



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Análisis de la expresión de los ARF y Aux/IAA
durante la inducción de la embriogénesis somática
en *Coffea canephora***

Tesis que presenta

ANA ODETTA QUINTANA ESCOBAR

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2019

*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 Ana Odeth Quintana Escobar titulado Análisis de la expresión de los ARF y Aux/IAA durante la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* fue realizado en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en el laboratorio No. 24 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dra. Clelia De la Peña Seaman
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, marzo de 2019.

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

Firma: _____

Ana Odetth Quintana Escobar

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 del proyecto titulado MODIFICACIÓN DEL GENOMA DE PLANTAS SUPERIORES USANDO CRISPR/CAS9 PARA ESTUDIAR LA DIFERENCIACIÓN CELULAR, número 1515, financiado por el CONACyT, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por abrirme las puertas para realizar el posgrado.

Al CONACyT por la beca otorgada (número 799390) a través del proyecto Fronteras de la Ciencia número 1515.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por aceptarme como parte de su grupo de investigación y brindarnos las herramientas necesarias para desempeñar nuestros proyectos. Por sus consejos y conocimientos valiosos para la vida académica, profesional y personal.

A la maestra Rosa María Galáz Ávalos, por su apoyo técnico e incluso emocional. Por la paciencia, por los consejos, por las pláticas; por siempre estar al pendiente de nosotros, no sólo como estudiantes.

Al Dr. Daniel Guzmán Zapata, por su disposición para aclarar mis dudas y enseñarme cosas nuevas, por su actitud siempre optimista, por los momentos de diversión, por su paciencia y por su amistad.

A la Dra. Elsa Góngora Castillo, por ser parte fundamental en mi aprendizaje del manejo de técnicas bioinformáticas, por su paciencia, y sobre todo disponibilidad de tiempo.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Stefan De Folter y Dr. Geovanny Nic Can, por sus consejos para mejorar el trabajo de investigación.

A mis compañeros del laboratorio 24, por los buenos momentos compartidos, por el aprendizaje e intercambio de ideas.

A mis padres y familia por impulsarme a seguir mi crecimiento personal y profesional.

Al Dr. Leobardo Iracheta Donjuan, por su enseñanza, apoyo y consejos hasta el día de hoy.

DEDICATORIAS

A Dios; sé que guías mis pasos.

A mis padres, Juan Jaime y Ana Olivia y hermana Mariam, porque no ha sido fácil la distancia y la ausencia en las fechas importantes. Papá, me has dado más de lo que puedas imaginar; tú que ayudas a todos sin pedir nada a cambio, gracias por enseñarme el valor de la responsabilidad y el trabajo duro, por enseñarme que la honestidad, ética y disciplina no se compran con nada. Gracias por tu arduo trabajo por años para que no nos faltara nada, por darnos incluso más de lo que necesitamos. Mamá, sabes que cualquier éxito que pueda tener en la vida te lo debo a ti, porque desde pequeña me inculcaste la dedicación al estudio y trabajo duro; por todo tu tiempo y tu preocupación constante. Por ser una madre ejemplar que daría todo por sus hijas. Mariam, eres mi amiga y compañera de vida, también mi dolor de cabeza; quiero verte cumplir todos tus sueños. Los amo por sobre todas las cosas y saben que son el motor que me impulsa a continuar mejorando día a día.

A mis abuelos. Mamá Oli, mi ángel más grande en el cielo, mi amor eterno, mi mayor ejemplo de vida; qué no daría por verte celebrando mis triunfos junto conmigo, por compartir más risas, viajes e historias; a ti, por ser lo más cercano a la perfección. A papá Nayo por su apoyo en todos los sentidos desde que tengo memoria, por siempre consentirme; por ser el ejemplo vivo de la superación, responsabilidad, honestidad y éxito. A mamá Hilda, por la nobleza de su corazón, por las pláticas siempre divertidas y por el cariño incondicional que nos tiene a todos sus nietos.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| CAPÍTULO I..... | 3 |
| ANTECEDENTES..... | 3 |
| 1.1. CAFÉ: GENERALIDADES Y CULTIVO | 3 |
| 1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA..... | 4 |
| 1.3. REGULADORES DEL CRECIMIENTO | 6 |
| 1.4. AUXINAS..... | 7 |
| 1.5. PAPEL DE LAS AUXINAS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>C. CANEPHORA</i> . | 9 |
| 1.6. METABOLISMO DE LAS AUXINAS | 10 |
| 1.7. TRANSPORTE, PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DE AUXINA..... | 12 |
| 1.8. VISUALIZACIÓN DE LA AUXINA..... | 17 |
| 1.9. APLICACIÓN DE LA BIOINFORMÁTICA PARA EL ESTUDIO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA | 21 |
| 1.10. JUSTIFICACIÓN..... | 24 |
| 1.11. OBJETIVO GENERAL..... | 25 |
| 1.12. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 25 |
| 1.13. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN..... | 25 |
| 1.14. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL | 26 |
| CAPÍTULO II..... | 27 |
| ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARF Y AUX/IAA DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA | |

| | |
|---|----|
| EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>COFFEA CANEPHORA</i> | 27 |
| 2.1. INTRODUCCIÓN..... | 27 |
| 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| 2.2.1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>C. CANEPHORA</i> | 28 |
| 2.2.2. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE BIBLIOTECAS SECUENCIADAS DEL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>C. CANEPHORA</i> | 29 |
| 2.2.3. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN RELATIVA DE GENES ARF Y AUX/IAA DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>C. CANEPHORA</i> | 30 |
| 2.2.4. CLONACIÓN DE REPORTERO SINTÉTICO DR5V2 EN <i>ESCHERICHIA COLI</i> | 30 |
| 2.2.5. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. CANEPHORA</i> ... | 32 |
| 2.2.6. TRANSFORMACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. CANEPHORA</i> POR PERLAS DE VIDRIO..... | 34 |
| 2.2.7. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE SUSPENSIONES CELULARES | 34 |
| 2.3. RESULTADOS..... | 35 |
| 2.3.1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA | 35 |
| 2.3.2. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE <i>C. CANEPHORA</i> | 36 |
| 2.3.3. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE <i>C. CANEPHORA</i> ... | 50 |
| 2.3.4. TRANSFORMACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES | 52 |
| 2.3.5. OBTENCIÓN DE PROTOPLASTOS A PARTIR DE SUSPENSIONES CELULARES | 57 |
| 2.4. DISCUSIÓN..... | 58 |
| CAPÍTULO III..... | 65 |

| | |
|--------------------------------------|----|
| 3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 65 |
| 3.1. CONCLUSIONES | 65 |
| 3.2. PERSPECTIVAS..... | 66 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 66 |

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1. Auxinas naturales. A) Ácido indol-3-acético/AIA, B) ácido indol-3-butírico/AIB, C) ácido 4-cloroindolacético/4-Cl-AIA, D) ácido fenilacético/AFA..... 8

Figura 1.2. Análogos sintéticos de auxinas. A) Ácido 1-naftalenacético/ANA, B) ácido 2,4-diclorofenoxiacético/2,4-D, C) ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético/2,4,5-T, D) ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico/dicamba y E) ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico/picloram..... 9

Figura 1.3. Ruta de biosíntesis *de novo*. Las flechas sólidas indican los genes que han sido identificados y producen las enzimas responsables de catalizar los pasos de la biosíntesis en plantas o microorganismos. Las flechas punteadas indican pasos sugeridos, pues los genes no han sido determinados en su totalidad. IAOx: indol-3-acetaldoxima; IPA: indol-3-piruvato; IAM: indol-3-acetamida; IAN: indol-3-acetonitrilo; TAM: triptamina. (Zhao, 2010). 11

Figura 1.4. Transporte celular de las auxinas. El esquema muestra la compartimentalización y organización de las proteínas involucradas en el transporte, recepción y señalización (Sauer et al., 2013)..... 13

Figura 1.5. Componentes que intervienen en la percepción y señalización de las auxinas, así como en la regulación transcripcional. A) Mecanismo de activación de la transcripción cuando los niveles de auxina son altos; ubiquitinación de Aux/IAA y degradación por el proteasoma 26S. B) Mecanismo de represión de la transcripción cuando los niveles de auxina son bajos, co-represión de Aux/IAA con proteínas TPL..... 17

Figura 1.6. Doble reportero DR5v2-ntdTomato–DR5-n3GFP. Nueve repeticiones de TGTCTC (DR5) o TGTCGG (DR5v2) se colocan en orientación inversa río arriba de un promotor mínimo, ya sea 3xEGFP nuclear o tandem nuclear Tomato (ntdTomato). LB/RB: borde izquierdo/derecho. DHFR: gen de resistencia a metotrexato (Liao et al., 2015) (<https://www.addgene.org/61628/>)..... 20

Figura 1.7. pSOUP, plásmido ayudador que proporciona funciones de replicación en *trans* para plásmidos pGREEN en células de *Agrobacterium* (Smedley y Harwood, 2015) (http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pSoup/). 20

| | |
|---|----|
| Figura 1.8. Diagrama general de la estrategia experimental. | 26 |
| Figura 2.1. Proceso de inducción de embriogénesis somática en <i>C. canephora</i> . A) Plántula en etapa de pre-acondicionamiento en medio MS adicionado con 0.54 μ M ANA y 2.32 μ M KIN por 14 d previos a la inducción. B) Explante inicial colocado en el medio líquido de inducción, con sales de Yasuda (1985) suplementado con 5 μ M BA. C-G) Explantes después de 1, 7, 14, 21 y 56 d después de la inducción. H-I) Embriones en la etapa de germinación. J) Plántulas completas, regeneradas a partir de embriones somáticos. | 36 |
| Figura 2.2. Análisis de correlación de Pearson entre réplicas de cada día de muestreo. | 40 |
| Figura 2.3. Mapa de calor con perfiles de expresión global de genes durante las diferentes condiciones de muestreo de la ES, agrupado por genes. | 41 |
| Figura 2.4. Perfil de expresión de genes implicados en la señalización del AIA. A) Auxin Response Factor (ARF). B) Aux/IAA. (Flechas indican los genes seleccionados para cuantificación por qPCR). | 42 |
| Figura 2.5. A) Número de genes diferencialmente expresados (GDE) comparados contra el día 14 dai como testigo. B) Genes regulados a la alta (up-regulated, LFC>0) y a la baja (down-regulated, LFC<0). | 44 |
| Figura 2.6. Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados (GDE) en cada una de las condiciones. Las regiones traslapadas corresponden al número de GDE compartidos entre cada punto del proceso de inducción de la ES. La parte central muestra los GDE durante todo proceso de ES. | 45 |
| Figura 2.7. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la evaluación de las dos temperaturas de amplificación para los cebadores sintetizados. | 48 |
| Figura 2.8. Nivel de expresión relativa de ARF y Aux/IAA, relacionados a la señalización de auxinas durante la inducción de ES en <i>C. canephora</i> | 49 |
| Figura 2.9. Inducción de las suspensiones celulares de <i>C. canephora</i> . A) Explantes foliares de <i>C. canephora</i> con callo a los 21 d. B) Callo friable inoculado en medio líquido. | |

C) Suspensiones celulares a los 28 d. 50

Figura 2.10. Parámetros de crecimiento celular evaluados en suspensiones celulares de *C. canephora*: A) Peso fresco y peso seco, B) paquete celular y conductividad, y C) viabilidad..... 52

Figura 2.11. Proceso de transformación de suspensiones celulares. A) Suspensiones celulares de *C. canephora*. B) Filtración de suspensiones celulares. C) Suspensiones celulares, perlas de vidrio y plásmido sometidos a agitación en vortex. 53

Figura 2.12. Imágenes de microscopía confocal obtenidas un día después de la transformación de suspensiones celulares con DR5v2. En las columnas se muestra el campo claro (I), tinción de núcleos con DAPI (II), las dos señales proporcionadas por el plásmido: 3eGFP (III) y ndtTomato (IV). A) Testigo. B) Suspensiones sometidas a agitación por 20 s y C) 40 s. Las flechas indican la presencia de la señal del 3eGFP y del ndtTomato. 55

Figura 2.13. Evaluación del daño ocasionado por las perlas de vidrio sobre las suspensiones celulares, sometidas a diferentes tiempos de agitación. A) 30 s. B) 60 s. C) 90 s. D) 120 s. 56

Figura 2.14. Imágenes de microscopía confocal obtenidas 28 días después de la transformación de las suspensiones celulares de *C. canephora* con DR5v2. En las columnas se muestra el campo claro (I), tinción de núcleos con DAPI (II), las dos señales proporcionadas por el plásmido: 3eGFP (III) y ndtTomato (IV), y la superposición de las anteriores (V). A) Testigo. B-D) Diferentes muestras de suspensiones transformadas. ... 56

Figura 2.15. Proceso de obtención de los protoplastos. A) 2.5 mL de paquete celular de suspensiones celulares. B) Digestión enzimática. C) Muestra a las 2 h de digestión, antes de la filtración (750,000 protoplastos mL⁻¹). D) Filtración en malla de 100 µm (690,000 protoplastos mL⁻¹). E) Muestra filtrada y centrifugada; en la pastilla se concentran los protoplastos. F) Muestra de sobrenadante. G) Muestra de la pastilla de protoplastos resuspendida en el medio de cultivo (510,000 protoplastos mL⁻¹). H) Acercamiento..... 58

LISTADO DE CUADROS

| | |
|--|----|
| Cuadro 1. Resumen del procesamiento y alineamiento de lecturas secuenciadas del transcriptoma de <i>C. canephora</i> | 38 |
| Cuadro 2. Ejemplo de matriz de datos de conteo de lecturas alineadas a cada gen, generada con el programa HTSeq-count. | 39 |
| Cuadro 3. Genes diferencialmente expresados durante la inducción de ES, pertenecientes a familias de interés relacionadas a auxina..... | 46 |
| Cuadro 4. Lista de cebadores diseñados por cada gen de interés para qPCR y tamaño del producto amplificado. | 47 |

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| 2,4,5-T | Ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético |
| 2,4-D | Ácido 2,4-diclorofenoxiacético |
| 4-Cl-AIA | Ácido 4-cloroindolacético |
| ABA | Ácido abscísico |
| ABC | ATP-binding cassette |
| ABP1 | Auxin Binding Protein 1 |
| ADNc | ADN complementario |
| AFA | Ácido fenilacético |
| AIA | Ácido indol-3-acético |
| AIB | Ácido indol-3-butírico |
| ANA | Ácido naftalenacético |
| ARF | Auxin Response Factor |
| Aux/IAA | Auxin/Indole-3-acetic acid |
| AuxRE | Auxin-response element |
| BA | Benciladenina |
| BBM | Baby Boom |
| BHT | Butil hidroxitolueno (2,6-di-tert-butil-4-metilfenol) |
| ES | Embriogénesis somática |
| GA | Ácido giberélico |
| GH3 | Gretchen Hagen 3 |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta resolución |
| IAM | Indol-3-acetamida |
| IAN | Indol-3-acetonitrilo |
| IAOx | Indol-3-acetaldoxima |
| IPA | Indol-3-piruvato |
| KIN | Kinetina |
| LEC | Leafy Cotyledons |
| NGS | Next generation sequencing |
| OxAIA | 2-oxindol-3-acético |

| | |
|-----------------|---|
| PEG | Polietilenglicol |
| PF | Peso fresco |
| PGPs | Fosfoglucoproteínas |
| RC | Reguladores del crecimiento |
| RPM | Revoluciones por minuto |
| SERK | Somatic embryogenesis receptor kinase |
| SKP2A | S-Phase Kinase-Associated Protein 2A |
| TAA | Triptofano aminotransferasa de Arabidopsis |
| TAM | Triptamina |
| TIR1/AFB | Transport Inhibitor Resistant 1/Auxin signaling F-Box |
| TPL | Proteína Topless |
| YUCCA | Flavín monooxigenasas |

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) representa una herramienta biotecnológica eficaz para estudiar los procesos morfo-fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante el desarrollo de *Coffea canephora*, en el cual, los reguladores del crecimiento (RC) vegetal juegan un papel primordial en la diferenciación celular. Dentro de ellos, el ácido indol-3-acético (AIA), la auxina natural más abundante, tiene un papel fundamental en los procesos de desarrollo de las plantas, por lo que comprender el mecanismo molecular con que actúa beneficiaría al mejoramiento del cultivo. La señalización del AIA es un aspecto fundamental para que se lleve a cabo la transición embriogénica en las células somáticas de plantas y unos de los componentes principales en este mecanismo son los genes Auxin Response Factor (ARF) y los Auxin/Indole-3-acetic acid (Aux/IAA), los cuales pueden activar o reprimir la expresión de genes responsivos a la auxina. El creciente desarrollo de las tecnologías de secuenciación de nueva generación, así como de herramientas bioinformáticas, ha permitido ampliar el panorama de estudio en la ES de diversas especies vegetales e identificar los genes implicados directamente. En el presente trabajo se realiza el análisis transcriptómico del genoma de café, y la identificación de algunos genes diferencialmente expresados durante las diferentes etapas del proceso de inducción de la ES en *C. canephora*.

ABSTRACT

The somatic embryogenesis (SE) process represents a useful biotechnological tool to study the morpho-physiological, biochemical and molecular processes that take place during the development of *Coffea canephora*, in which plant growth regulators play a key role in cell differentiation. Among them, the indol-3-acetic acid (IAA), the most abundant natural auxin, has a fundamental role in the development processes of plants; so, understanding the molecular mechanism with which it acts would benefit the improvement of the crop. The IAA signaling is a fundamental aspect for carrying out the embryogenic transition in the somatic cells of plants, and some of the main components in this mechanism are the Auxin Response Factor (ARF) and Auxin/Indole-3-acetic acid (Aux/IAA) genes, which can activate or repress the expression of genes responsive to the auxins. The growing development of new generation sequencing technologies, as well as bioinformatics tools, has allowed us to broaden the scope of the SE study of different plant species and to identify the genes directly involved in it. In this work, transcriptomic analysis of the coffee genome and the identification of some genes differentially expressed during the different stages of the process of induction of the SE in *C. canephora* were carried out.

