CCAAT" que se encuentra en el promotor de los genes de proteínas de choque térmico; "Caja CCAAT" actúa con HSE para aumentar la actividad del promotor <i>hs</i> .	Haralampidis <i>et al.</i> , 2002; Rieping <i>et al.</i> , 1992;
ANT; DRG; CKC; CKC1	CACAAgttcattg	661;	Factor de transcripción responsivo a etileno ANT (AINTEGUMENTA) tipo AP2.	Nole-Wilson <i>et al.</i> , 2000; Krizek <i>et al.</i> , 2000; Elliott <i>et al.</i> , 1996;
GAREAT	TAACAAG	1,001, 1,167, 1,262;	GARE (Elemento responsivo a GA);	Ogawa <i>et al.</i> , 2003;
POLLEN1LELAT5 2	AGAAA	275, 451, 673, 725 855, 865, 913, 919, 959, 1,180;	Uno de los dos elementos reguladores; AGAAA y TCCACCATA son necesarios para la expresión específica del polen; (POLLEN2LELAT52).	Filichkin <i>et al.</i> , 2004; Bate <i>et al.</i> , 1998;
RAV1AAT	CAACA	183, 545, 566, 746, 781, 832, 1,027, 1,385...;	Secuencia consenso de unión del factor de transcripción RAV1 de <i>Arabidopsis</i> ; RAV1 se une específicamente al ADN con motivos de secuencia bipartita de RAV1-A (CAACA) y RAV1-B (CACCTG).	Hu <i>et al.</i> , 2004; Fowler <i>et al.</i> , 2003;
CAATBOX1	CAAT	2, 442, 444, 517, 619, 621, 653, 679, 751, 755, 763, 768, 841,1286, 1,458, 1,594, 1,602, 1,607;	Elementos que actúan en <i>Cis</i> en las regiones promotora y potenciadora.	Rieping <i>et al.</i> , 1992; Haralampidis <i>et al.</i> , 2002;
TATABOX2	TATAAAT	1,208;	La secuencia y el espaciamiento de los elementos de la caja TATA son críticos para una iniciación correcta.	Grace <i>et al.</i> , 2004; Shirsat <i>et al.</i> , 1989;
TBP	ctATAAAtccttaga	1,207;	Factor de transcripción TFIID (o TATA-binding protein, TBP).	Badis <i>et al.</i> , 2009; Matys <i>et al.</i> , 2006;

Anexo I.XI**Cebadores para la construcción de los vectores binarios pCcSERK1::GUS**

Nombre	Secuencia
PrSERK1- <i>KpnI</i> -For1	CGG GGTACC AAAAATCGATAAAAAGTGC GTTCAAATT
PrSERK1- <i>NcoI</i> -Rev1	CATGCCATGGTATCACCAACAAAACCCCCACAA
PrSERK1- <i>KpnI</i> -For2	CGG GGTACC CAACTTTAGGTACTTTTATTATGCA
PrSERK1- <i>KpnI</i> -For3	CGG GGTACCAGAGCTTTCGGGCAGGTGTC

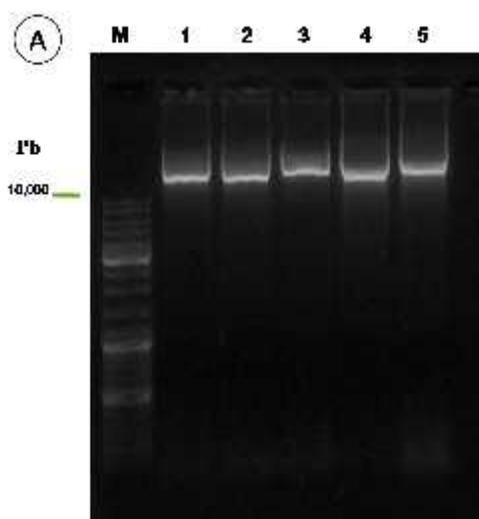
Anexo I.XII**Extracción de pDNA del vector pCAMBIA1301**

Figura 5 Electroforesis de DNA plasmídico del vector pCAMBIA1301. Una alícuota de 5.0 μL de DNA plasmídico fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1-5: pDNA (pCAMBIA1301) de diferentes colonias. M: Marcador de peso molecular de 1 Kb;

Anexo I.XIII**Confirmación de las construcciones pCcSERK1::GUS mediante PCR.**

Se realizó la confirmación de las construcciones pCcSERK1::GUS a partir de pDNA mediante PCR utilizando cebadores específicos, los resultados son los que se muestran en la figura 7, en todas las clonas analizadas se obtuvo la amplificación del tamaño esperado.

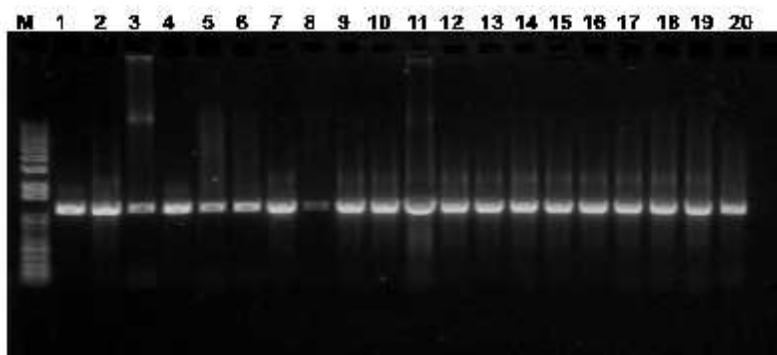


Figura 6 Análisis de los plásmidos pCcSERK1::GUS por PCR. Una alícuota de 5.0 μL del producto de PCR fue fragmentado por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y teñido con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1-12: pCcSERK1::GUS; M: Marcador de peso molecular de 1 Kb.

BIBLIOGRAFÍA

- Arroyo-Herrera, A., A. K. Gonzalez, R. Canche-Moo, F. R. Quiroz-Figueroa, V. M. Loyola-Vargas, L. C. Rodriguez-Zapata, C. B. D'Hondt, V. M. Suárez-Solís y E. Castaño (2008). Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(2), 171-180.
- Abe, H., T. Urao, T. Ito, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 15(1), 63-78.
- Brandalise, M., F. E. Severino, M. P. Maluf, I. G. Maia (2009). The promoter of a gene encoding an isoflavone reductase-like protein in coffee (*Coffea arabica*) drives a stress-responsive expression in leaves. *Plant Cell Reports*, 28(11), 1699.
- Bate, N., D. Twell (1998). Functional architecture of a late pollen promoter: pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements. *Plant Molecular Biology*, 37(5), 859-869.
- Boutilier, K., R. Offringa, and V. K. Sharma (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14(8), 1737-1749.
- Buchel, A. S., F. T. Brederode, J. F. Bol, H. J. Linthorst (1999). Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo. *Plant Molecular Biology*, 40(3), 387-396.
- Busk, P. K., M. Pagés (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology*, 37(3), 425-435.
- Brown, R., L., K. Kazan, K. C. McGrath, D. J. Maclean, J. M. Manners (2003). A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1. 2* gene of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 132 (2), 1020-1032.

- Canche-Moo, R. L. R., A. Ku-González, C. Burgeff, V. M. Loyola-Vargas, L. C. Rodríguez-Zapata y E. Castaño (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 84(3), 373-377.
- Cotta, M. G., L. M. Barros, J. D. De Almeida, F. De Lamotte, E. A. Barbosa, N. G. Vieira, G. S. C. Alves, A. F. Vinecky, A. C. Andrade, P. Marraccini (2014). Lipid transfer proteins in coffee: isolation of *Coffea* orthologs, *Coffea arabica* homeologs, expression during coffee fruit development and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, 85(1-2), 11-31.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16(22), 10881-90.
- Cueva-Agila, A. Y., J. Medina, L. Concia, R. Cella (2016). Effects of plant growth regulator, auxin polar transport inhibitors on somatic embryogenesis and *CmSERK* gene expression in *Cattleya maxima* (Lindl.). In *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications* (pp. 255-267). Springer India.
- Chakravarthy, S., R. P. Tuori, M. D. D'Ascenzo, P. R. Fobert, C. Després, G. B. Martin (2003). The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box *cis* elements. *Plant Cell*, 15(12), 3033-3050.
- Chen, W., N. J. Provart, J. Glazebrook, F. Katagiri, H. S. Chang, T. Eulgem, F. Mauch, S. Luan, G. Zou, S. A. Whitham, P. R. Budworth, Y. Tao, Z. Xie, X. Chen, S. Lam, J. A. Kreps, J. F. Harper, A. Si-Ammour, B. Mauch-Mani, M. Heinlein, K. Kobayashi, T. Hohn, J. L. Dangl, X. Wang, T. Zhu (2002). Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell*, 14(3), 559-574.
- Chen, C., Z. Chen (2000). Isolation and characterization of two pathogen- and salicylic acid-induced genes encoding WRKY DNA-binding proteins from tobacco. *Plant Molecular Biology*, 42(2), 387-396.