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los cultivos más importantes tanto a nivel nacional, como internacional, por lo que se han realizado investigaciones encaminadas a generar conocimiento para su mejoramiento genético, para lo cual, técnicas biotecnológicas como el cultivo de tejidos vegetales representan una alternativa rentable. En este sentido, la embriogénesis somática (ES) se ha posicionado como una de las herramientas más utilizadas para llevar a cabo el estudio de procesos biológicos en diversos cultivos por todas las ventajas que ofrece.

Para promover diferentes respuestas en el cultivo *in vitro* se ha recurrido a la manipulación de los componentes del medio de cultivo, principalmente de los RC vegetal. Estos son capaces de generar una señalización entre células, tejidos y/u órganos en la planta y desencadenar una serie de cambios morfo-fisiológicos. Los reguladores más estudiados son las auxinas y citocininas, dentro de las cuales, la auxina más abundante de manera natural es el ácido indol-3-acético (AIA).

El paso más importante para que se lleve a cabo la ES es la percepción de la auxina y señalización de la misma, con lo que se desencadenan una serie de reacciones y cambios moleculares que conllevan a modificar el programa genético de una célula somática para convertirse en embrión.

Con la ayuda de las nuevas herramientas bioinformáticas ha sido posible identificar un gran número de genes implicados en este proceso en diversas especies vegetales, dentro de los cuales, los Auxin Response Factor (ARF) y los Auxin/Indole-3-acetic acid (Aux/IAA) tienen una participación fundamental.

A pesar de que la información acerca de estos genes aún es escasa, se ha demostrado que participan en diversos procesos del desarrollo vegetal y que los cambios en su expresión pueden diferir de una especie a otra.

Dada la importancia del café y de la ES, obtener información sobre la participación de los ARF y Aux/IAA durante la inducción permitiría ampliar los conocimientos del mecanismo regulatorio y a futuro, incrementar las posibilidades de controlar el crecimiento y desarrollo de las plantas, en beneficio de la agricultura.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. CAFÉ: GENERALIDADES Y CULTIVO

El café es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, y México es uno de los principales países productores, de hecho, es el quinto productor mundial de café. Es cultivado en más de 80 países, en alrededor de 11 millones de hectáreas en África, Asia y América; con ventas estimadas en 173,000 millones de dólares y la intervención de aproximadamente 100 millones de personas durante su cultivo y manejo. La mayor parte de la producción mundial se localiza en zonas rurales pequeñas, lo cual representa una fuente de ingresos y negocio familiar de millones de personas (Martins et al., 2017; Denoeud et al., 2014; Marraccini et al., 2012).

El género *Coffea* está compuesto por más de 127 especies de árboles leñosos perennes que difieren en su tamaño, morfología y condiciones de adaptación. De todas las especies de este género, *Coffea arabica* y *C. canephora*, son las más cultivadas pues predominan en el comercio mundial del café con 70 y 30% de la producción, respectivamente (Nic-Can y De-la-Peña, 2014).

C. canephora ($2n = 2x = 22$ cromosomas) es una especie diploide alógama altamente heterocigótica. Es uno de los padres de *C. arabica* ($2n = 4x = 44$ cromosomas), que se derivó de la hibridación entre *C. canephora* y *C. eugenioides*. Es más ampliamente cultivada, vigorosa y productiva que la arabica; además de ser más resistente a plagas y enfermedades. Se desarrolla en zonas con temperaturas que varían desde los 22 a los 30 °C, altitud de 800 msnm y bajo regímenes de precipitación de 1,200 a 2,000 mm anuales; sin embargo, requieren de un periodo corto de sequía para estimular la floración (Denoeud et al., 2014; DaMatta y Ramalho, 2006).

Al ser un cultivo altamente importante a nivel mundial, el café ha sido objeto de múltiples investigaciones, la mayoría, encaminadas a generar conocimientos acerca del incremento en la propagación y al mejoramiento genético para aumentar sus cualidades agronómicas como la productividad, calidad del grano, procesos fisicoquímicos, resistencia a factores bióticos y abióticos, entre otros.

La propagación del café por métodos convencionales es un proceso largo que involucra diferentes técnicas para su mejoramiento; sin embargo, son procesos lentos que requieren de más de 30 años para obtener nuevos cultivares, además de tener un alto costo económico (Vinod et al., 2006). *C. canephora* es autoincompatible por ser alógama, por lo que su propagación convencional se realiza por esquejes o injertos (Yasuda et al., 1995). Lo anterior representa una mayor inversión de recursos económicos, de espacio y cantidad de material vegetal inicial.

Las técnicas biotecnológicas, como el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, representan una alternativa efectiva y viable para la propagación y el mejoramiento genético de especies vegetales. El cultivo *in vitro* se describe como el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes, bajo condiciones físicas y químicas controladas (Thorpe, 2012). Esta técnica permite la producción de un gran número de plantas uniformes con características idénticas a la planta madre y libres de enfermedades, en un periodo más corto de tiempo que los métodos convencionales, mediante el cultivo de meristemos, brotes adventicios, yemas axilares, suspensiones celulares y embriogénesis somática (Vinod et al., 2006).

1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática (ES), es un proceso que puede ocurrir tanto en la naturaleza, como en el laboratorio bajo condiciones controladas. Consiste en que las células somáticas, al ser cultivadas en las condiciones adecuadas, dan origen a células embriogénicas, que a su vez, al pasar por procesos morfo-fisiológicos originan embriones somáticos y posteriormente plantas completas.

A diferencia de la embriogénesis cigótica en la que el embrión se encuentra dentro de la semilla dificultando su estudio, la ES permite una fácil manipulación y además se tiene el control de las condiciones de cultivo para el estudio de procesos morfo-fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante el desarrollo de las plantas superiores (Vondráková et al., 2016; Quiroz-Figueroa et al., 2006a).

La ES es empleada con fines biotecnológicos, al ser un sistema eficiente y rápido para la propagación clonal de diversas especies valiosas comercialmente. Por otro lado, es útil como modelo para el estudio de los mecanismos que provocan la formación del embrión

en las semillas de plantas (Wójcikowska y Gaj, 2017).

Se sabe que la ES puede seguir dos rutas: la directa y la indirecta. En la ES directa, los embriones son formados directamente en el explante; por el contrario, en la ES indirecta previamente existe la formación de un conjunto de células indiferenciado llamadas callo, que posteriormente dará lugar a los embriones (Santana-Buzzy et al., 2007; Söndahl et al., 1985). La ES inicia a partir de una célula o de un grupo de células que responden a los estímulos externos, como el medio de cultivo. Estos estímulos desencadenan una serie de reacciones encaminadas a formar una estructura polar (Vondráková et al., 2016) con dos puntos de crecimiento.

Respecto al cafeto, a lo largo de la historia, se han reportado diversos protocolos para su propagación *in vitro*. Staritsky (1970) fue el primero en reportar la micropropagación de tres especies del género *Coffea* a partir de entrenudos de ramas ortotrópicas, de las cuales, únicamente *C. canephora* mostró la formación de embriones y plántulas a partir de callo. Posteriormente, Herman y Haas (1975) lograron inducir ES en *C. arabica* a partir de callos generados de explantes foliares.

Por otro lado, Söndahl y Sharp (1977) publicaron un protocolo de dos fases para la ES a partir de hojas de *C. arabica*, el cual consistía en un medio de cultivo para el acondicionamiento de los explantes y otro para la inducción de la ES. Dublin (1981) reportó el uso de medio de cultivo sin auxinas pero con la adición de citocininas [benciladenina (BA) y kinetina (KIN)] para la inducción de la ES a partir de explantes de hoja en la variedad Arabusta; mientras que Yasuda et al. (1985) obtuvieron callo embriogénico y embriones somáticos a partir de hojas de *C. arabica* mediante la adición únicamente de BA en el medio de cultivo. En estos trabajos y los que derivaron después, la concentración y tipo de regulador del crecimiento añadido al medio de cultivo juega un papel importante (Loyola-Vargas et al., 2016).

Las etapas tempranas de la inducción de la ES han recibido especial atención en la mayoría de las investigaciones, ya que conocer los factores esenciales que cambian el programa genético de una célula, para convertirse en embrión serviría para mejorar los sistemas biotecnológicos de regeneración de plantas de interés particular (Wójcikowska y Gaj, 2017).

El café es uno de los pocos ejemplos en los que se ha hecho uso de la ES con fines comerciales. Así mismo, debido a la importancia mundial del cultivo del café, se ha puesto especial interés en el estudio y generación de datos transcriptómicos del género *Coffea* (Nic-Can y De-la-Peña, 2014), específicamente relacionados con el cambio en el programa genético que permiten que una célula somática se convierta en un embrión.

Por lo anterior, es necesario continuar con las investigaciones para comprender el genoma de café y su biología, con la finalidad de mejorar su cultivo y productividad (Dereeper et al., 2015).

1.3. REGULADORES DEL CRECIMIENTO

La división, diferenciación y elongación de las células cultivadas *in vitro* están determinadas por la condición morfológica y fisiológica del tejido, así como por la composición del medio de cultivo, en particular la presencia de polisacáridos, vitaminas, aminoácidos, y la fuente nitrogenada (Santana-Buzzy et al., 2007; Quiroz-Figueroa et al., 2006a; Quiroz-Figueroa et al., 2006b).

Los RC son compuestos presentes en bajas concentraciones y que actúan desde localmente, cerca o en el sitio de síntesis, hasta en tejidos distantes (Santner et al., 2009). Son capaces de generar una señalización entre células, tejidos y/u órganos en la planta y su información específica depende de la estructura química del regulador, así como de la habilidad de la planta para recibir esa señal e inducir la respuesta fisiológica adecuada (Vondráková et al., 2016). Además, se ha demostrado que los RC son unos de los componentes clave del medio de cultivo para la inducción de la ES (Quiroz-Figueroa et al., 2006b), los procesos organogénicos post-embriogénicos como la formación del vástago, la raíz, actividad meristemática y el desarrollo de la vasculatura (Hurny y Benková, 2017)

La mayoría de estos compuestos han sido estudiados por décadas y en los últimos años ha habido gran avance en cuanto al entendimiento de los mecanismos moleculares de biosíntesis, transporte y respuesta de los mismos. En la actualidad se incluyen dentro del grupo de RC al ácido indol-3-acético (AIA; auxina), citocininas, ácido abscísico (ABA), brasinoesteroides, ácido giberélico (GA), etileno, poliaminas, ácido jasmónico y ácido salicílico (Vondráková et al., 2016; Santner et al., 2009).

Las auxinas y citocininas son los RC más ampliamente utilizados, por su papel en la división y diferenciación celular (Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016). En diversos estudios se han elucidado una serie de procesos que están regulados por el control mutuo de ambos reguladores, como es el caso de la ES; incluso, se ha llegado a caracterizar dicho control como antagonista. Sin embargo, podría decirse que actúan juntos de forma complementaria y no de forma opuesta, para proporcionar robustez al proceso en cuestión y conferir destinos celulares distintos a las células precursoras en estrecha proximidad, produciendo un todo que es mayor que la suma de sus partes (Santner et al., 2009).

Skoog y Miller (1957) realizaron uno de los primeros estudios en los que se reveló que la interacción de auxinas con citocininas tenía un papel fundamental en la diferenciación y morfogénesis de brotes y raíces. Ahora se sabe que el balance entre ambos RC determina el estado de diferenciación o de-diferenciación de las células. En relación con lo anterior, el efecto de los RC en la ES de *C. canephora* fue estudiado por Hatanaka et al. (1995), quienes observaron que el máximo número de embriones se obtiene en un medio de cultivo adicionado con citocinina, mientras que la adición de auxinas inhibió la formación de los mismos.

En resumen, el tratamiento con RC juega un papel fundamental durante la inducción de la ES de una gran variedad de especies vegetales, lo cual ha sido demostrado en alrededor del 80% de los protocolos al utilizar la auxina sola o en combinación con otros RC. De esta manera se sabe que existen mecanismos relacionados con la auxina operando durante la inducción de la ES y, como información complementaria, análisis globales de transcriptomas de ES de diversas especies han demostrado la presencia de genes relacionados con la homeostasis de las auxinas que están siendo transcritos durante este proceso (Wójcikowska y Gaj, 2017).

1.4. AUXINAS

Las auxinas se definen como ácidos orgánicos de baja masa molecular, con un anillo indol y un grupo carboxilo en su estructura. A nivel celular controlan la división y elongación, alterando la plasticidad de la pared celular; también confieren polaridad, dominancia apical y respuesta trópica por acción de la luz o la gravedad. Así mismo,

están involucrados en otros procesos como la respuesta a patógenos, el control de la senescencia, la formación de frutos y la abscisión foliar (Sauer et al., 2013).

Dentro del grupo de las auxinas naturales (Fig. 1.1) se encuentran el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-AIA) y el ácido fenilacético (AFA). El AIA es la auxina natural más abundante en las plantas superiores (Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016; Sauer et al., 2013).

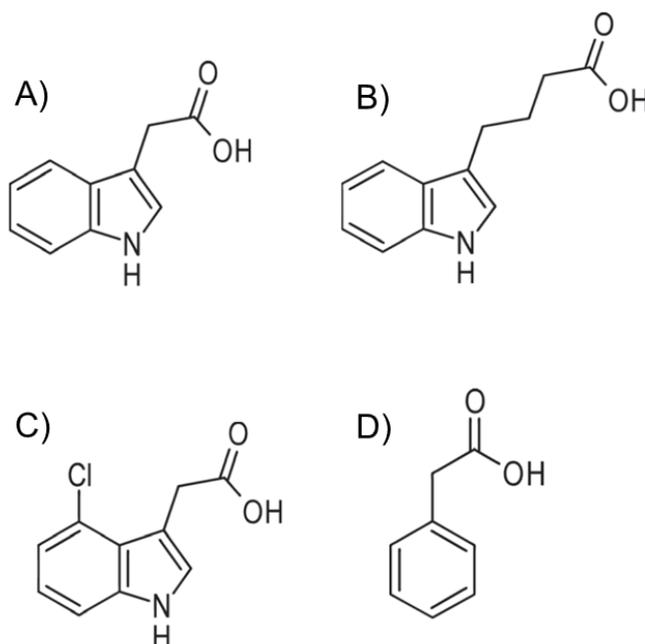


Figura 1.1. Auxinas naturales. A) Ácido indol-3-acético/AIA, B) ácido indol-3-butírico/AIB, C) ácido 4-cloroindolacético/4-Cl-AIA, D) ácido fenilacético/AFA.

A pesar de que hay poca evidencia acerca de la actividad específica que tiene el AIB, se sabe que puede dar lugar a la formación del AIA, y por lo tanto puede representar una forma de almacenamiento. Por el contrario, los ácidos 4-Cl-AIA y AFA son descritos como señales “similares” a auxinas, y no propiamente auxinas; sin embargo, aún no está del todo claro su funcionamiento y su relación con el AIA (Bennett y Leyser, 2014).

Por otro lado, se encuentran los análogos sintéticos (Fig. 1.2), que divergen en la estructura pero comparten una gama de actividades biológicas similares a las auxinas endógenas, como lo son el ácido 1-naftalenacético (ANA), el ácido 2,4-

diclorofenoxiacético (2,4-D), el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016; Sauer et al., 2013).

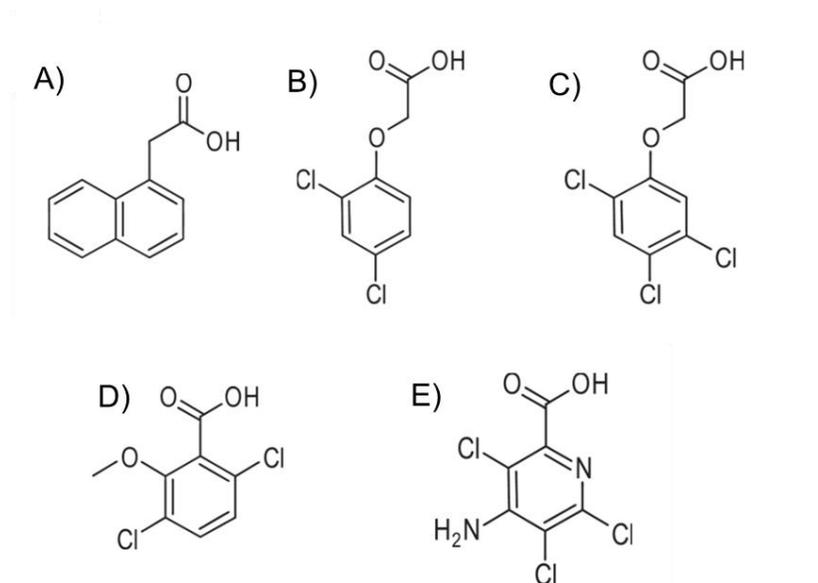


Figura 1.2. Análogos sintéticos de auxinas. A) Ácido 1-naftalenacético/ANA, B) ácido 2,4-diclorofenoxiacético/2,4-D, C) ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético/2,4,5-T, D) ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico/dicamba y E) ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico/picloram.