- Choi, Y. E., D. C. Yang, J. C. Park, W. Y. Soh, and K. T. Choi (1998). Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. *Plant Cell Reports*, 17(6-7), 544-551.
- Chugh, A. y P. Khurana (2002). Gene expression during somatic embryogenesis recent advances. *Current Science*, 83(6), 715-730.
- Després, C., C. DeLong, S. Glaze, E. Liu, P. R. Fobert (2000). The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell*, 12(2), 279-290.
- de Folter, S., G. C. Angenent (2006). Trans meets cis in MADS science. *Trends in Plant Science*, 11(5), 224-231.
- Denoeud, F., L. Carretero-Paulet, A. Dereeper, G. Droc, R. Guyot, M. Pietrella, Z. Chunfang, A. Alberti, F. Anthony, G. Aprea, J. Aury, P. Bento, M. Bernard, S. Bocs, C. Campa, A. Cenci, M. 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. 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. Henry, J. Jayarama, R. Ming, C. Nagai, S. Rounsley, D. Sankoff, G. Giuliano, V. A. Albert, P. Wincker, P. Lashermes (2014). The *coffee* genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345(6201), 1181-1184.
- de Aquino, S. O., F. de Araújo Carneiro, E. C. S. Rêgo, G. S. C. Alves, A. C. Andrade, P. Marraccini (2018). Functional analysis of different promoter haplotypes of the coffee (*Coffea canephora*) *CcDREB1D* gene through genetic transformation of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 132(2), 279-294.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle (1987). A rapid procedure for DNA purification from small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19, 11-15.

- Du, J., H. Yin, S. Zhang, Z. Wei, B. Zhao, J. Zhang, y J. Li (2012). Somatic Embryogenesis Receptor Kinases Control Root Development Mainly via Brassinosteroid Independent Actions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(6), 388-399.
- Dudits, D., L. Bogre, J. Gyorgyey (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science*, 99(3), 475-484.
- Elliott, R. C., A. S. Betzner, E. Huttner, M. P. Oakes, W. Q. Tucker, D. Gerentes, P. Pérez, D. R. Smyth (1996). *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2-like* gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. *Plant Cell*, 8(2),155-168
- Eulgem, T., P. J. Rushton, E. Schmelzer, K. Hahlbrock, I. E. Somssich (1999). Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by *WRKY* transcription factors. *EMBO Journal*, 18(17), 4689-4699.
- Fehér, A., T. P. Pasternak, D. Dudits (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 74(3), 201-228.
- Fehlberg, V., M. F. Vieweg, E. M. Dohmann, N. Hohnjec, A. Pühler, A. M. Perlick, H. Küster (2005). The promoter of the *leghaemoglobin* gene *VfLb29*: functional analysis and identification of modules necessary for its activation in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots. *Journal of Experimental Botany*, 56(413),799-806.
- Filichkin, S. A., J. M. Leonard, A. Monteros, P. P. Liu, H. Nonogaki (2004). A novel endo-*-mannanase* gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. *Plant Physiology*, 134(3), 1080-1087.
- Finkelstein, R. R., T. J. Lynch (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*, 12(4), 599-609.

- Fowler, S. G., D. Cook, M. F. Thomashow (2005). Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiology*, 137(3), 961-968.
- Franco-Zorrilla, J. M., I. López-Vidriero, J. L. Carrasco, M. Godoy, R. Vera Solano (2014). DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(6), 2367-2372.
- Garcês, H. M. P., C. E. M. Champagne, B. T. Townsley, S. Park, R. Malhó, M. C. Pedroso, J. J. Harada, N. R. Sinha (2007). Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), 15578-15583.
- Gazzarrini, S., Y. Tsuchiya, S. Lumba, M. Okamoto y P. McCourt (2004). The transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell*, 7(3), 373-385.
- Ge, X. X., G. E. Fan, L. J. Chai, W. W. Guo (2010). Cloning, molecular characterization and expression analysis of a SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE gene (*CitSERK1-like*) in *Valencia sweet orange*. *Physiologia Plantarum*, 32(6), 1197-1207.
- Guilfoyle, T. J., J. L. Key (1986). Auxin-regulated gene expression in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 4(3), 247-276.
- Gilmartin, P. M., L. Sarokin, J. Memelink, N. H. Chua (1990). Molecular light switches for plant genes. *Plant Cell*, 2(5), 369.
- Gou, X., K. He, H. Yang, T. Yuan, H. Lin, S. Clouse, and J. Li (2010). Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 11(1), 19.
- Gubler F., D. Raventos, M. Keys, R. Watts, J. Mundy, J. V. Jacobsen (1999). Target genes and regulatory domains of the GAMYB transcriptional activator in cereal aleurone. *The Plant Journal*, 17(11), 1-9.

- Guzzo, F., B. Baldan, P. Mariani, F. L. Schiavo y M. Terzi (1994). Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *Journal of Experimental Botany*, 45(10), 1427-1432.
- Grace, M. L., M. B. Chandrasekharan, T. C. Hall, A. J. Crowe (2004). Sequence and spacing of TATA box elements are critical for accurate initiation from the β -phaseolin promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 279(9), 8102-8110.
- Harding, E. W., W. Tang, K. W. Nichols, D. E. Fernandez y S. E. Perry (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS-Like 15*. *Plant Physiology*, 133(2), 653-663.
- Haralampidis, K., D. Milioni, S. Rigas, P. Hatzopoulos (2002). Combinatorial interaction of *cis* elements specifies the expression of the *Arabidopsis AtHsp90-1* gene. *Plant Physiology*, 129(3), 1138-1149.
- Han, X., X. Xu, D. D. Fang, T. Zhang, W. Guo (2012). Cloning and expression analysis of novel *Aux/IAA* family genes in *Gossypium hirsutum*. *Gene*, 503(1), 83-91.
- Hecht, V., J. P. Vielle-Calzada, M. V. Hartog, E. D. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus y S. C. de Vries (2001). *The Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127(3), 803-816.
- He, K., X. Gou, T. Yuan, H. Lin, T. Asami, S. Yoshida, J. Li (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Current Biology*, 17(13), 1109-1115.
- Hinniger, C., V. Caillet, F. Michoux, M. Ben Amor, S. Tanksley, C. Lin, J. McCarthy (2006). Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. *Annals of Botany*, 97(5), 755–765.
- Hu, Y. X., Y. H. Wang, X. F. Liu, J. Y. Li (2004). *Arabidopsis* RAV1 is down-regulated by brassinosteroid and may act as a negative regulator during plant development. *Cell Research*, 14(1),8.

- Hudson, M. E., P. H. Quail (2003). Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiology*, 133(4), 1605-1616.
- Huang, H., M. Tudor, T. Su, Y. Zhang, Y. Hu, H. Ma (1996). DNA binding properties of two *Arabidopsis* MADS domain proteins: binding consensus and dimer formation. *Plant Cell*, 8(1), 81-94.
- Ikeda, M, M. Umehara, H. Kamada (2006). Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23(2), 153-161.
- Ito, Y., K. Takaya and N. Kurata (2005). Expression of *SERK* family receptor-like protein kinase genes in rice. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1730(3), 253-258.
- Itzhaki, H., J. M. Maxson, W. R. Woodson (1994). An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation *glutathione-S-transferase (GST1)* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), 8925-8929.
- Johnson, C., E. Boden, J. Arias (2003). Salicylic acid and NPR1 induce the recruitment of trans-activating TGA factors to a defense gene promoter in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 15(8), 1846-1858.
- Jacobsen, H. J. (1991). Somatic embryogenesis in seed legumes: the possible role of soluble auxin receptors. *Journal of Experimental Botany*, 40(2), 139–143.
- Jiao, Y., L. Ma, E. Strickland, X. W. Deng (2005). Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 17(2), 3239-3256.
- Jiménez, V. and F. Bangerth (2001). "Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*". *Plant Science*, 160(2), 247–257.

- Jyothishwaran, G., D. Kotresha, T. Selvaraj, S. H. Srideshikan, P. K. Rajvanshi y C. Jayabaskaran (2007). A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Science*, 93(6), 770-772.
- Karlova, R., S. Boeren, E. Russinova, J. Aker, J. Vervoort and S. C. de Vries (2006). The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* protein complex includes *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1*. *The Plant Cell*, 18(3), 626-638.
- Kamiya, N., H. Nagasaki, A. Morikami, Y. Sato, M. Matsuoka (2003). Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *Plant Journal*, 35(4), 429-441.
- Komamine, A., M. Matsumoto, M. Tsukahara, A. Fujiwara, R. Kawahara, M. Ito, K. Nomura and T. Fujimura (1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures-physiology, biochemistry and molecular biology. In *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Nijkamp, H. J. J., L. H. W. Van Der Plas, A. Van Aartrijk (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 307-313.
- Kumar, V., K. V. Satyanarayana, A. Ramakrishna, A. Chandrashekar, G. A. Ravishankar (2007). Delivery of *N-methyltransferase* and *11S globulin* promoters of *Coffea canephora* Pex Fr. by tissue electroporation and analysis of transformational events. *Current Science*, 77-81.
- Kim, D. W., S. H. Lee, S. B. Choi, S. K. Won, Y. K. Heo, M. Cho, Y. Park, H. T. Cho (2006). Functional conservation of a root hair cell-specific cis-element in angiosperms with different root hair distribution patterns. *Plant Cell*, 18(11), 2958-2970.
- Klucher, K. M., H. Chow, L. Reiser, R. L. Fischer (1996). The *AINTEGUMENTA* gene of *Arabidopsis* required for ovule and female gametophyte development is related to the floral homeotic gene *APETALA2*. *Plant Cell*, 8(2), 137-153.
- Krizek, B. A., V. Prost, A. Macias (2000). *AINTEGUMENTA* promotes petal identity and acts as a negative regulator of *AGAMOUS*. *Plant Cell*, 12(8), 357-1366.