Existen diversos mecanismos que contribuyen a la homeostasis del AIA, tales como su biosíntesis, degradación, transporte y formación de conjugados. Debido al papel fundamental que tienen durante el desarrollo de la planta y de manera particular en la inducción de la ES, se han realizado múltiples estudios encaminados a elucidar el metabolismo, transporte y señalización de las auxinas (Hagihara et al., 2019; Bhatla, 2018; Ma et al., 2018).

1.5. PAPEL DE LAS AUXINAS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *C. canephora*

Se ha determinado que la presencia de auxinas exógenas promueve la acumulación de las auxinas endógenas (Ayil-Gutiérrez et al., 2013). Este fenómeno es una parte fundamental en la inducción de la ES.

Para la inducción de la ES en *C. canephora*, se ha desarrollado un protocolo que se basa

en el pretratamiento de plántulas cultivadas *in vitro*, en un medio de cultivo adicionado con ANA y KIN por dos semanas. Al cabo de este tiempo, se toman explantes del segundo y tercer par de hojas y se colocan en medio líquido de Yasuda (1985) en presencia de bencialdenina (BA). Durante el pretratamiento de las plántulas, el total de la auxina libre, así como de algunos de sus conjugados aumenta de forma significativa. Los datos de nuestro laboratorio indican que se trata de una biosíntesis *de novo*. La acumulación del AIA se lleva a cabo en los cloroplastos (Márquez-López et al., 2018).

Apenas unas horas después del cambio de los explantes al medio de inducción, el AIA libre disminuye mientras que el conjugado AIA-Ala (alanina) aumenta. Este conjugado puede ser aprovechado por las células posteriormente. En la etapa de inducción, la mayor acumulación del AIA se observa en las células de la periferia del explante. Posteriormente, a los 21 días después de la inducción se aprecia una distribución uniforme del AIA en las primeras estructuras embriogénicas; sin embargo, desde la formación de embriones en la fase globular el AIA se acumula en las células que dan origen a los tejidos primarios (Márquez-López et al., 2018). Estos resultados sugieren que la acumulación de auxina endógena es esencial para el cambio del destino de las células antes de inicio de la ES (Nic-Can y Loyola-Vargas, 2016; Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

1.6. METABOLISMO DE LAS AUXINAS

Las plantas han evolucionado de forma tal que existe una red de control de los niveles de auxina, con una precisión espacial y temporal en respuesta a las condiciones y señales ambientales. El AIA, la auxina natural más abundante, se puede acumular mediante diversas rutas; por biosíntesis *de novo*, por su liberación a partir de conjugados de alanina y de isoleucina, y a partir del AIB por una β -oxidación en los peroxisomas.

Cuando los niveles de AIA deben disminuir, las plantas encienden diversos mecanismos para desactivar la acción de las auxinas. El AIA puede ser rápidamente convertido a su forma inactiva a través de la reacción de su grupo carboxilo con aminoácidos, azúcares y otras moléculas pequeñas. También puede ser convertido a ácido 2-oxindol-3-acético (OxAIA) por oxidación del anillo indol (Schaller et al., 2015; Gao y Zhao, 2014).

La biosíntesis *de novo* del AIA se puede llevar por medio de dos rutas: una triptófano dependiente (al ser este aminoácido un precursor del AIA y de muchos otros metabolitos)

y la otra triptofano independiente. En el primer caso, el triptofano es convertido a indol-3-piruvato por la triptofano aminotransferasa de *Arabidopsis* (TAA; E.C. 2.6.1.99). Posteriormente, el indol-3-piruvato es convertido a AIA por las proteínas flavín monooxigenasas codificada por la familia de genes YUCCA (YUC; 1.14.13.168) (Schaller et al., 2015). El triptofano es precursor del indol-3-piruvato (IPA), la triptamina (TAM), la indol-3-acetaldoxima (IAOx), la indol-3-acetamida (IAM), el indol-3-acetonitrilo (IAN) y el indol-3-acetaldehído (Fig. 1.3) (Gao y Zhao, 2014).

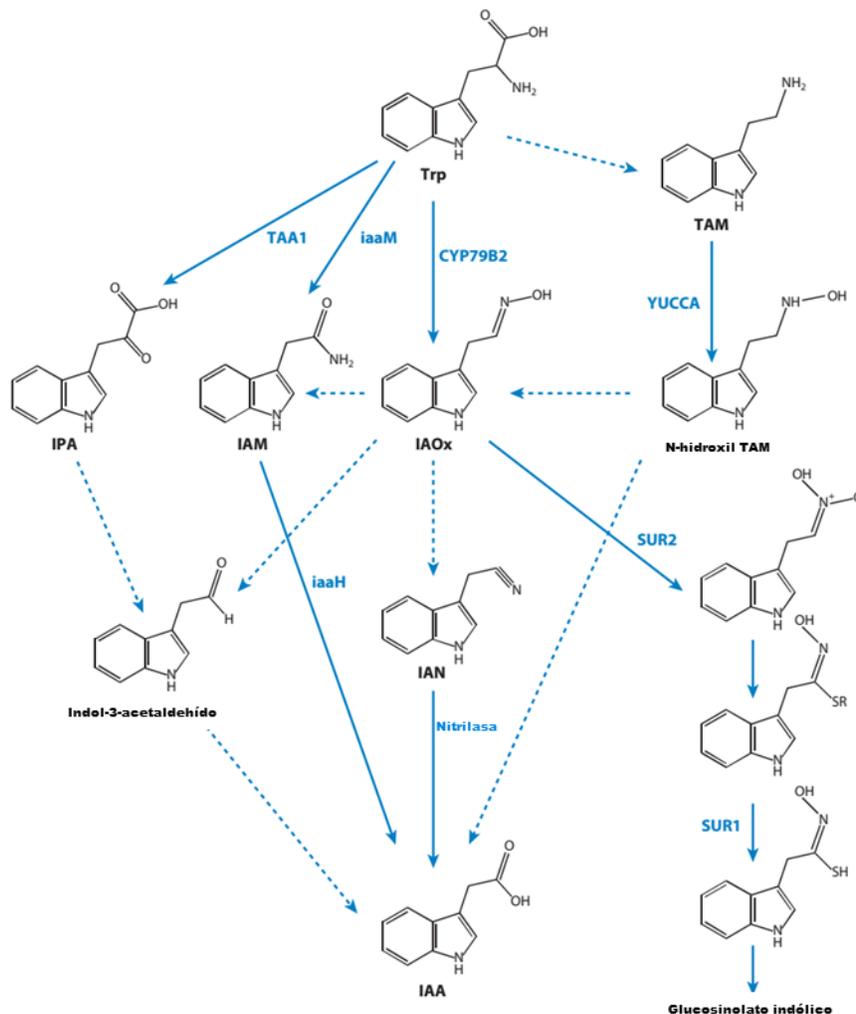


Figura 1.3. Ruta de biosíntesis *de novo*. Las flechas sólidas indican los genes que han sido identificados y producen las enzimas responsables de catalizar los pasos de la biosíntesis en plantas o microorganismos. Las flechas punteadas indican pasos sugeridos, pues los genes no han sido determinados en su totalidad. IAOx: indol-3-acetaldoxima; IPA: indol-3-piruvato; IAM: indol-3-acetamida; IAN: indol-3-acetonitrilo; TAM: triptamina. (Zhao, 2010).

Los niveles de auxina también pueden regularse a través de la formación de conjugados. La auxina se inactiva por conjugación con azúcares y varios aminoácidos, los cuales pueden ser hidrolizados para formar AIA activo. La conjugación de aminoácidos con el AIA es catalizada por la familia de genes GH3, los cuales codifican para las enzimas IAA-amido sintetetasas (E.C. 6.3.2.-). Por otra parte, los niveles de AIA activo pueden disminuir a través de su degradación a ácido 2-oxoindol-3-acético (Schaller et al., 2015). Solo una parte de los conjugados pueden ser hidrolizados para convertir de nuevo al AIA en su forma libre a través de las amino hidrolasas: AIA-Ala, AIA-Leu (AIA-leucina), AIA-Phe (AIA-fenilalanina); por otra parte, se piensa que los conjugados AIA-Asp (AIA-ácido aspártico) y AIA-Glu (AIA-ácido glutámico) son precursores de la ruta de degradación (Ludwig-Müller, 2011), aunque recientemente se ha visto en fresa que ambos conjugados pueden liberar AIA (Tang et al., 2019).

Los análisis genéticos de la biología de la auxina han revelado que tanto la síntesis, como el transporte, señalización y respuesta de la misma, son críticos para que la embriogénesis se lleve a cabo (Weijers y Wagner, 2016).

1.7. TRANSPORTE, PERCEPCIÓN Y SEÑALIZACIÓN DE AUXINA

Lo que diferencia a las auxinas de otros RC, es la forma polar en que se transportan. El transporte puede ser de manera pasiva a través del tejido vascular y la dirección de su movimiento está determinada por un flujo en masa. Por otro lado, también existe un flujo activo de célula a célula en el cambium vascular y en el xilema de células parenquimáticas (Zazimalová et al., 2007).

Para que se lleve a cabo una respuesta biológica, por acción de las auxinas endógenas o compuestos sintéticos, éstos deben ser percibidos por la planta y convertirlos en una señal. En *Arabidopsis* se conocen por lo menos dos transportadores para auxinas que juegan un papel importante en la respuesta celular: la familia de proteínas PIN y los ABC (del inglés ATP-binding cassette) (Ljung, 2013).

La importancia de las proteínas PIN en el flujo de auxinas en las células fue elucidada a partir de la caracterización de las mutantes PIN1 en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, los transportadores ABC y las fosfoglucoproteínas (PGPs) también están involucradas en el flujo de auxina y se cree que actúan en conjunto con las PIN para regular su

distribución (Fig.1.4) (Schaller et al., 2015; Zazimalová et al., 2007).

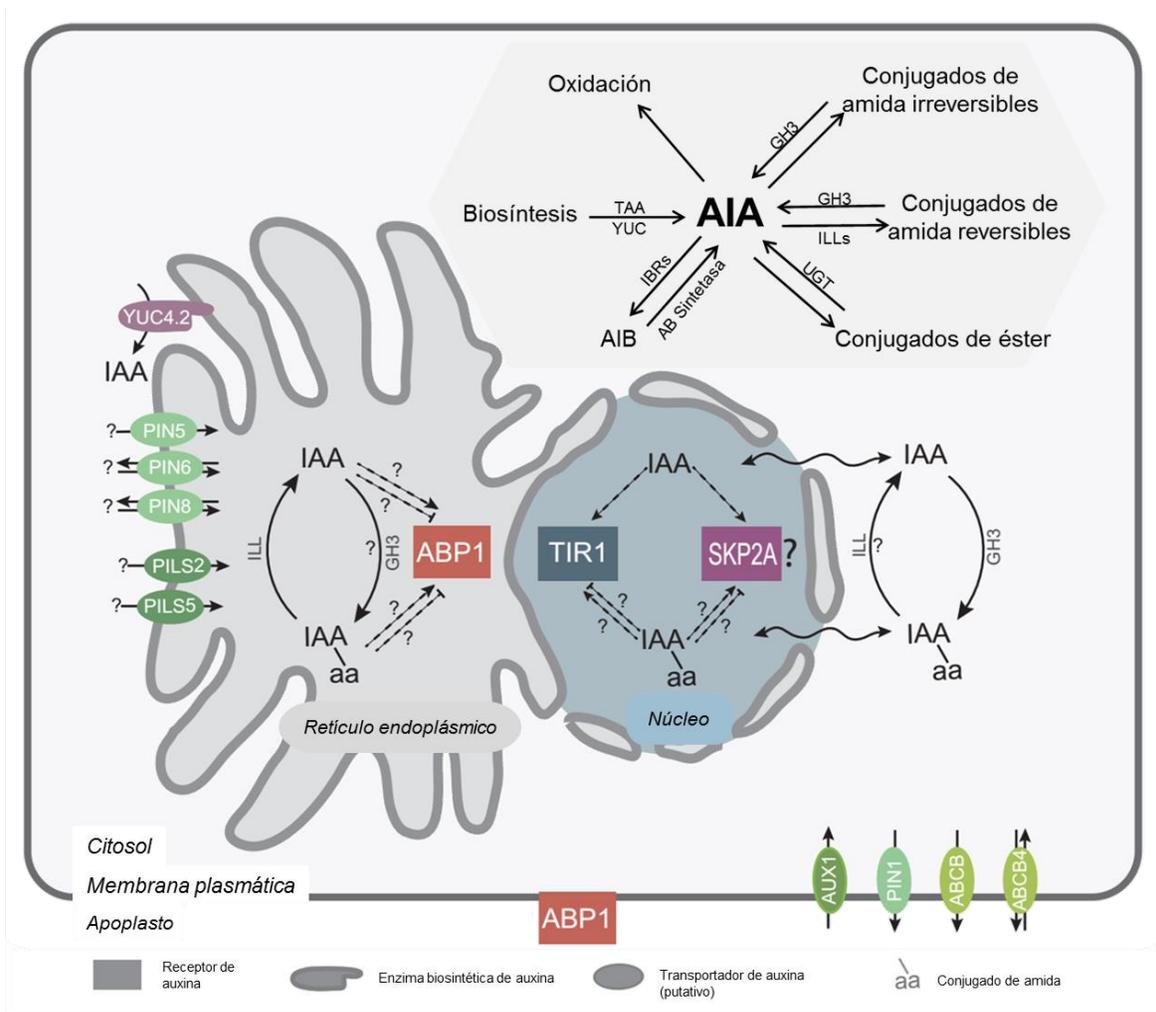


Figura 1.4. Transporte celular de las auxinas. El esquema muestra la compartimentalización y organización de las proteínas involucradas en el transporte, recepción y señalización (Sauer et al., 2013).

La función de los transportadores PIN parece estar más directamente conectada con efectos fisiológicos específicos de las auxinas, mientras que la función de las PGP parece ser más general y se manifiestan en zonas con alta concentración de auxina. El efecto neto de la distribución de estos transportadores es generar asimetría en la concentración de las auxinas, lo que hace que se dé una regulación en la diferenciación y en la división celular durante el crecimiento y desarrollo de la planta (Schaller et al., 2015; Zazimalová et al., 2007).

Así mismo, hay transportadores específicos del AIA, como la familia AUX1/LAX y los más recientemente identificados PIN-likes (PILS), los cuales se supone que intervienen en el transporte del AIA, entre el citosol y el retículo endoplásmico (RE) (Ljung, 2013).

Se considera que existen por lo menos dos receptores de auxinas: el co-receptor nuclear Transport Inhibitor Resistant 1 (TIR1/AFB Aux/AIA) y el Auxin Binding Protein 1 (ABP1). El ABP1 se localiza en el retículo endoplásmico, pero es parcialmente secretado al apoplasto donde se activa y une a dos moléculas de auxina como dímero; mientras que el TIR1 forma un complejo con la proteína Aux/AIA y la auxina. Sin embargo, recientemente se ha descubierto a la proteína S-Phase Kinase-Associated Protein 2A (SKP2A), la cual se une a la auxina y podría ser otro receptor para las auxinas en el núcleo (Fendrych et al., 2016; Barbez y Kleine-Vehn, 2013).

La ruta del TIR1 se lleva a cabo por la de-represión de genes inducidos por las auxinas, mientras que, por otro lado, se propone que la vía del ABP1 regula directamente actividades de proteínas, y de esta forma puede actuar inmediatamente después de la percepción de las auxinas. Sin embargo, a pesar de que el crecimiento celular inducido por auxinas es una interrogante que se ha hecho por años dentro de la rama de la fisiología vegetal, los datos sobre cómo se percibe la auxina durante este proceso son escasos (Fendrych et al., 2016).

La ES tiene lugar gracias, sobre todo, a las auxinas, ya que ésta desencadena cambios en la transcripción y desarrollo celular. Es por esto que la señalización es un aspecto fundamental para que se lleve a cabo la transición embriogénica en las células somáticas de las plantas (Wojcikowska y Gaj, 2017).

La vía por medio de la cual se da la percepción de las auxinas es relativamente corta física y genéticamente; sin embargo, hay diversos componentes que están implicados en el mecanismo de regulación de los genes de respuesta a las auxinas (Sghaier et al., 2018; Weijers y Wagner, 2016). Los componentes clave son: las proteínas TIR1/AFB, los co-reguladores transcripcionales Aux/IAA y proteínas de unión ARF (Weijers y Wagner, 2016).

Las proteínas TIR1/AFB forman parte del complejo SCFTIR1/AFB de cuatro subunidades,

localizado en el núcleo, al igual que las Aux/IAA. Estos dos componentes son los encargados de detectar a las auxinas. Una vez que las auxinas se unen al TIR1/AFB, la afinidad por las Aux/IAA aumenta y, de esta manera, se promueve la interacción entre ambos. Esta interacción desencadena la ubiquitinación de las Aux/IAA y su consiguiente degradación por vía del proteasoma. La participación de la ubiquitinación se ha demostrado en ensayos con protoplastos, sin embargo, los sitios y visualización *in vivo* de la ubiquitinación todavía no están bien elucidados. Se presume que este proceso puede ser más complicado de lo que parece (Weijers y Wagner, 2016).

Por otro lado, las proteínas Aux/IAA actúan como co-represores de la transcripción relacionada a auxinas al unirse a las proteínas Topless (TPL), sobre todo cuando las concentraciones de esta última son bajas. Estas proteínas no contienen motivos de unión al ADN por lo que dependen de los ARF y de su unión a través de dominios C-terminales para ser reclutados por las regiones genómicas (Mironova et al., 2017; Weijers y Wagner, 2016).