-
- Krizek, B. A. (1999). Ectopic expression of *AINTEGUMENTA* in *Arabidopsis* plants results in increased growth of floral organs. *Developmental Genetics*, 25(3), 224-236.
- Krikorian, A.D. y L. K. Simola (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiologia Plantarum*, 105(2), 347-354.
- Kwaaitaal, M.A., S. C. de Vries, and E. Russinova (2005). *Arabidopsis thaliana* Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. *Protoplasma*, 226(1-2), 55-65.
- Kwaaitaal, M. A., y S. C. de Vries (2007). The SERK1 gene is expressed in procambium and immature vascular cells. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), 2887-2896.
- Leroy, T., E. Alpizar, M. Dufour y H. Etienne (2007). *Coffea (Coffea ssp.)* In: *Agrobacterium Protocols*, Kan, Wang (eds). Humana Press Inc., Totowa, N. J. 2:344. pp. 191-207.
- Li, J. (2010). Multi-tasking of somatic embryogenesis receptor-like protein kinases. *Curr. Opin. Current Opinion in Plant Biology*, 13(5), 509–514.
- Liu, Z. B., T. Ulmasov, X. Shi, G. Hagen, T. J. Guilfoyle (1994). Soybean *GH3* promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell*, 6(5), 645-657.
- Lotan, T., M. Ohto, K. M. Yee, M. A. West, R. Lo, R. W. Kwong, K. Yamagishi, R. L. Fischer, R. B. Goldberg, J. J. Harada (1998). *Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93(7), 1195-1205.
- Lopez-Molina, L., N. H. Chua (2000.) A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*, 41(5), 541-547.
- Luo, H., F. Song, R. M. Goodman, Z. Zheng (2005). Up-regulation of OsBIHD1, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. *Plant Biology*, 7(5), 459-468.
- Mathelier A., X.Zhao, A. W. Zhang, F. Parcy, R. Worsley-Hunt, D. J. Arenillas, S. Buchman, CH. Y. Chen, A. Chou, H. Ienasescu, J. Lim, C. Shyr, G. Tan, M. Zhou, B. Lenhard, A. Sandelin, W. W. Wasserman (2013). JASPAR 2014: an extensively expanded

- and updated open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 142-147.
- Marraccini, P., C. Courjault, V. Caillet, B. Lepage, W. J. Rogers, S. Tessereau, A. Deshayes (2003). Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(1), 17-25.
- Matys, V., O. V. Kel-Margoulis, E. Fricke, I. Liebich, S. Land, A. Barre-Dirrie, I. Reuter, D. Chekmenev, M. Krull, K. Hornische, N. Voss, P. Stegmaier, B. Lewicki-Potapov, H. Saxel, A. E. Kel, E. Wingender (2006). TRANSFAC® and its module TRANSCompel®: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1),108-110.
- Mishra, M. K., Slater, A. (2012). Recent advances in the genetic transformation of coffee. *Biotechnology Research International*.
- Mizukami, Y., R. L. Fischer (2000). Plant organ size control: AINTEGUMENTA regulates growth and cell numbers during organogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 942–947.
- Monaghan, J., Xu, M. Gao, Q. Zhao, K. Palma, C. Long, S. Chen, Y. Zhang, X. Li (2009). Two Prp19-like U-box proteins in the MOS4-associated complex play redundant roles in plant innate immunity. *PLOS Pathogens*, 5(7), 1000526.
- Morita, A., T. A. Umemura, M. Kuroyanagi, Y. Futsuhara, P. Perata, J. Yamaguchi (1998). Functional dissection of a sugar-repressed *-amylase* gene (Ramy1A) promoter in rice embryos. *FEBS Letters*, 423(1), 81-85.
- Nakano, T., K. Suzuki, T. Fujimura, H. Shinshi (2006). Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 140(2), 411-432.
- Nakashima, K., Y. Fujita, K. Katsura, K. Maruyama, Y. Narusaka, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki (2006). Transcriptional regulation of ABI3-and ABA-

- responsive genes including *RD29B* and *RD29A* in seeds, germinating embryos, and seedlings of *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology*, 60(1), 51-68.
- Niggeweg, R., C. Thurow, R. Weigel, U. Pfitzner, C. Gatz (2000). Tobacco TGA factors differ with respect to interaction with NPR1, activation potential and DNA-binding properties. *Plant Molecular Biology*, 42(5), 775-788.
- Nolan, K. E., R. R. Irwanto and R. J. Rose (2003). Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology*, 133(1), 218-230.
- Nolan, K. E., Saeed, N. A., Rose, R. J. (2006). The stress kinase gene *MtSERK1* in *Medicago truncatula* with particular reference to somatic embryogenesis. *Plant Cell Reports*, 25(7), 711-722.
- Nolan, K. E., S. Kurdyukov y R. J. Rose (2009). Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1759-1771.
- Nole-Wilson, S., B. A. Krizek (2000). DNA binding properties of the *Arabidopsis* floral development protein AINTEGUMENTA. *Nucleic Acids Research*, 28(21), 4076-4082.
- Ogawa, M., A. Hanada, Y. Yamauchi, A. Kuwahara, Y. Kamiya, S. Yamaguchi (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell*, 15(7), 1591-1604.
- Pandey, D. K. and B. Chaudhary (2014). Role of plant somatic embryogenesis receptor kinases (SERKs) in cell-to-embryo transitional activity: key at novel assorted structural subunits. *American Journal of Plant Sciences*, 5(21), 3177.
- Park, H. C., M. L. Kim, Y. H. Kang, J. M. Jeon, J. H. Yoo, M. C. Kim, C. Y. Park, J. C. Jeong, B. C. Moon, J. H. Lee, H. W. Yoon, S. H. Lee, W. S. Chung, C. O. Lim, S. Y. Lee, J. C. Hong, M. J. Cho (2004). Pathogen-and NaCl-induced expression of the

- SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiology*, 135(4), 2150-2161.
- Peng, F, Y. and R. J. Weselake (2011). Gene coexpression clusters and putative regulatory elements underlying seed storage reserve accumulation in *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, 12(1), 286.
- Pérez-Pascual, D., D. Jiménez-Guillen, H. Villanueva-Alonzo, R. Souza-Perera, G. Godoy-Hernández, J. J. Zúñiga-Aguilar (2018). Ectopic expression of the *Coffea canephora* SERK1 homolog-induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis. *Physiologia Plantarum*.
- Pérez-Pascual, D. (2013). Aislamiento del ADNc de SERK1 de *Coffea canephora* L. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. México. pp. 45-57.
- Petitot, A. S., C. Barsalobres-Cavallari, D. Ramiro, E. A. Freire, H. Etienne, D. Fernandez (2013). Promoter analysis of the *WRKY* transcription factors *CaWRKY1a* and *CaWRKY1b* homoeologous genes in coffee (*Coffea arabica*). *Plant Cell Reports*, 32(8), 1263-1276.
- Piechulla, B., N. Merforth, B. Rudolph (1998). Identification of tomato Lhc promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology*, 38(4), 655-662.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos, V., M., Loyola-Vargas (2006a). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 285-301.
- Quiroz-Figueroa F., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2006b). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant tissue culture protocols 2nd edition, Serie: Methods in molecular biology*, vol. 318, Loyola Vargas V. M. y Vázquez-Flota F. (eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, EEUU, pp. 111- 117.

- Quiroz-Figueroa, F. R., C.F.J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20(12), 1141-1149.
- Reyes, J. C., M. I. Muro-Pastor, F. J. Florencio (2004). The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 134(4), 1718-1732.
- Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventiv embryonen an Gewebe kulturen aus Karotten. *Planta*, 53(4), 318-333.
- Rieping, M., F. Schöffl (1992). Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhanced expression of chimaeric heat shock genes in transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics*, 231(2), 226-232.
- Ross, E. J., J. M. Stone, C. G. Elowsky, R. Arredondo-Peter, R. V. Klucas, G. Sarath (2004). Activation of the *Oryza sativa* non-symbiotic haemoglobin-2 promoter by the cytokinin-regulated transcription factor, ARR1. *Journal of Experimental Botany*, 55(403), 1721-1731.
- Rushton, P. J., A. Reinstädler, V. Lipka, B. Lippok, I. E. Somssich (2002). Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling. *Plant Cell* 14(4), 749-762.
- Rushton, P. J., J. T. Torres, M. Parniske, P. Wernert, K. Hahlbrock, I. E. Somssich (1996). Interaction of elicitor-induced DNA-binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley *PR1* genes. *The EMBO Journal*, 15(20), 5690.
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, T. C. Lin, C. C. Chen, and H. S. Tsay (2000). Cytokinin induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae) a medicinal plant. *Plant Science*, 160(1), 139–147.
- Salaj, J., I. R. von Recklinghausen, V. Hecht, S. C. de Vries, J. H. Schel, A. A. van Lammeren (2008). AtSERK1 expression precedes and coincides with early somatic

- embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(7), 709-714.
- Savona, M., R. Mattioli, S. Nigro, G. Falasca, F. DellaRovere, P. Costantino, M. M. Altamura, (2012). Two *SERK* genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 471-488.
- Sakai, H., T. Aoyama, A. Oka (2000). *Arabidopsis* ARR1 and ARR2 response regulators operate as transcriptional activators. *The Plant Journal*, 24(6), 703-711.
- Severino, F. E., M. Brandalise, C. S. Costa, S. R. Wilcken, M. P. Maluf, W. Goncalves, I. G. Maia (2012). *CaPrx*, a *Coffea arabica* gene encoding a putative class III peroxidase induced by root-knot nematode infection. *Plant Science*, 191,192, 35–42.
- Singla, B., J. P. Khurana (2008). Characterization of three somatic embryogenesis receptor kinase genes from wheat, *Triticum aestivum*. *Plant Cell Reports*, 27(5), 833-843.
- Simpson S. D., K. Nakashima, Y. Narusaka, M. Seki, K. Shinozaki, Y K. amaguchi-Shinozaki (2003). Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal*, 33(2), 259-270.
- Somleva, M. N., E. D. L. Schmidt, and S. C. de Vries, (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by *SERK* expression. *Plant Cell Reports*, 19(7), 718-726.
- Sharma, S. K., S. Millam, I. Hein y G. J. Bryan (2008). Cloning and molecular characterisation of a potato *SERK* gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta*, 228(2), 319-330.
- Shen, Q., T. H. Ho (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel *cis*-acting element. *Plant Cell*, 7(3), 295-307.
- Shah, K., T. W. Gadella Jr, H. van Erp, V. Hecht y S. C. de Vries (2001a). Subcellular

- localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. *Journal of Molecular Biology*, 309(3), 641-655.
- Shah, K., J. Vervoort y S. C. de Vries (2001b). Role of threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41263-41269.
- Sharp, W. R., M. R. Sondhal, L. S. Caldas and G. B. Maraffa (1980). The physiological of in vitro asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews*, 2, 268-310.
- Shirsat, A., N. Wilford, R. Croy, D. Boulter (1989). Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco. *Molecular and General Genetics*, 215(2), 326-331.
- Schmidt, E. D., F. Guzzo, M. A. Toonen y S. C. de Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124(10), 2049-2062.
- Stasolla, C., M. F. Belmonte, L. van Zyl, D. L. Craig, W. Liu, E. C. Yeung y R. R. Sederoff (2004). The effect of reduced glutathione on morphology and gene expression of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Journal of Experimental Botany*, 55(397), 695-709.
- Stone, S. L., L. W. Kwong, K. M. Yee, J. Pelletier, L. Lepiniec, R. L. Fischer, R. B. Goldberg, J. J. Harada (2001). *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11806-11811.
- Steffen, A., and A. Theologis (1996). Early genes and auxin action. *Plant Physiology*, 111(1), 9.
- Steffen A., M. D. Nguyen, A. Theologis (1995). ThePS-IAA4/5-like Family of Early Auxin-inducible mRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Biology*, 251(4), 533-549.
- Steward, F. C., M. O. Mapes y K. Mears (1958). Growth and organized development of

- cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705-708.
- Tang, W., S. E. Perry (2003). Binding site selection for the plant MADS domain protein AGL15 an in vitro and in vivo study. *Journal of Biological Chemistry*, 278(30), 28154-28159.
- Tapia, G., I., Verdugo, M. Yañez, I. Ahumada, C. Theoduloz, C. Cordero, F. Poblete, E. González, S. Ruiz-Lara (2005). Involvement of ethylene in stress-induced expression of the *TLC1.1* retrotransposon from *Lycopersicon chilense* Dun. *Plant Physiology*, 138(4), 2075-2086.
- Teakle, G. R., I. W. Manfield, J. F. Graham, P. M. Gilmartin (2002). *Arabidopsis thaliana* GATA factors: organisation, expression and DNA-binding characteristics. *Plant Molecular Biology*, 50(1), 43-56.
- Theologis, A. (1986). Rapid gene regulation by auxin. *Annual Review of Plant Physiology*, 37(1), 407-438.
- Thomas, C., D. Meyer, C. Himber, A. Steinmetz (2004). Spatial expression of a sunflower *SERK* gene during induction of somatic embryogenesis and shoot organogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42(1), 35-42.
- Thakare, D., W. Tang, K. Hill, S. E. Perry (2008). The MADS-domain transcriptional regulator AGAMOUS-LIKE15 promotes somatic embryo development in *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology*, 146(4), 1663-1672.
- Ulmasov, T., J. Murfett, G. Hagen, T. J. Guilfoyle (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9(11), 1963-1971.
- Villanueva-Alonzo, H. J. (2006). Aspectos bioquímicos y moleculares en el inicio de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. Tesis de maestría en ciencias y biotecnología de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. México. pp. 69-78.