Otro de los elementos clave en este proceso son los Auxin-response element (AuxRE), que son secuencias regulatorias *cis* que en su núcleo contienen un motivo TGTC, el cual permite la unión con los ARF para dar lugar a las principales respuestas a las auxinas (Sghaier et al., 2018; Weijers y Wagner, 2016).

El siguiente componente son las proteínas ARF. Éstas tienen un papel importante en las respuestas asociadas a auxinas, así como en el control de la expresión genética y son exclusivas del reino vegetal. La identificación de los AuxRE dio lugar al aislamiento del ARF1 y la subsecuente identificación de otros 22 ARF en *Arabidopsis* (Li et al., 2016; Weijers y Wagner, 2016).

La familia de genes ARF consiste de varios dominios que han permanecido conservados a través de millones de años de evolución. La mayoría de estas proteínas está constituida por un dominio de unión al ADN tipo B3 en el N terminal (DBD) que se une al motivo TGTCTC de los AuxRE localizado en los promotores de genes responsivos a las auxinas; una región media variable que funciona como un dominio de activación (AD) o represión (RD) y un dominio de dimerización en el C terminal (CTD: dominio III/IV), el cual está involucrado en la interacción proteína-proteína mediante la dimerización con los productos

de la familia de genes Aux/IAA, así como entre ARFs (Chen et al., 2017; Wojcikowska y Gaj, 2017; Li et al., 2016).

Estos ARF pueden activar o reprimir la expresión de genes, dependiendo de la secuencia de aminoácidos que forma la región en el dominio funcional que interactúa con el ADN. Así, se sabe que los ARF5-8 y ARF19 con dominios ricos en glutamina, leucina y serina, son reguladores positivos de la transcripción mediada por auxinas; mientras que los ARF1-4 y ARF9, ricos en serina, prolina, glicina y leucina, son responsables de la represión transcripcional (Mironova et al., 2017; Wojcikowska y Gaj, 2017). De igual manera, las primeras cuatro bases del sitio de reconocimiento para la unión de los ARF son absolutamente necesarias (TGTC), mientras que es posible que existan variaciones en las últimas dos bases que continúan a las cuatro anteriores (TGTC/TC, GC) (Li et al., 2016). Como se mencionó anteriormente, los ARF fueron identificados gracias a su habilidad de unirse a la secuencia TGTCTC. Sin embargo, ahora se sabe que esta secuencia tiene un nivel medio de afinidad y que el nuevo motivo con variación en las últimas dos bases (TGTCGG) es mucho más específico (Weijers y Wagner, 2016).

En la Figura 1.5 se muestra el modelo propuesto para explicar cómo se regula la respuesta transcripcional con base en la presencia de las auxinas. Cuando los niveles de auxina son bajos, las proteínas Aux/IAA forman dímeros con los ARFs para inhibir la actividad ARF mediante la unión con el co-represor TPL (TOPELESS), lo cual resulta en la represión de los genes responsivos a las auxinas. Cuando los niveles de auxina son altos, ésta se une a su receptor e induce que las Aux/IAA se unan al complejo SCFTIR1/AFB y como consiguiente, son ubiquitinadas y degradadas por el proteasoma 26S. De esta forma los ARF quedan libres para regular la transcripción de los genes responsivos a auxina (Li et al., 2016).

Se ha demostrado la participación de los ARF en diferentes procesos del desarrollo celular en Arabidopsis, tales como la florescencia, la senescencia foliar, la formación de las semillas y del gineceo, el desarrollo radical, la formación del tejido vascular y el control de la embriogénesis cigótica. Se han observado patrones dinámicos y diferenciales durante el desarrollo vegetal, así como también los diferentes ARF que controlan los procesos del desarrollo, con base en fenotipos observados en mutantes con pérdida de función. Sin embargo, los estudios encaminados a elucidar el papel de los ARF en la ES

aún son escasos, no obstante, algunos resultados muestran que el perfil transcripcional de los ARF identificados en cultivos embriogénicos puede diferir de una especie a otra (Wojcikowska y Gaj, 2017; Li et al., 2016).

Dada la importancia de los ARF en el desarrollo celular, existe especial interés en determinar cómo y cuándo estos genes se expresan y qué regula su expresión. No obstante, el conocimiento que se tiene acerca de los ARF en modelos vegetales es muy limitado, puesto que prácticamente todo este conocimiento se ha generado en la planta modelo *Arabidopsis*. El gran desafío consiste en integrar todo el conocimiento acerca de la regulación de los ARF, en conjunto con los Aux/IAA, en los diferentes procesos del desarrollo celular vegetal, y entender como estos procesos funcionan o son regulados en diferentes especies vegetales (Li et al., 2016).

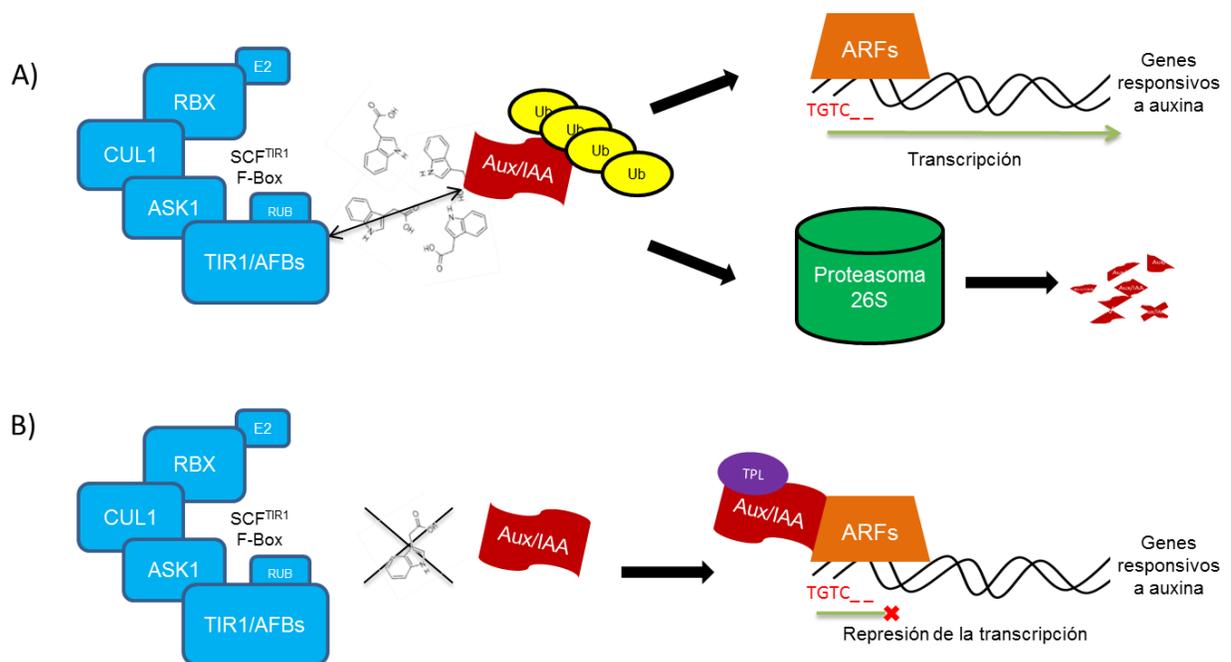


Figura 1.5. Componentes que intervienen en la percepción y señalización de las auxinas, así como en la regulación transcripcional. A) Mecanismo de activación de la transcripción cuando los niveles de auxina son altos; ubiquitinación de Aux/IAA y degradación por el proteasoma 26S. B) Mecanismo de represión de la transcripción cuando los niveles de auxina son bajos, co-represión de Aux/IAA con proteínas TPL.

1.8. VISUALIZACIÓN DE LA AUXINA

El análisis y visualización de la distribución de las auxinas es esencial para el

entendimiento del desarrollo celular vegetal; sin embargo, su evaluación es complicada, ya sea mediante el uso de isótopos marcados debido a que depende de la concentración de auxina presente, o por técnicas de cromatografía y espectrometría las cuales requieren de equipos especiales. Además, estas técnicas requieren de procesos laboriosos y se ha reportado que muestran una baja resolución de la distribución del AIA a nivel celular (Hayashi et al., 2014; Ni et al., 2001).

A pesar de que ya se tienen registros de los sitios de acumulación de las auxinas durante la ES, la habilidad de visualizar los sitios de respuesta de forma cualitativa y cuantitativa es de gran importancia para el completo entendimiento de los mecanismos y dinámicas de las auxinas.

Con el hallazgo de la secuencia consenso TGTC de los AuxRE ha sido posible el desarrollo de promotores sintéticos inductores de respuesta de la auxina, como el DR5 y algunas variantes. El promotor sintético DR5 consiste de siete a nueve repeticiones TGTCTC AuxRE y marca los sitios de respuesta transcripcional de la auxina mediante la activación de reporteros como la β -glucoronidasa, proteínas fluorescentes o el gen de la luciferasa (Liao et al., 2015).

Por medio de estos reporteros sintéticos ha sido posible estudiar la distribución, transporte y acción de las auxinas en embriones y plántulas transgénicas de *A. thaliana* (Dubas et al., 2014; Ni et al., 2001) al funcionar como sustratos para los receptores de las auxinas y permitir la visualización de la respuesta transcripcional (Hayashi et al., 2014; Bargmann et al., 2013).

Aunque el promotor DR5 es efectivo para identificar procesos dependientes de auxina, algunos otros procesos no son detectados, por lo que se infiere que aquellos sitios de expresión del reportero son de concentraciones máximas de la auxina. Actualmente, se ha demostrado que el sitio de unión AuxRE en el DR5 no es de alta afinidad, y en su lugar, se ha identificado otra secuencia que muestra mayor afinidad y sensibilidad. Liao et al. (2015) reemplazaron la secuencia original del DR5 por otra con mayor afinidad (TGTCGG), creando un nuevo reportero denominado DR5v2, análogo al DR5 convencional (TGTCTC) (Weijers y Wagner, 2016). El nuevo reportero DR5v2 resulta ser más sensible para detectar respuestas más genéricas de auxina (Fig. 1.6). A pesar de

que el DR5v2 marca los mismos sitios que el DR5, la intensidad relativa entre distintos tipos de células no es la misma. Además, la amplitud del DR5v2 permite la detección *in vivo* de auxina a una concentración diez veces menor, es decir, este reportero demostró tener una sensibilidad al AIA diez veces mayor que el DR5 convencional (Weijers y Wagner, 2016; Liao et al., 2015).

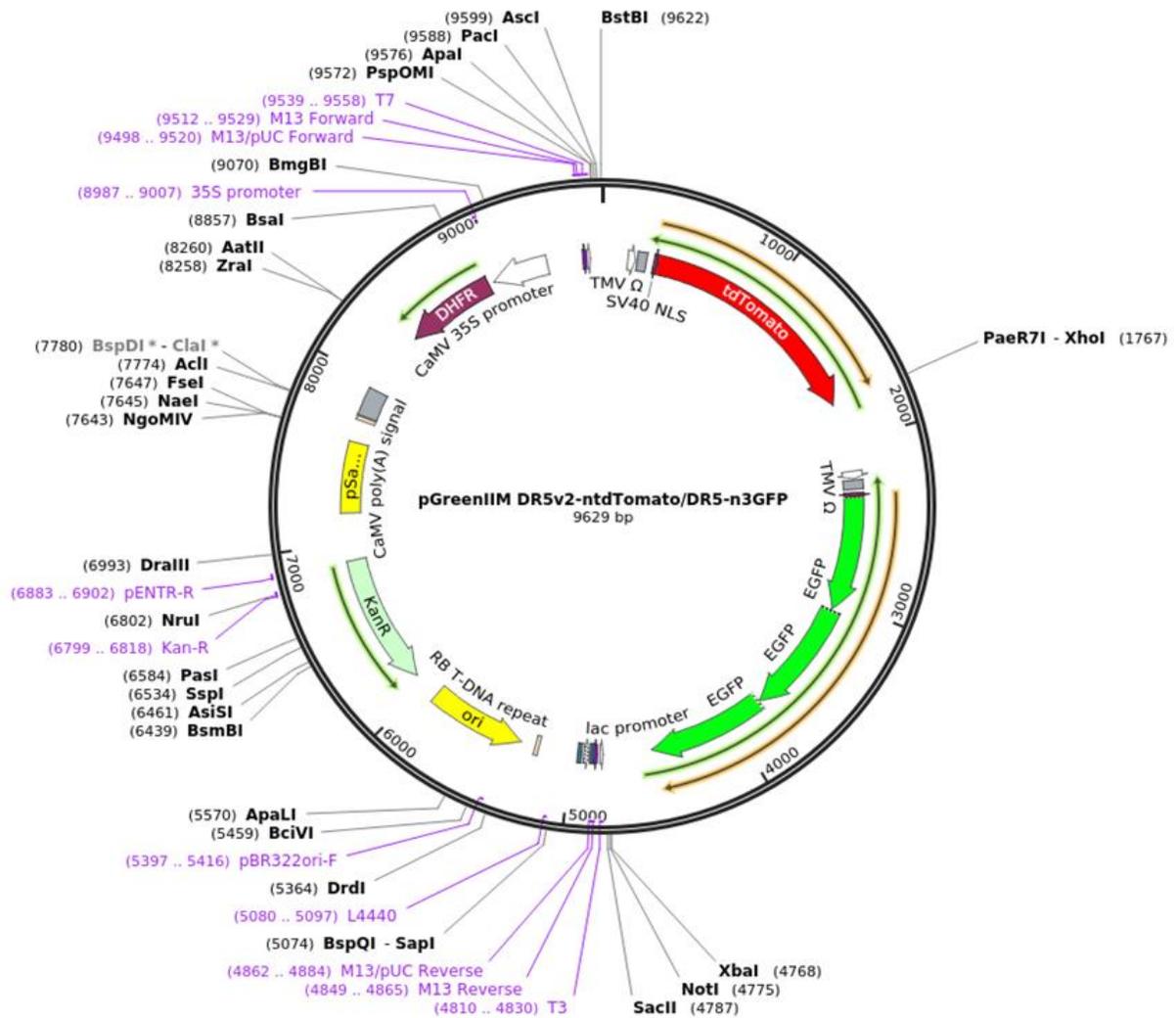
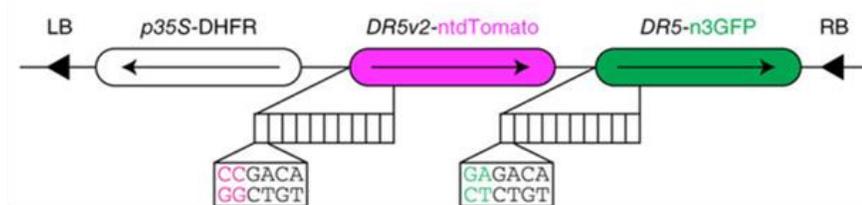


Figura 1.6. Doble reportero DR5v2-ntdTomato–DR5-n3GFP. Nueve repeticiones de TGTCTC (DR5) o TGTCGG (DR5v2) se colocan en orientación inversa río arriba de un promotor mínimo, ya sea 3xEGFP nuclear o tandem nuclear Tomato (ntdTomato). LB/RB: borde izquierdo/derecho. DHFR: gen de resistencia a metotrexato (Liao et al., 2015) (<https://www.addgene.org/61628/>).

Se asume que cualquier planta transformada con DR5v2 es funcional, debido a que el AuxRE es un sitio de unión a ARF genérico, esperando obtener una visualización de dos colores para identificar tanto alta como baja afinidad a los ARF (Liao et al., 2015). Sin embargo, al ser un plásmido basado en pGREEN necesita del plásmido ayudador pSOUP (Fig. 1.7) que le proporciona funciones en *trans*, ya que por sí solos son incapaces de replicarse en *Agrobacterium* (Afolabi et al., 2013; Hellens et al., 2005).

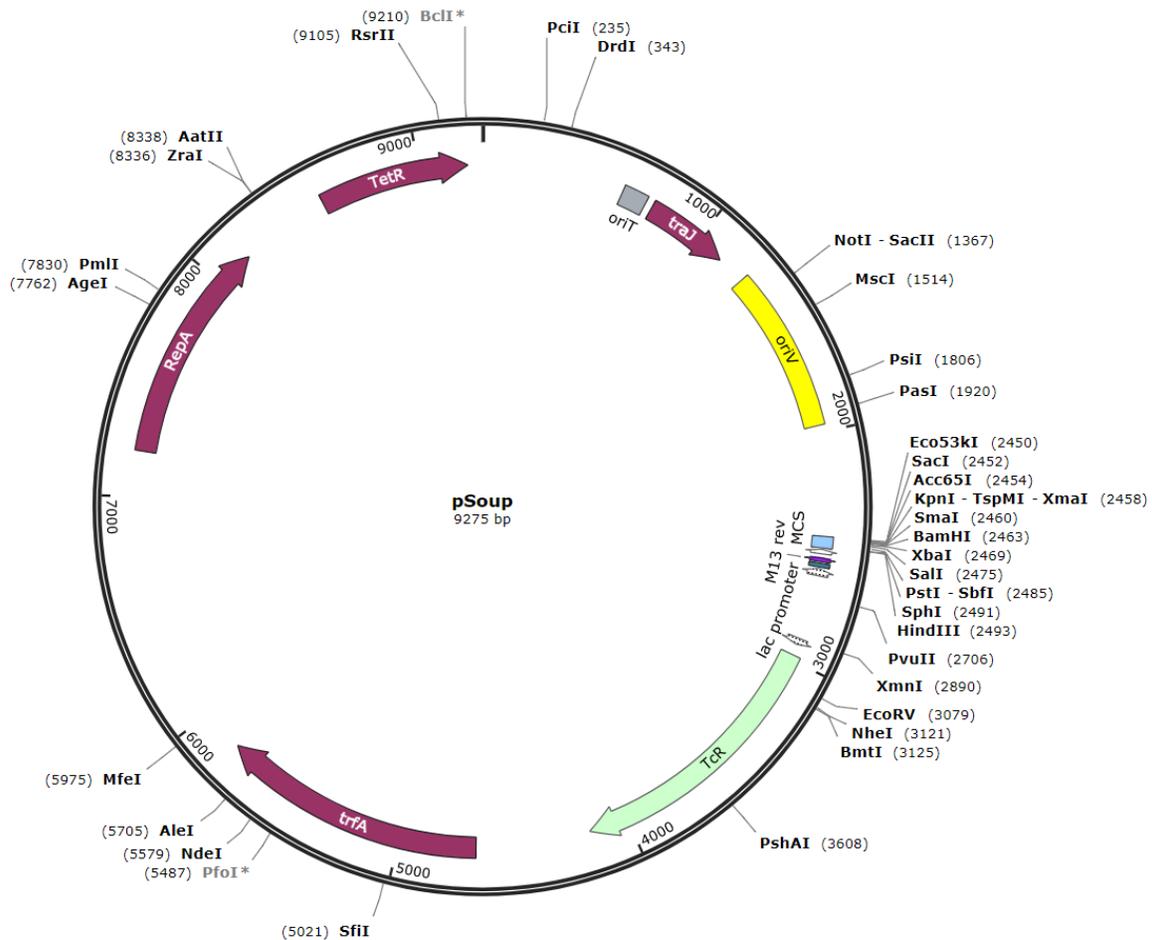


Figura 1.7. pSOUP, plásmido ayudador que proporciona funciones de replicación en *trans* para plásmidos pGREEN en células de *Agrobacterium*

(Smedley y Harwood, 2015) (http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pSoup/).

La identificación del sitio de acción de la auxina podría incrementar las posibilidades de controlar el crecimiento y desarrollo de las plantas, en beneficio de la agricultura y horticultura (Zazimalová et al., 2014).

1.9. APLICACIÓN DE LA BIOINFORMÁTICA PARA EL ESTUDIO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

En la actualidad se han logrado avances sustanciales en el estudio de la complejidad y diversidad de los genomas gracias a la generación de datos biológicos mediante el uso de tecnologías de alto rendimiento y el desarrollo de herramientas computacionales (Goodwin et al., 2016; Iquebal et al., 2015).

La secuenciación del genoma completo de una gran cantidad de organismos, incluidas especies de alto interés agronómico, ha permitido el análisis y descubrimiento de nueva información, que de otra forma hubiera sido aún más difícil. Sin embargo, el incremento en la generación de información biológica demandó el desarrollo de metodologías computacionales para su correcto uso y manejo. Fue así como, gracias a la integración de la informática como herramienta en el área de la biología surgió la bioinformática. La bioinformática es una rama multidisciplinaria que se apoya en los sistemas de cómputo para almacenar información y llevar a cabo análisis de información biológica, en conjunto con el uso de algoritmos estadísticos. Lo anterior permitió facilitar el manejo de una gran cantidad de información, así como también la extracción de un significado biológico a partir de ello con ayuda de las computadoras (Iquebal et al., 2015).

Las nuevas tecnologías permiten llevar a cabo estudios a nivel genómico, proteómico, transcriptómico y metabolómico, y así profundizar en temas de investigación encaminados al mejoramiento de la agricultura, medio ambiente, salud humana, biotecnología, entre otros (Iquebal et al., 2015). Así, con el reciente crecimiento de las plataformas de secuenciación a gran escala y técnicas bioinformáticas ha sido posible disminuir el tiempo y costo de la secuenciación de genomas de interés, para contribuir al área de investigación de la transcriptómica. Para lograr lo anterior, las tecnologías de secuenciación de nueva generación (NGS) contribuyen a la detección y generación de datos transcriptómicos de alto rendimiento y precisión, además del bajo costo, en

prácticamente cualquier tipo de tejido aún en sistemas biológicos no caracterizados (Zhang et al., 2019; Ahn et al., 2014).

Las NGS han sido utilizadas en numerosas especies de plantas para estudiar desarrollo, senescencia, crecimiento, y respuestas a diferentes tipos de estrés (Chu et al., 2017). Estas, han hecho posible la secuenciación de ADNc obtenido a partir de ARN, mediante tecnologías de secuenciación masiva paralela, a lo cual se denomina RNA-seq (del inglés RNA-sequencing). El término RNA-seq se utiliza para referirse a los procedimientos experimentales con poderosas herramientas informáticas, por medio de los cuales se obtienen miles de lecturas de secuencias de ADN (~36-125 bases) derivadas del ARN mensajero (Garber et al., 2011) y que arrojan información sobre la secuenciación transcripcional, anotación funcional, genes diferencialmente expresados, clasificación de genes, entre otros (Zhang et al., 2019).

Las plataformas de RNA-seq permiten el ensamblaje de lecturas en perfiles transcriptómicos, proporcionando un medio completo y eficiente para evaluar la composición del transcriptoma, obtener patrones de expresión de ARN y facilitar el estudio de genes de interés. Esta estrategia puede ser utilizada para ensamblar transcriptomas *de novo* cuando no se cuenta con un genoma de referencia, es decir, en organismos donde no se ha determinado la secuencia genómica (Elbl et al., 2015).

Uno de los objetivos del RNA-seq es identificar los cambios en el nivel de expresión de genes de interés en una condición determinada y como consiguiente, entender como los cambios en la abundancia de los transcritos controlan el crecimiento y desarrollo de un organismo (Rhee et al., 2006). Para ello, existen diferentes metodologías que hacen uso de herramientas y softwares bioinformáticos. Para llevar a cabo el RNA-seq, el primer paso es la generación de lecturas o “reads”. Posteriormente, la estrategia es contar el número de estas lecturas que caen dentro de cada uno de los genes, es decir, el alineamiento de las lecturas a un genoma de referencia. En la mayoría de los casos este paso es el más lento, debido a que los programas de alineamiento deben resolver una importante tarea: determinar el punto de origen de cada lectura en el genoma de referencia. Seguido del alineamiento se realiza la normalización para extraer los estimados de expresión significativa. Una vez cuantificadas y normalizadas las lecturas, el siguiente paso es entender como los valores de expresión varían entre condiciones de

estudio, mediante análisis estadísticos para obtener los cambios cuantitativos en los niveles de expresión entre dichas condiciones. Como resultado final, se busca la identificación de genes expresados, y el análisis de la expresión diferencial entre muestras o condiciones de estudio (Anders et al., 2013; Langmead y Salzberg, 2012; Garber et al., 2011).

La tecnología de secuenciación masiva para la generación de bases de datos de cultivos de interés agrícola, es útil para comprender los aspectos evolutivos de diferentes genes entre especies vegetales, así como la pérdida o ganancia de ciertos genes o grupos de ellos, o los genes que están sobre expresados o reprimidos durante el proceso de ES (Góngora-Castillo et al., 2018).

La ES es el modelo más accesible para el estudio y entendimiento de la embriogénesis cigótica. No obstante, la ES aún no está del todo comprendida y la pregunta sigue siendo ¿qué es lo que hace que una célula competente se convierta en embrión? (Zheng y Perry, 2014).

A pesar de que la información sobre el mecanismo molecular que rige y controla la ES aún es escasa, con el uso de las NGS el conocimiento de los genes involucrados en la respuesta embriogénica ha ampliado el panorama para la correcta comprensión de las primeras etapas del proceso de ES, ya que ofrecen un enfoque más cercano al estado de la célula en un espacio y tiempo específicos (Enríquez-Valencia et al., 2019; Góngora-Castillo et al., 2018; Jamaluddin et al., 2017a).

Se tienen reportes en especies como *Arabidopsis*, algodón, palma de aceite, soya, zanahoria, uva, coníferas, alfalfa, entre otras, del uso de la transcriptómica para elucidar los diversos mecanismos moleculares que operan los procesos celulares, durante la inducción y desarrollo de la ES (Enríquez-Valencia et al., 2019; Cao et al., 2017; Chu et al., 2017; Jamaluddin et al., 2017b; Cetz-Chel y Loyola-Vargas, 2016; Cheng et al., 2016; Shi et al., 2016; Tao et al., 2016; Yakovlev et al., 2016).

Para la identificación inicial de genes relacionados con la ES las primeras técnicas utilizadas fueron la hibridación y las microhileras. Sin embargo, gracias a las nuevas tecnologías de secuenciación de alto rendimiento se ha podido incrementar el número de

genes expresados identificados durante la inducción de la ES (Góngora-Castillo et al., 2018), ya que se ha demostrado que el RNA-seq es más preciso que las microhileras (Trapnell et al., 2013). Dentro de estos genes, se ha visto que los genes SERK, LEC, BBM, ARF, Aux/IAA, entre otros, son activados o reprimidos, o que presentan una expresión diferencial durante la ES (Xu et al., 2013).

Debido a la importancia del cafeto a nivel mundial, se ha puesto mucho empeño en el entendimiento de su genoma y biología con la finalidad de aumentar propiedades específicas, como el rendimiento por hectárea, su productividad, su resistencia a diversos tipos de estrés, entre otras. En este punto, las NGS fueron parte fundamental para obtener la secuencia completa del genoma de *C. canephora*, el cual tiene un tamaño de 568.6 Mb, dividido en 11 pseudomoléculas. Esto, en conjunto con el sistema integrativo de información genómica Coffee Genome Hub, ha permitido que los investigadores interesados en comprender a fondo la biología del cultivo accedan fácilmente a esta información (Dereeper et al., 2015; Denoeud et al., 2014).

Es así que con las herramientas bioinformáticas, las NGS y el RNA-seq, además del genoma liberado de *C. canephora*, es posible la identificación de genes involucrados directamente con el proceso de ES, para comprender más a fondo los mecanismos moleculares que operan este proceso.

1.10. JUSTIFICACIÓN

El cafeto es uno de los cultivos de mayor importancia económica y social a nivel mundial. La ES representa una alternativa viable para la propagación y mejoramiento genético del cultivo; sin embargo, aún quedan muchas dudas por esclarecer respecto a los diferentes mecanismos involucrados en la diferenciación de células somáticas a células embriogénicas, que posteriormente formarán un embrión y éste a su vez, una planta completa. Durante la inducción de la ES las auxinas tienen un papel central, y existe una gran cantidad de genes expresándose diferencialmente dentro de los cuales destacan los ARF y Aux/IAA. Estos genes están implicados en la señalización del AIA, que es un proceso fundamental para que se lleve a cabo la ES. No obstante, el conocimiento que se tiene acerca de estos en modelos vegetales es muy limitado. El gran desafío consiste en integrar todo el conocimiento acerca de la regulación de los ARF en conjunto con los

Aux/IAA en diferentes procesos del desarrollo celular vegetal, y entender como estos procesos funcionan o son regulados en diferentes especies de plantas.

1.11. OBJETIVO GENERAL

Analizar el perfil de expresión de los ARF y Aux/IAA durante la inducción de embriogénesis somática en *Coffea canephora*.

1.12. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar los genes expresados diferencialmente durante la inducción de la ES en *C. canephora*, pertenecientes a la familia ARF y Aux/IAA.

Establecer un protocolo de transformación de *C. canephora*.

Visualizar la percepción y señalización de la auxina mediante el promotor sintético DR5v2.

1.13. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el comportamiento de los genes ARF y Aux/IAA implicados en la señalización y respuesta a auxina durante la inducción de la ES?

1.14. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

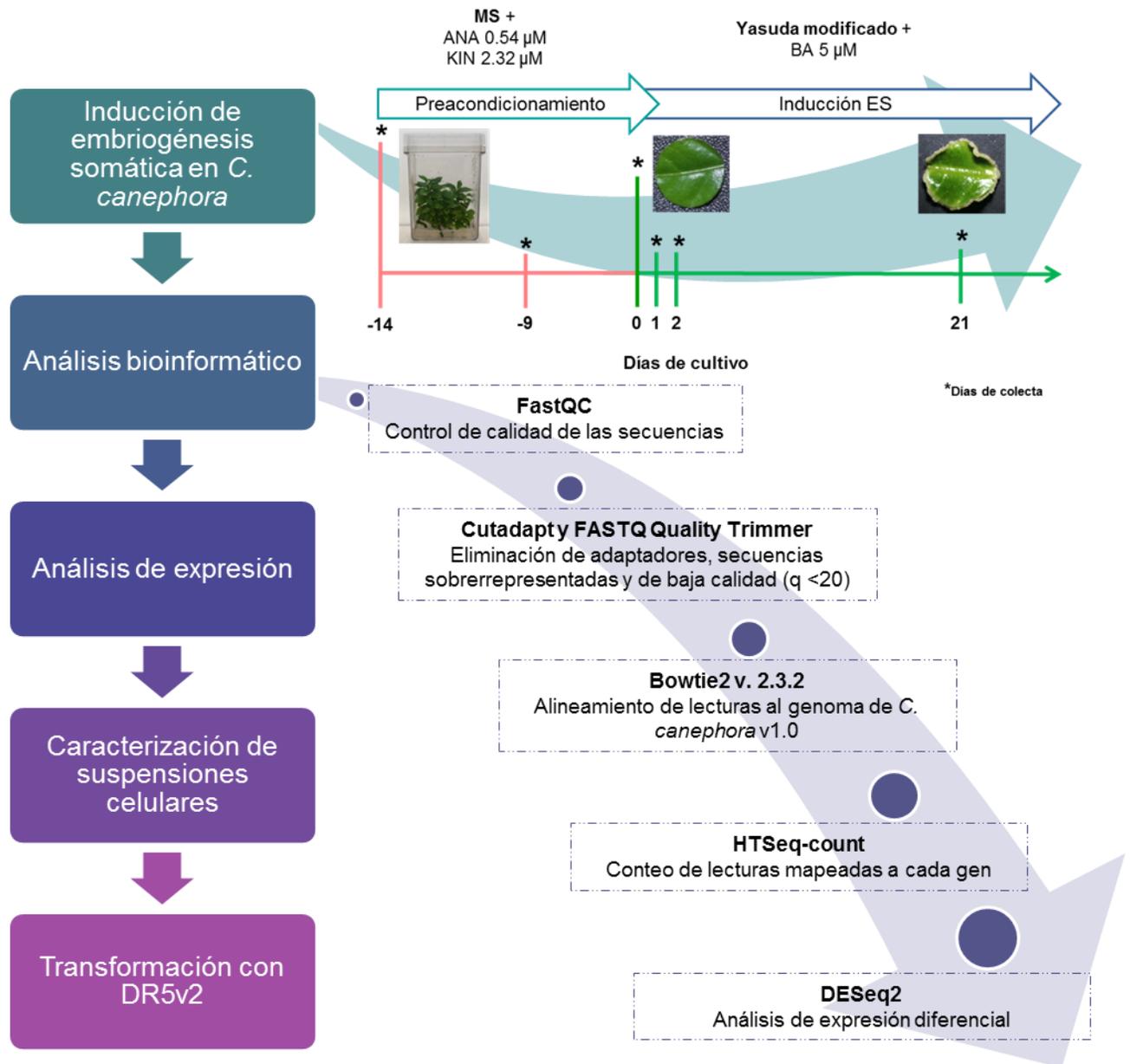


Figura 1.8. Diagrama general de la estrategia experimental.

CAPÍTULO II

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ARF Y AUX/IAA DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Coffea canephora*

2.1. INTRODUCCIÓN

La ES representa una herramienta biotecnológica eficaz para estudiar los procesos morfo-fisiológicos, bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo en el desarrollo de diversos cultivos de interés.

Actualmente se ha utilizado la ES para el estudio de la diferenciación celular en el sistema *C. canephora* y se ha demostrado que los RC vegetales juegan un papel primordial en la señalización y diferenciación celular. De manera particular, la auxina más importante, el AIA, tiene un papel fundamental en la mayoría de los procesos de desarrollo de las plantas, por lo que se ha convertido en el objeto de estudio para elucidar los mecanismos involucrados en la biosíntesis, transporte, señalización, acumulación y homeostasis de la misma.

Con el uso creciente de las tecnologías de secuenciación de nueva generación y las herramientas bioinformáticas, aunado a la liberación del genoma completo de *C. canephora*, se han ampliado las posibilidades de estudiar diferentes procesos biológicos como la ES.

El proceso de ES en *C. canephora* consta de dos etapas: la primera es un pre-acondicionamiento con ANA y KIN como RC; y la segunda, es la de inducción, únicamente con BA. Al cabo de aproximadamente 21 d en la etapa de inducción es cuando comienzan a observarse las primeras estructuras embriogénicas. Por ello, resulta de especial interés evaluar a nivel transcriptómico los cambios que están dando lugar a esta respuesta.

Con las herramientas bioinformáticas disponibles hoy en día es posible conocer la participación de los genes implicados en la señalización del AIA durante la inducción de la ES, su nivel de expresión global y su expresión diferencial al comparar ambas etapas del

proceso de inducción, lo cual puede ser complementado posteriormente por qPCR para ampliar el panorama.