-
- Villain, P., R. Mache, D. X. Zhou (1996). The mechanism of GT element-mediated cell type-specific transcriptional control. *Journal of Biological Chemistry* 271(51), 32593-32598.
- Vogel, G. (2005). How does a single somatic cell become a whole plant. *Science*, 309 (5731), 86-86.
- von Arnold, S. V., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. H. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249.
- Vieweg, M. F., M. Frühling, H. J. Quandt, U. Heim, H. Bäumlein, A. Pühler, H. Küster, A. M. Perlick (2004). The promoter of the *Vicia faba* L. leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 17(1), 62-69.
- Wang, X. D., K. E. Nolan, R. R. Irwanto, M. B. Sheahan, R. J. Rose (2011). Ontogeny of embryogenic callus in *Medicago truncatula*: the fate of the pluripotent and totipotent stem cells. *Annals of Botany*, 107(4), 599-609.
- Wang, Z. Y., D. Kenigsbuch, L. Sun, E. Harel, M. S. Ong, E. M. Tobin (1997). A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an *Arabidopsis* *Lhcb* gene. *Plant Cell* 9(4), 491-507.
- Weirauch, M. T., A. Yang, M. Albu, A. G. Cote, A. Montenegro-Montero, P. Drewe, H. S. Najafabadi, S. A. Lambert, I. Mann, K. Cook, H. Zheng, A. Goity, H. V. Bakel, J. C. Lozano, M. Galli, M. G. Lewsey, E. Huang, T. Mukherjee, X. Chen, J. S. Reece-Hoyes, S. Govindarajan, G. Shaulsky, A. J. M. Walhout, F. Y. Bouget, G. Ratsch, L. F. Larrondo, J. R. Ecker, T. R. Hughes (2014). Determination and inference of eukaryotic transcription factor sequence specificity. *Plant Cell*, 158(6), 1431-1443.
- West, M. A., K. M. Yee, J. Danao, J. L. Zimmerman, R. L. Fischer, R. B. Goldberg y J. J. Harada (1994). *LEAFY COTYLEDON1* is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 6(12), 1731-1745.

- Wu, C. Y., H. Washida, Y. Onodera, K. Harada, F. Takaiwa (2000). Quantitative nature of the prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal *cis*-element requirements for endosperm-specific gene expression. *The Plant Journal*, 23(3), 415-421.
- Xie, Z., Z. L. Zhan, X. Zou, J. Huang, P. Ruas, D. Thompson, Q. J. Shen (2005). Annotations and functional analyses of the rice *WRKY* gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology*, 137(1), 176-189.
- Yang, X., X. Zhang, D. Yuan, F. Jin, Y. Zhang y J. Xu (2012). Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biology*, 12(1), 110.
- Yanagisawa, S. (2000). Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *The Plant Journal*, 21(3), 281-288.
- Yanagisawa, S. (2001). The transcriptional activation domain of the plant-specific Dof1 factor functions in plant, animal, and yeast cells. *Plant Cell Physiology*, 42(8), 813-822.
- Yeung, E. C. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe T.A. (eds). *In Vitro Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 20. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 205-247.
- Yu D., C. Chen, Z. Chen (2001). Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPR1* gene expression. *Plant Cell* 13(7), 1527-1540.
- Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5(10), 1411-1423.
- Zuo, J. R., Q. W. Niu, G. Frugis, N. H. Chua (2002). The *WUSCHEL* gene promotes

vegetative to embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30 (3), 349-359.

Zhang, Z. L., Z. Xie, X. Zou, J. Casaretto, T. H. D. Ho, Q. J. Shen, (2004). A rice *WRKY* gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, 134(4),1500-1513.

Zuo, J., Q. W. Niu, G. Frugis, N. H. Chua (2002) The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30(3),349-359.

Zheng, Y., N. Ren, H. Wang, A. J. Stromberg y S. E. Perry (2009). Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *The Plant Cell*, 21(9), 2563-2577.

Zhu, C., S. E. Perry (2005). Control of expression and autoregulation of AGL15, a member of the MADS-box family. *The Plant Journal*, 41(4), 583-594.