Como información adicional, el promotor sintético DR5v2 brinda información sobre la ubicación espacio-temporal del mecanismo de señalización y respuesta al AIA. El uso de este reportero, que es altamente sensible a la respuesta de auxina, ya ha sido demostrado efectivamente en *A. thaliana*; sin embargo, no se tienen reportes en el género *Coffea*, por lo que resultaría de gran importancia el establecimiento de un protocolo para la transformación y visualización de este promotor sintético.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Inducción de la embriogénesis somática de *C. canephora*

Para llevar a cabo el proceso de inducción de ES se utilizaron plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*. Éstas fueron subcultivadas cada cuatro semanas en el medio de mantenimiento [sales MS (Phyto Technology Laboratories, M524), suplementado con 29.6 μM tiamina-HCl (Sigma, T3902), 550 μM mio-inositol (Sigma, I5125), 0.15 μM cisteína (Sigma, C8277), 16.24 μM ácido nicotínico (Sigma, N4126), 9.72 μM piridoxina-HCl (Sigma, P9755), 87.64 mM sacarosa (Sigma, S539) y 0.285% (p/v) Gellan gum (PhytoTechnology Laboratories, G434) ajustado a pH 5.8] e incubadas en condiciones de fotoperiodo ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) 16 h luz/8h oscuridad a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para iniciar el proceso de inducción, las plántulas fueron incubadas previamente por 14 d en el medio de pre-acondicionamiento [misma composición del medio de mantenimiento, adicionado con 0.54 μM ANA (Sigma, N1145) y 2.32 μM KIN (Sigma, K0753) ajustado a pH 5.8], e incubadas en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Al cabo de los 14 d de pre-acondicionamiento, se seleccionaron hojas del segundo y tercer par en sentido basipetal, para cortar explantes de ocho mm de diámetro con ayuda de un sacabocado estéril. Se colocaron cinco explantes por matraz de 250 mL, con 50 mL medio de cultivo líquido de inducción [sales del medio de Yasuda (Yasuda et al., 1985) suplementado con 5 μM BA (PhytoTechnology Laboratories, B800) ajustado a pH 5.8]. Los matraces fueron incubados en oscuridad a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y agitación (55 rpm) durante 56 d. Se tomaron muestras para los análisis posteriores, durante el pre-acondicionamiento (-14, -7 y 0 d) y la inducción de la ES (1, 3, 24 h; 7, 14, 21 d).

2.2.2. Análisis bioinformático de bibliotecas secuenciadas del proceso de embriogénesis somática de *C. canephora*

Como resultado de la secuenciación se obtuvieron 12 bibliotecas correspondientes a los días 14 y 9 antes de la inducción (dai) y 0, 1, 2 y 21 después de la inducción (ddi), cada día de muestreo con dos réplicas. Se realizó un análisis de calidad inicial a las secuencias con el programa FastQC (v.0.11.5) (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) para verificar los estándares. Posteriormente se procedió a eliminar las secuencias sobrerrepresentadas y adaptadores derivados del proceso de secuenciación con el programa Cutadapt (v. 1.14) (Martin, 2011), así como las secuencias de baja calidad ($Q < 20$) con FASTQ Quality Trimmer (FASTX Toolkit 0.0.14) (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/). Al finalizar este pre-procesamiento de secuencias se repitió el análisis de calidad FastQC.

Una vez limpiadas las secuencias, las lecturas se alinearon al genoma de referencia de *C. canephora* v1.0 (Dereeper et al., 2015; Denoeud et al., 2014) con el programa Bowtie2 (v. 2.3.2) (Langmead y Salzberg, 2012). Después se realizó el conteo de lecturas alineadas a cada gen, con el programa HTSeq-count (v. 0.10.0) (Anders et al., 2015), empleando la opción por defecto: *unión*. Para confirmar la similitud de las réplicas biológicas se le calculó el coeficiente de correlación de Pearson, para lo cual se utilizó el método de normalización por cuantiles y los datos normalizados se transformaron a $\text{Log}_2(x+1)$ utilizando la paquetería de Rstudio (v. 1.1.456) (<https://www.rstudio.com/>).

La matriz de datos crudos obtenida con HTSeq-count fue analizada utilizando DESeq2 (Love et al., 2014) con un valor de $p < 0.05$ para obtener los genes diferencialmente expresados al comparar todos los puntos de muestreo (9 dai y 0, 1, 2, y 21 ddi) contra el testigo (14 dai). Los mapas de calor fueron generados utilizando el paquete ggplot2 para R (Wickham, 2016). Para la generación del diagrama de Venn se utilizó la herramienta InteractiVenn (Heberle et al., 2015). Una vez identificados los genes diferencialmente expresados (GDE), se procedió a diseñar cebadores para qPCR con ayuda del programa UGENE v1.30.0 y el genoma de *C. canephora*.

2.2.3. Análisis de expresión relativa de genes ARF y Aux/IAA durante la inducción de la embriogénesis somática de *C. canephora*

Se realizó la síntesis de ADNc con el kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific, K1632) y cuantificación en Nanodrop 2000 (Thermo Scientific), a partir de muestras de ARN previamente extraídas correspondientes a los días 14 y 9 dai, y 0, 1 y 21 ddi. Posteriormente se hizo un gradiente de temperatura para determinar la temperatura de alineamiento óptima para cada cebador. Se hizo la cuantificación por qPCR en tiempo real con el kit Express Sybr GreenER qPCR Supermix Universal (Invitrogen, A10314), en un equipo StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando el gen de ciclofilina como referencia interna. Los datos de expresión relativa se obtuvieron por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y Schmittgen, 2001).

2.2.4. Clonación de reportero sintético DR5v2 en *Escherichia coli*

Se incrementó la cantidad del plásmido DR5v2 de respuesta a auxina (donado por el laboratorio del Dr. Dolf Weijers) en células de *E. coli* por electroporación (células DH5 α) y choque térmico (células Top10).

Para la clonación por electroporación primeramente se procedió a preparar células electrocompetentes de DH5 α . Se picó una colonia aislada de células de *E. coli* y se cultivó en 3 mL de medio LB [(Sigma, L3022), 15 g L⁻¹ agar bacteriológico (Sigma, A6686), pH 7.5] de 12 a 16 h, a 37 °C y 150 rpm. De este pre-inóculo, se tomaron 1.5 mL y se inocularon en 100 mL de medio LB incubado en las mismas condiciones hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5. Posteriormente, se enfrió el cultivo en hielo por 30 min, se dividió el volumen en dos tubos para centrifuga cónicos de 50 mL y se centrifugó a 4,000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se resuspendió la pastilla en 50 mL de agua destilada desionizada fría y se repitió el procedimiento de centrifugación. La pastilla se resuspendió en 25 mL agua destilada desionizada fría, se centrifugó, y se resuspendió nuevamente en 20 mL de agua. Se repitió el proceso de centrifugación y se resuspendió la pastilla en 1,000 μ L de glicerol 10%. Se unió el contenido de los dos tubos y se distribuyó en alícuotas de 50 μ L en tubos Eppendorf para su almacenamiento a -80 °C.

Para su transformación se tomaron 50 μ L de células electrocompetentes se adicionó un

μL del plásmido DR5v2 y se sometió a electroporación en una celda de 2 mm, a 2,500 V, 25 μF y 200 Ω . Posteriormente se agregaron 450 μL de medio LB sin antibióticos y se dejó incubar a 37 °C, 200 rpm por 60 min. Para seleccionar las bacterias transformadas, se inocularon 100 μL de la muestra anterior en cajas de Petri con medio de cultivo LB semisólido adicionado con kanamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se distribuyó por toda la placa. Las cajas de Petri se incubaron invertidas, a 37 °C por 12 a 16 h.

Para la clonación por choque térmico se prepararon células calcio-competentes. Se picó una colonia aislada de células Top10 y se cultivó en un tubo de ensayo con 3 mL de medio LB, se incubó de 12 a 16 h, a 37 °C y 200 rpm. De este pre-inóculo, se tomó un mL y se inoculó en matraces de 250 mL con 50 mL de medio LB. Los matraces se incubaron en las mismas condiciones, por 6 h. Posteriormente el cultivo se enfrió en hielo por 15 min, se colocó el volumen de cada matraz en tubo de centrifuga cónico de 50 mL y se centrifugó a 7,000 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó y se resuspendió la pastilla en 20 mL de CaCl_2 (Sigma, C8106) 0.1 M y se repitió el procedimiento de centrifugación. Se repitió el paso anterior, pero con volúmenes de 10 y 7.5 mL de CaCl_2 0.1 M. Se resuspendió la pastilla en 2 mL de CaCl_2 :15% glicerol y el contenido se distribuyó en alícuotas de 50 μL en tubos Eppendorf para su almacenamiento a -80 °C.

Para su transformación se tomó una alícuota de 50 μL de células competentes y se adicionó un μL del plásmido DR5v2 y se mezcló ligeramente por pipeteo. Se incubó de 5 a 10 min en hielo, después se colocó en baño María a 42 °C por 60 s y al transcurrir el tiempo, se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregaron 950 μL de medio LB sin antibióticos y se dejó incubar a 37 °C, 200 rpm por 60 min. Al cabo del tiempo, se centrifugó el tubo a 5,000 rpm por 3 min y se descartó aproximadamente la mitad del sobrenadante. Para seleccionar las bacterias transformadas, se resuspendió la pastilla y se inoculó en cajas de Petri con medio de cultivo LB semisólido, adicionado con kanamicina (50 $\mu\text{g mL}^{-1}$) y se distribuyó por toda la placa. Las cajas de Petri se incubaron invertidas a 37 °C por 12 a 16 h.

Para llevar a cabo la purificación y extracción de los plásmidos se tomaron colonias aisladas con palillos de madera estériles y se inocularon en tubos de vidrio con tapa de rosca con 5 mL de medio LB, adicionado con el antibiótico de selección kanamicina. Se dejó incubar de 12 a 16 h a 37 °C y 200 rpm. Para la purificación de los plásmidos se

utilizó el kit Quick Plasmid Miniprep de Invitrogen K210011, con el contenido de los tubos inoculados con las colonias transformadas.

Para el caso de extracción por lisis casera, el cultivo bacteriano de los tubos de vidrio se centrifugó en tubos Eppendorf a 5,000 rpm por 3 min descartando el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 150 µL de solución I [50 mM glucosa, 25 mM Tris-HCl (Sigma, T6066), 10 mM EDTA (J. T. Baker, 8993-01), pH 8.0]. Posteriormente se agregaron 200 µL de solución II [0.2 N NaOH (J. T. Baker, 3722-01), 1% SDS (Sigma, L3771)] y se mezcló por inversión, sin movimientos bruscos. Se agregaron 150 µL de solución III [60 mL de 5 M acetato de potasio (Sigma, P1190), 11.5 mL ácido acético, 28.5 mL H₂O, pH 6.0] y se mezcló por inversión, sin movimientos bruscos. Se incubó en hielo durante 5 min y posteriormente se centrifugó a 4 °C, a 15,000 rpm por 5 min. Se colectó el sobrenadante en un tubo nuevo y se agregó un mL de etanol absoluto. Se mezcló por inversión ligeramente, se repitió el paso de centrifugación por 15 min y se descartó el sobrenadante. Se agregó un mL de etanol al 70% para lavar la pastilla. Se repitió el paso de centrifugación, se descartó el sobrenadante y se dejaron evaporar los restos de etanol. La pastilla se resuspendió en 30 a 50 µL de agua libre de nucleasas y se guardó a -20 °C.

2.2.5. Obtención y caracterización de suspensiones celulares de *C. canephora*

Para la generación de suspensiones celulares fue necesario llevar a cabo la inducción de callo. En condiciones asépticas, se seleccionaron hojas en buenas condiciones de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* y se procedió a cortar los bordes. Posteriormente, las hojas ya cortadas se colocaron con la cara adaxial en contacto con el medio de cultivo apropiado para inducción de callo [sales del medio MS a la mitad de su fuerza iónica (Phyto Technology Laboratories, M524), suplementado con 29.6 µM tiamina-HCl (Sigma, T3902), 550 µM mio-inositol (Sigma, I5125), 0.15 µM cisteína (Sigma, C8277), 87.64 mM sacarosa (Sigma, S5391), 4.4 µM BA (Phyto Technology Laboratories, B800), 13.57 µM 2,4-D (Sigma D7299) y 0.285% (w/v) Gellan gum (PhytoTechnology Laboratories, G434), ajustado a pH 5.8]. Los explantes se dejaron incubar en oscuridad a 26 °C por un lapso de 21 d.

Al cabo de los 21 d, se seleccionó el callo friable generado alrededor de los explantes

foliares y se colocó en matraces Erlenmeyer con medio de cultivo líquido para suspensiones celulares [se utilizó el mismo medio de cultivo empleado para la inducción de callo, a excepción del Gellan gum]. Los matraces se colocaron en oscuridad a 100 rpm y 26 °C, renovando el medio de cultivo cada 14 d. Durante 21 d se realizó la medición de diversos parámetros para seguir el crecimiento de las suspensiones celulares anteriormente generadas y caracterizar al cultivo. Se midió el volumen total, el paquete celular, los pesos fresco y seco, la viabilidad celular, la densidad celular, el pH y la conductividad eléctrica del medio de cultivo. Antes de comenzar la toma de alícuotas para determinar los diferentes parámetros de crecimiento, se midió el volumen total de tres matraces, con ayuda de una probeta de 100 mL.

El paquete celular se determinó a partir de 10 mL de suspensión celular. La muestra se colocó en tubos de vidrio para centrifuga con fondo cónico graduados, los cuales fueron centrifugados a 3,000 rpm por 15 min y se tomó la lectura del contenido de células sedimentado inmediatamente después de centrifugar.

Para determinar el peso fresco, las células fueron colectadas por filtración. Una vez filtradas, las células se pesaron y almacenaron a -20 °C. Posteriormente fueron liofilizadas para registrar el peso seco.

Las suspensiones celulares de *C. canephora* crecen en racimo, por lo que para obtener un valor real del número de células contenidas en una alícuota de suspensión celular, primero fue necesario llevar a cabo la disgregación de los racimos. Se tomó un mL de la suspensión celular y se incubó con 2 mL de CrO₃ al 8% y se calentó a 80 °C por 15 min en un tubo de ensayo. Transcurrido este tiempo, se agitó por 15 min en un Vortex y se colocó un mL de la mezcla en una cámara de conteo celular. Las células se observaron y contaron bajo un microscopio con el objetivo 10x. Se contaron las células de 10 cuadrantes y la sumatoria representa el número de células contenidas en 10 µL, por lo que se multiplica por 100 para obtener el número de células por mL de suspensión. Dependiendo de la densidad celular y lo avanzado del cultivo, se puede considerar hacer diluciones de la muestra, tomando en cuenta el factor de dilución para los cálculos.

Para estimar la viabilidad celular se colocó un mL de suspensión celular en un tubo de ensayo y se agregaron 250 µL de solución de azul de Evans al 0.1%, de tal forma que se

obtuvo una concentración final de 0.025% por muestra. Cabe mencionar que aparte de las muestras, se tomó un mL de suspensión celular incubado a 70 °C por 30 min para matar las células, el cual fue el testigo o blanco. La muestra se incubó por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente, se centrifugó a 3,000 rpm por 5 min. Se realizaron cinco lavados con agua destilada para remover el exceso de colorante, centrifugando entre cada lavado. Para solubilizar el colorante unido a las células muertas, se agregaron dos mL de solución metanol-SDS [1 g SDS (Sigma, L3771) en 50 mL de metanol y 50 mL de agua destilada] y se dejó incubar a 65 °C por 30 min. Transcurrido este tiempo, se centrifugó a 3,000 rpm por 10 min y recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. El procedimiento de lavado se repitió dos veces más. El total del sobrenadante recuperado se llevó a 7 mL y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 600 nm.

2.2.6. Transformación de las suspensiones celulares de *C. canephora* por perlas de vidrio

Se colocaron 100, 150 y 300 mg (PF) de las células de las suspensiones celulares en tubos Eppendorf. Se agregaron 300 mg de perlas de vidrio, se adicionaron 16 µg de plásmido DR5v2 y se completó el volumen total del tubo a un mL con medio de cultivo para suspensiones celulares. Se consideró un testigo, llevando todo el tratamiento de transformación, pero sin adicionar el plásmido. Se procedió a agitar en Vortex los tubos, por 20, 40 y 60 s. Posteriormente, se colectaron las células y se inocularon en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo para suspensiones celulares. Los matraces se incubaron en oscuridad a 100 rpm y 26 °C.

Para corroborar la transformación, se tomaron muestras a las 24 h y a los 28 d después de la transformación. Se procedió a analizar las células bajo un microscopio confocal Olympus FV100 SW: 3eGFP fue excitada a 488 nm y detectada a 498–530 nm; tdTomato excitado a 561 nm y detectado a 571–630 nm (se ajustó el voltaje de acuerdo con el testigo para evitar ver autofluorescencia).

2.2.7. Obtención de protoplastos a partir de suspensiones celulares

Se seleccionaron suspensiones celulares en su fase exponencial de crecimiento (14 d después del último subcultivo) y se colectaron aproximadamente 2.5 mL de paquete

celular en un tubo de centrifuga cónico de 15 mL mediante centrifugación a 1,810 rpm por 5 min. Se adicionaron cuatro volúmenes de solución enzimática (10 mL) [0.75% celulasa Onozuka R-10 (Yakult Honsa) y 0.25% pectinasa (Sigma, P2401), disueltas en medio de resuspensión y esterilizada por filtración] y la mezcla se colocó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL. La mezcla se dejó incubar por 2 h con agitación suave y en la oscuridad. Transcurrido el tiempo, la solución se pasó por un filtro de 100 µm colocado sobre una placa de Petri, con ayuda de una micropipeta. La solución filtrada, se colocó en un tubo de centrifuga cónico de 15 mL, se centrifugó y descartó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con 5 mL de medio de resuspensión [medio de cultivo para suspensiones celulares sin sacarosa, adicionado con 0.55 M manitol (Sigma, 235-7), ajustado a pH 5.8], centrifugando y resuspendiendo la pastilla cuidadosamente por pipeteo en cada lavado. Los protoplastos se contaron en una cámara de Neubauer y se resuspendieron en el medio según la concentración deseada.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Inducción de la embriogénesis somática

La inducción de ES se realizó a partir de explantes de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*. Las plántulas fueron colocadas en medio MS adicionado con ANA y KIN por un periodo de 14 d para su pre-acondicionamiento. Al cabo de esta etapa, se usaron el segundo y el tercer par de hojas para seccionar explantes circulares y colocarlos en medio líquido de Yasuda, adicionado con BA, para dar inicio a la etapa de inducción. Se tomaron muestras a los 14 y 9 dai (días antes de la inducción) y a los 0, 1, 2, 7, 14, 21 ddi (después de la inducción) para ser utilizadas en análisis posteriores.

Durante las primeras horas de inicio del proceso de inducción no se observó algún cambio en los explantes a simple vista; sin embargo, a partir de los 14 d es posible apreciar la formación de masa pro-embriogénica, mientras que a los 21 d, ya se identifica la aparición de lo que serán las primeras estructuras embriogénicas bien definidas (Fig. 2.1).

Al cabo de los 56 d en el medio de inducción, los explantes ya contaban con cientos de embriones somáticos en los diferentes estadios de desarrollo. Debido a lo anterior, se procedió a transferir los explantes con embriones, así como aquellos embriones dispersos en el medio, a medio de cultivo semisólido sin RC para propiciar su germinación. Una vez

colocados en este medio de cultivo, los embriones continuaron su desarrollo hasta plantas completas (Fig. 2.1).

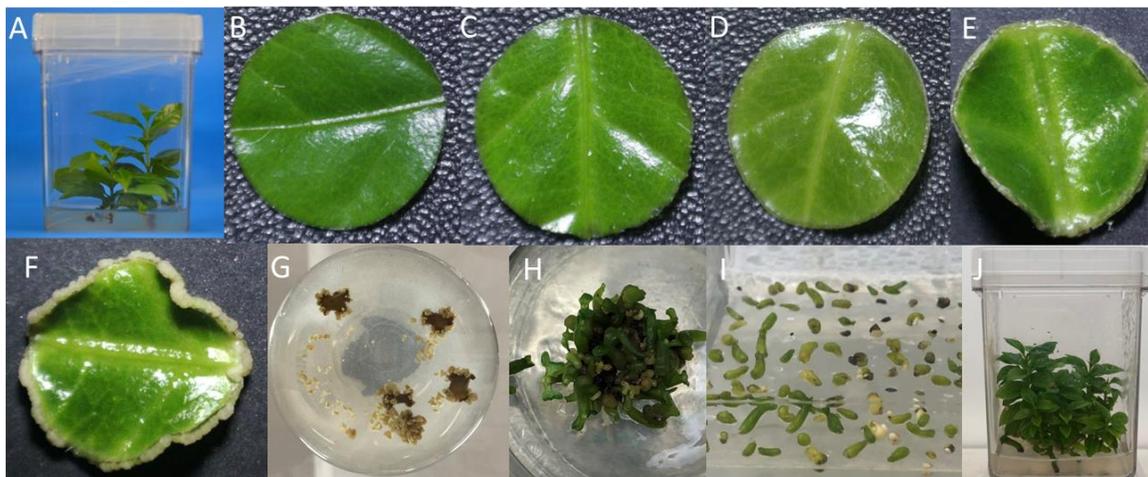


Figura 2.1. Proceso de inducción de embriogénesis somática en *C. canephora*. A) Plántula en etapa de pre-acondicionamiento en medio MS adicionado con $0.54 \mu\text{M}$ ANA y $2.32 \mu\text{M}$ KIN por 14 d previos a la inducción. B) Explante inicial colocado en el medio líquido de inducción, con sales de Yasuda (1985) suplementado con $5 \mu\text{M}$ BA. C-G) Explantes después de 1, 7, 14, 21 y 56 d después de la inducción. H-I) Embriones en la etapa de germinación. J) Plántulas completas, regeneradas a partir de embriones somáticos.

2.3.2. Análisis de la expresión de genes durante la inducción de la embriogénesis somática de *C. canephora*

En el laboratorio ya se contaba con un transcriptoma previamente realizado, del cual, como resultado de la secuenciación se obtuvieron 12 bibliotecas que correspondían a diferentes días de muestreo: 14 y 9 dai y 0, 1, 2 y 21 ddi, cada uno con dos réplicas. Como primer paso, se procedió a evaluar la calidad de las secuencias haciendo un análisis FastQC para corroborar que cumplieran con las condiciones adecuadas para su posterior procesamiento.

Como resultado del FastQC se observó que la mayoría de las secuencias necesitaban ser procesadas pues contenían secuencias sobrerrepresentadas, adaptadores utilizados durante la secuenciación e incluso secuencias de baja calidad ($Q < 20$). Por lo anterior, se ejecutó el programa Cutadapt para remover los adaptadores y las secuencias sobrerrepresentadas. Posteriormente, se utilizó el programa FASTQ Quality Trimmer para eliminar las secuencias que caían por debajo de la calidad aceptada ($Q < 20$). Al término de

ambos procesamientos se repitió el análisis de calidad con FastQC para verificar el mejoramiento de las secuencias. Después se procedió al alineamiento de todas las bibliotecas ya procesadas al genoma liberado de *C. canephora* (Dereeper et al., 2015; Denoeud et al., 2014) utilizando el programa Bowtie2 versión 2.3.2. De esta manera, se obtuvieron dos archivos por muestra: uno con las lecturas correctamente alineadas al genoma, y otro con las lecturas que no alinearon.

En el Cuadro 1 se muestra un resumen de los resultados obtenidos. El número de lecturas después del procesamiento disminuyó ligeramente, como era de esperarse, al realizar la limpieza de los datos crudos. Se obtuvo un porcentaje considerable (23 a 45%) de lecturas que no alinearon al genoma, el cual se sometió a un BLAST y se comprobó que la falta de compatibilidad se debió a posible contaminación durante la secuenciación. Ahora bien, el número de lecturas que alinearon una vez o más al genoma fue mucho mayor, por lo que la tasa de alineamiento general varió de 54 a 77%. Cabe destacar que estos datos son de bibliotecas y réplicas independientes, pero considerando el promedio por cada día de muestreo, los porcentajes son mayores al 65% lo cual se considera aceptable para un alineamiento. Por lo anterior, a partir de este punto se consideró continuar trabajando con aquellas lecturas que sí alinearon al genoma de café, y descartar las no alineadas.

Con el alineamiento se logró asignar las lecturas a los genes correspondientes, por lo que el paso siguiente fue realizar el conteo de lecturas alineadas a cada gen en particular. Este paso se realizó por medio del programa HTSeq-count, utilizando la opción por defecto "unión". Esta opción permite cuantificar las lecturas asignadas a dos genes de manera simultánea, en lugar de discernir si únicamente corresponde a uno u otro.

Como dato de salida se obtuvo una matriz con el total de genes del genoma, las muestras analizadas o bibliotecas y el conteo de lecturas asignadas a cada gen (Cuadro 2). Para mejorar la distribución de los datos, éstos se normalizaron por cuantiles, y posteriormente se realizó una transformación con $\text{Log}_2(x+1)$. Cabe mencionar que esta normalización se realizó manual e independientemente para corroborar resultados posteriores, ya que el programa para estimar los genes diferencialmente expresados (DESeq2) lo realiza interna y automáticamente con los datos crudos de la matriz de conteo.

Cuadro 1. Resumen del procesamiento y alineamiento de lecturas secuenciadas del transcriptoma de *C. canephora*.

| Muestra/ Biblioteca [†] | Lecturas iniciales | Lecturas después del procesamiento | Lecturas alineadas 0 veces | Lecturas alineadas 1 vez | Lecturas alineadas >1 vez | Tasa de alineamiento general |
|-------------------------------------|-----------------------|--|-------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------------|
| 14_1 dai | 42,157,360 | 38,064,798 | 14,856,986 (39.03%) | 19,741,786 (51.86%) | 3,466,026 (9.11%) | 60.97% |
| 14_2 dai | 44,738,607 | 44,737,035 | 11,109,938 (24.83%) | 29,170,168 (65.20%) | 4,456,929 (9.96%) | 75.17% |
| 9_1 dai | 43,459,278 | 40,731,459 | 13,835,991 (33.97%) | 23,225,997 (57.02%) | 3,669,471 (9.01%) | 66.03% |
| 9_2 dai | 43,628,937 | 42,369,506 | 13,336,445 (31.48%) | 252,29,279 (59.55%) | 3,803,782 (8.98%) | 68.52% |
| 0_1 ddi | 40,924,936 | 38,247,628 | 11,747,741 (30.71%) | 22,583,238 (59.04%) | 3,916,649 (10.24%) | 69.29% |
| 0_2 ddi | 49,032,211 | 49,012,743 | 12,801,488 (26.12%) | 30,894,303 (63.03%) | 5,316,952 (10.85%) | 73.88% |
| 1_1 ddi | 38,121,519 | 33,791,596 | 11,293,746 (33.42%) | 18,879,675 (55.87%) | 3,618,175 (10.71%) | 66.58% |
| 1_2 ddi | 49,094,305 | 44,718,468 | 13,307,348 (29.76%) | 26,237,760 (58.67%) | 5,173,360 (11.57%) | 70.24% |
| 2_1 ddi | 62,157,781 | 54,777,604 | 18,391,453 (33.57%) | 30,303,255 (55.32%) | 6,082,896 (11.10%) | 66.43% |
| 2_2 ddi | 61,989,925 | 61,987,800 | 14,752,722 (23.80%) | 39,550,968 (63.80%) | 7,684,110 (12.40%) | 76.20% |
| 21_1 ddi | 39,436,806 | 34,526,731 | 15,836,087 (45.87%) | 14,557,286 (42.16%) | 4,133,358 (11.97%) | 54.13% |
| 21_2 ddi | 51,508,818 | 51,504,421 | 11,873,316 (23.05%) | 31,999,456 (62.13%) | 7,631,649 (14.82%) | 76.95% |

[†]dai: días antes de la inducción. ddi: días después de la inducción.

Cuadro 2. Ejemplo de matriz de datos de conteo de lecturas alineadas a cada gen, generada con el programa HTSeq-count.

| Genes [†] | Bibliotecas | | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------|------|-----|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| | 14_1 | 14_2 | 9_1 | 9_2 | 0_1 | 0_2 | 24_1 | 24_2 | 48_1 | 48_2 | 21_1 | 21_2 |
| Cc00_g00010 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 9 | 10 |
| Cc00_g00020 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| Cc00_g00030 | 1200 | 2469 | 900 | 1450 | 721 | 2090 | 846 | 1079 | 927 | 2989 | 935 | 3619 |
| Cc00_g00040 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Cc00_g00050 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Cc00_g00060 | 15 | 25 | 22 | 0 | 26 | 25 | 27 | 0 | 19 | 11 | 0 | 8 |
| Cc00_g00070 | 533 | 1143 | 991 | 797 | 938 | 1720 | 1253 | 1125 | 1538 | 1501 | 490 | 1446 |
| Cc00_g00080 | 24 | 141 | 0 | 13 | 16 | 46 | 0 | 28 | 46 | 165 | 29 | 66 |
| Cc00_g00090 | 132 | 310 | 433 | 501 | 163 | 424 | 212 | 238 | 323 | 414 | 64 | 506 |
| Cc00_g00100 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6 | 14 | 0 | 13 |

[†]Únicamente se muestran los primeros 10 genes, de un total de 25,574.

Posterior al conteo de lecturas y previo al análisis de expresión diferencial, los datos se sometieron a un análisis de correlación de Pearson, para corroborar la similitud entre réplicas por cada día de muestreo (Fig. 2.2). Debido a que los datos mostraron valores de correlación superiores a 0.7 entre réplicas, se confirmó la similitud entre ellas y se tomó la decisión de utilizar ambas para los análisis posteriores al ser un valor aceptable.

Después de procesar los datos con el programa DESeq2, fue posible extraer la información normalizada y transformada, la cual coincide con este procedimiento hecho previamente, pero de manera manual e independiente. A partir de los promedios de ambas réplicas, por cada día de muestreo, se generó un mapa de calor con el nivel de expresión de todos los genes de *C. canephora* (Fig. 2.3). En él se observa claramente un cambio drástico en los perfiles de expresión de los genes de manera global a partir del día 1 ddi, es decir, hay genes que se apagan y otros que se encienden cuando los explantes son transferidos al medio de Yasuda, en comparación con los perfiles de expresión de la etapa de pre-acondicionamiento. Por otro lado, se observa también como hay ciertos genes que no cambian durante todo el proceso de ES, manteniendo su expresión constante desde el inicio hasta el fin del proceso.

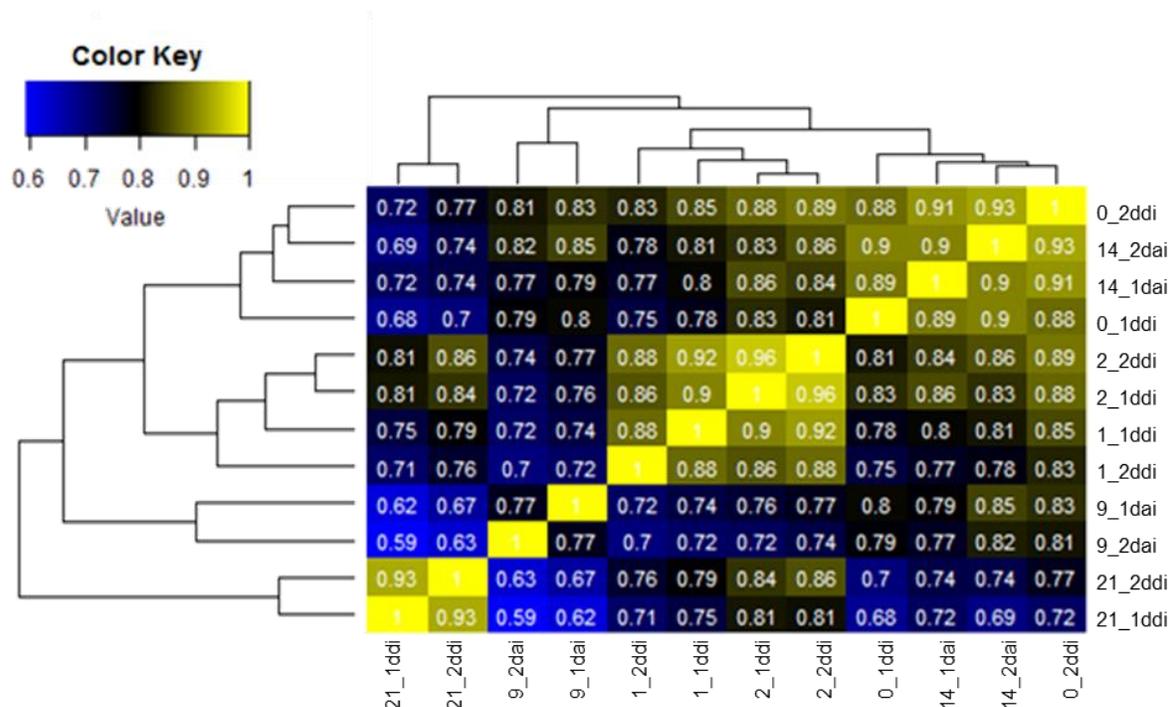


Figura 2.2. Análisis de correlación de Pearson entre réplicas de cada día de muestreo.

Con los datos de los niveles de expresión del transcriptoma es posible elaborar mapas de calor de cualquier gen de interés, sin embargo, para fines exclusivos del presente trabajo, únicamente se generaron los mapas correspondientes a los ARF y Aux/IAA (Fig. 2.4). En el genoma de *C. canephora* fue posible identificar 22 genes de la familia ARF y 14 de la familia Aux/IAA, de los cuales solo se expresaron 17 ARF y la totalidad de los Aux/IAA en el transcriptoma generado en el laboratorio.

Resulta interesante el comportamiento del gen ARF5, puesto que presenta una baja expresión casi en todos los días de muestreo; sin embargo, para el día 21 ddi cuando comienzan a aparecer las primeras estructuras embriogénicas, se observa un aumento drástico en su nivel de expresión. El gen ARF6 presenta su máximo nivel de expresión durante el día 2 ddi con un valor de 12.87, mientras que en el resto de los días los rangos varían entre 10.5 y 12.5. Para el gen ARF9 los valores no sobrepasan el valor de 9.6, teniendo un menor nivel de expresión en los primeros días después de colocarse en el medio de inducción, y para el día 21 ddi el nivel de expresión se restablece hasta un valor muy cercano al del día 14 de la etapa de pre-acondicionamiento. En el caso del

comportamiento del gen ARF18, los niveles de expresión disminuyen considerablemente a partir del día uno de inicio del proceso de inducción y en ningún punto se observa una expresión elevada. Los niveles de expresión del gen Aux/IAA12 permanecen sin cambios en su expresión. De igual manera se comporta el gen Aux/IAA7, a excepción del día 21 dai cuando disminuye drásticamente (2.4).

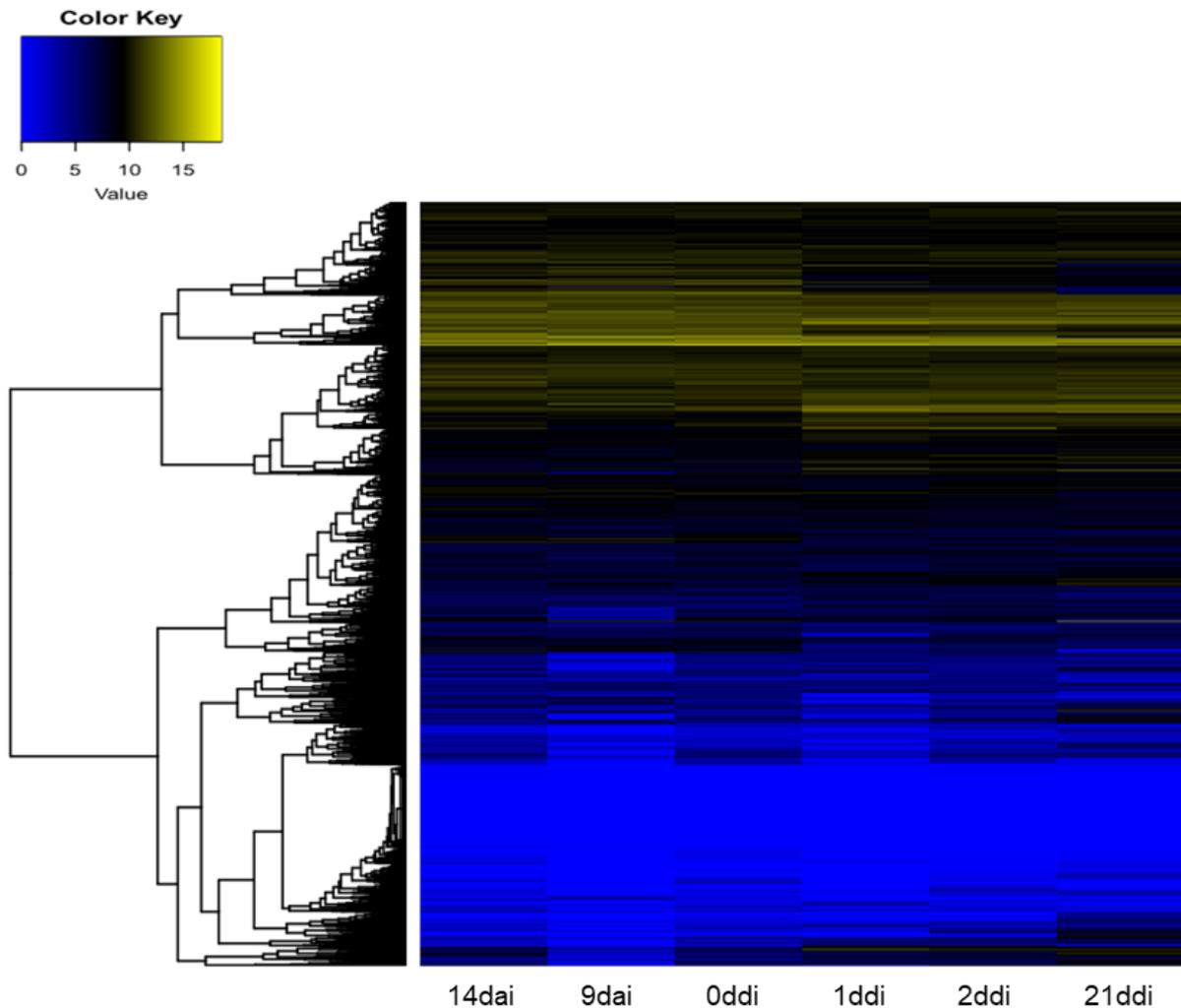


Figura 2.3. Mapa de calor con perfiles de expresión global de genes durante las diferentes condiciones de muestreo de la ES, agrupado por genes.

Posteriormente, se procedió a identificar a los genes diferencialmente expresados (GDE) entre las diferentes condiciones, tomando como referencia el día testigo 14 dai para realizar las comparaciones. Se encontró un menor número de GDE en la etapa de pre-

acondicionamiento (9 dai y 0 ddi) con 557 y 26 genes, respectivamente; mientras que en los primeros días en el medio de inducción el número varió de 4,570 a 3,286 y para el día 21 ddi aumentó considerablemente obteniéndose 5,319 GDE (Fig. 2.5 A).

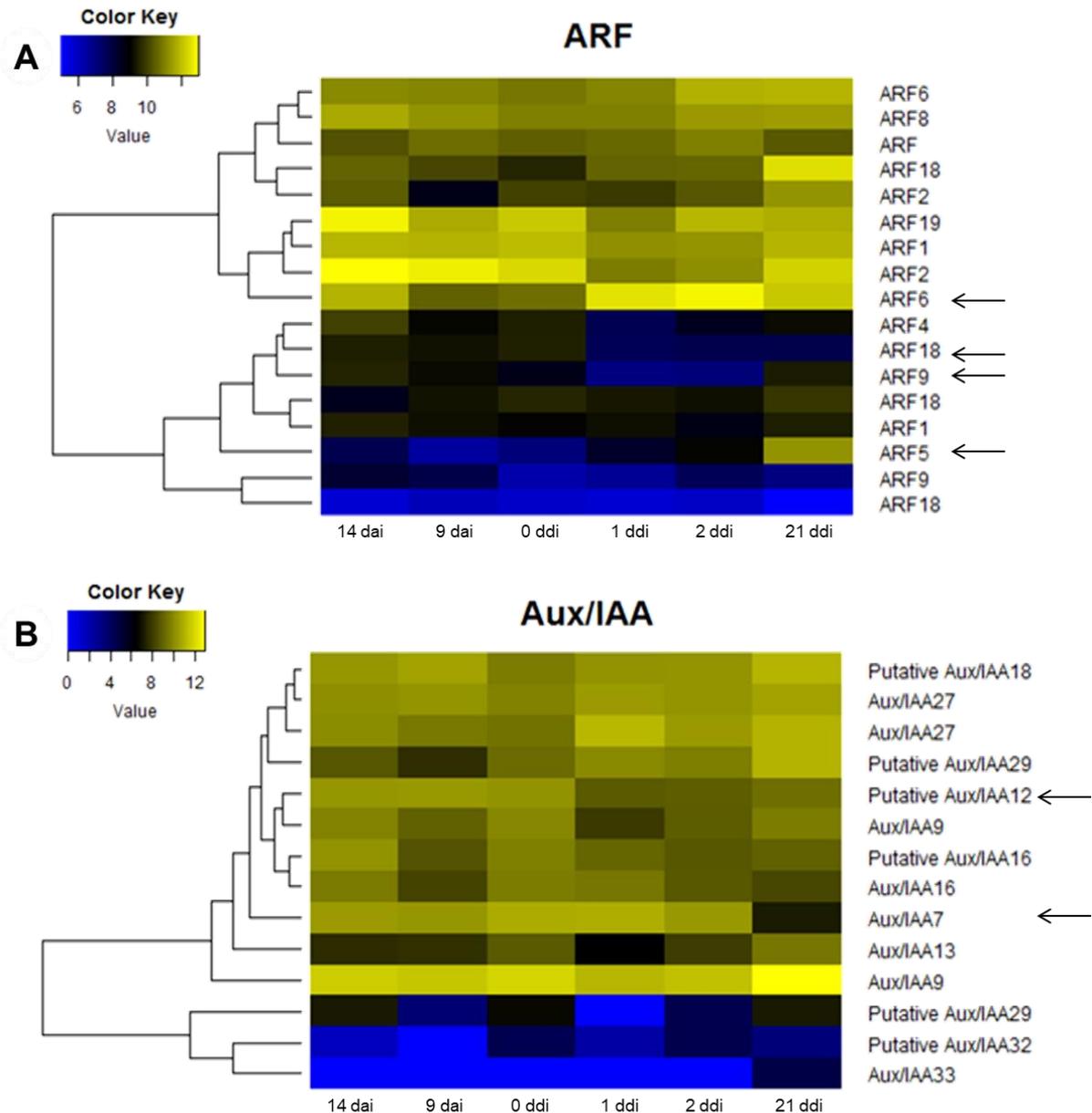


Figura 2.4. Perfil de expresión de genes implicados en la señalización del AIA. A) Auxin Response Factor (ARF). B) Aux/IAA. (Flechas indican los genes seleccionados para cuantificación por qPCR).

Del total de GDE por cada condición, se obtuvieron aquellos genes con mayor y menor nivel de expresión (Fig. 2.5 B). En la condición 14 dai vs 9 dai los GDE con mayor nivel de expresión o regulados a la alta fueron 138, mientras que los de menor expresión o regulados a la baja fueron 419. En la condición 14 dai vs 0 ddi el número de genes regulados a la alta y a la baja fue el mismo (13). Tanto en la condición 14 dai vs 1 ddi y 2 ddi, el número de GDE regulados a la alta fue menor que aquellos con regulación a la baja. Por el contrario, en la última condición los genes con regulación a la alta superaron al número de genes con regulación a la baja (2,733 y 2,586, respectivamente).

El diagrama de Venn presentado en la Fig. 2.6 muestra la interacción entre las cinco condiciones estudiadas, así como los genes únicos en cada una de ellas. Lo que es muy interesante es que únicamente cinco genes permanecen diferencialmente expresados de manera constante. Estos cinco genes fueron identificados según la anotación como: putative encodes a protein involved in salt tolerance names SIS (Salt Induced Serine rich), adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein, NAC domain-containing protein, mitogen-activated protein kinase kinase kinase e hypothetical protein.

En la condición 14 dai vs 0 ddi, solo hay un gen que se distingue del resto de las condiciones comparadas. Mientras que para la condición 14 dai vs 9 dai, 14 dai vs 1 ddi y 14 dai vs 2 ddi hay 196, 1,602 y 289 GDE únicos respectivamente. El mayor número de GDE únicos y distintos al resto de las condiciones (2,511) se localizó en la última condición del proceso de ES (14 dai vs 21 ddi). Es decir, en el día 21 es cuando se puede identificar no solo un mayor número de genes diferenciales, sino que solo se encuentran en este punto y no en los demás del proceso de inducción (Fig. 2.6).

En el Cuadro 3 se muestra una lista de genes diferencialmente expresados durante la inducción de la ES pertenecientes a unas de las familias de mayor interés asociada a las auxinas: los genes GH3 relacionados con los conjugados de AIA, los YUCCA relacionados a la biosíntesis, y los ARF y Aux/IAA relacionados con la señalización. En el día 9 dai y 0 ddi (comparados con el 14 dai) no se observaron GDE relacionados a estas cuatro familias de genes.

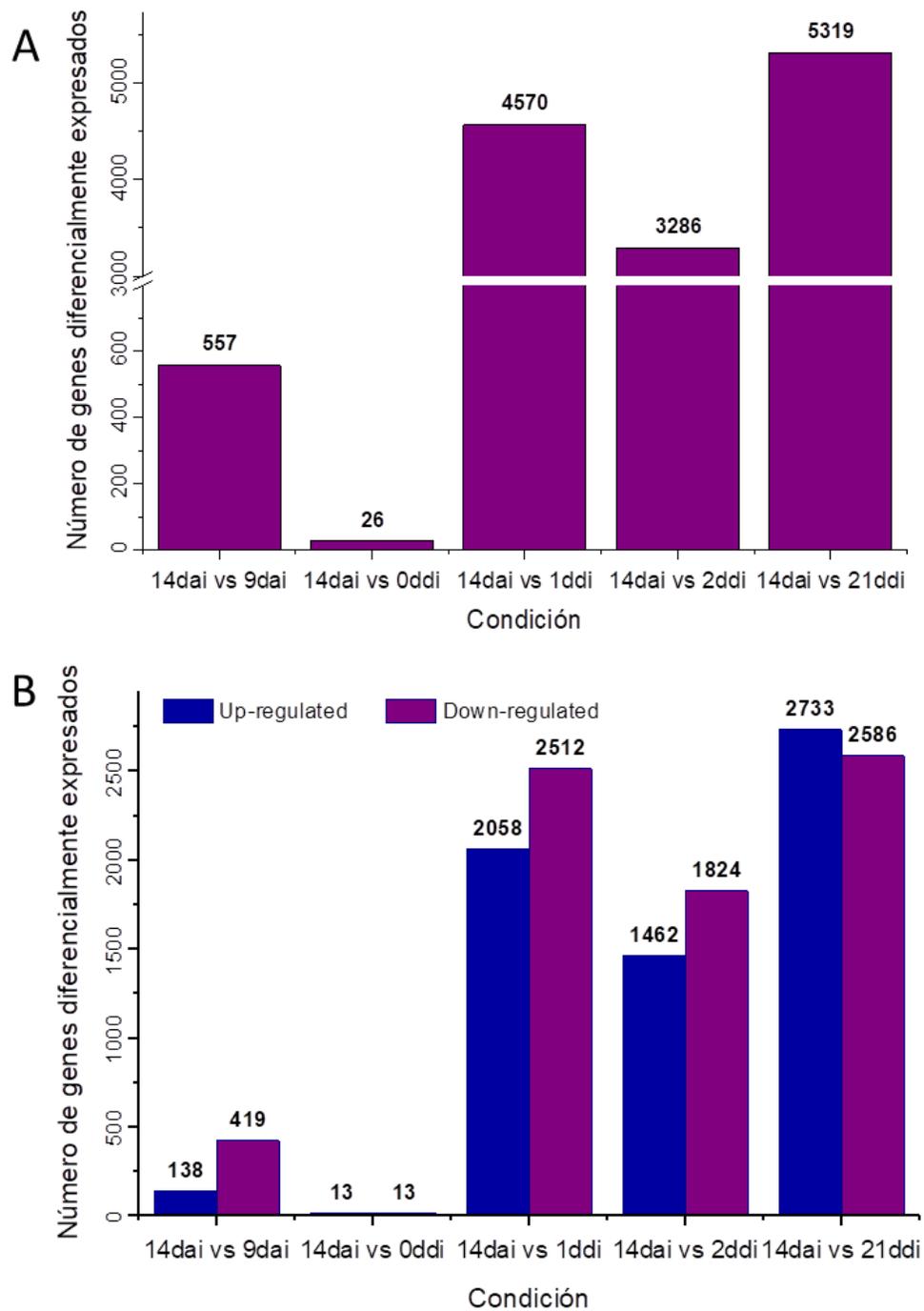


Figura 2.5. A) Número de genes diferencialmente expresados (GDE) comparados contra el día 14 dai como testigo. B) Genes regulados a la alta (up-regulated, $LFC > 0$) y a la baja (down-regulated, $LFC < 0$).

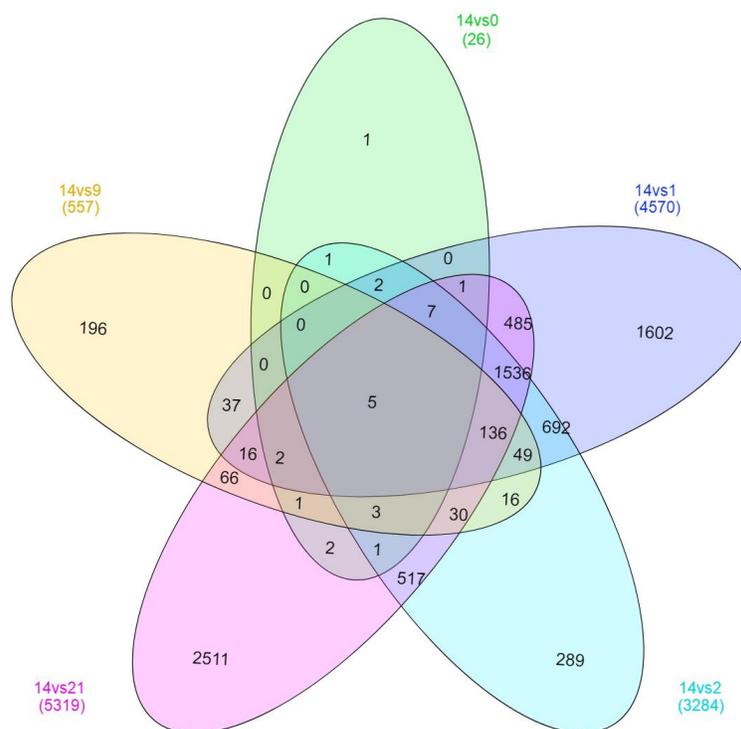


Figura 2.6. Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados (GDE) en cada una de las condiciones. Las regiones traslapadas corresponden al número de GDE compartidos entre cada punto del proceso de inducción de la ES. La parte central muestra los GDE durante todo proceso de ES.

La expresión diferencial comenzó a partir del día 1 ddi. Dentro de las familias ARF y Aux/IAA se identificaron los genes que están regulados a la alta (azul) y a la baja (rojo). En la condición 14 dai vs uno ddi se identificaron cinco ARF regulados a la baja, de los cuales, para la condición 14 dai vs 2 ddi únicamente tres permanecieron diferencialmente expresados y regulados a la baja (ARF2, ARF9 y ARF18), mientras que sobresalieron dos nuevos ARF regulados a la alta (ARF5 y ARF6). En la condición 14 dai vs 21 ddi únicamente se identificaron tres GDE: ARF5 y dos copias del ARF18.

En el caso de los Aux/IAA la aparición de los GDE también inició en el día uno ddi con tres genes regulados a la baja, de los cuales dos permanecieron en esta condición para el día 2 ddi. Es importante notar que para la condición 14 dai vs 21 ddi los GDE fueron completamente distintos a los observados en las condiciones anteriores: IAA7, IAA13, IAA33 e IAA29. De estos últimos, únicamente el IAA7 está regulado a la baja. Con estos resultados se seleccionaron aquellos genes dentro de las dos familias de interés para este

trabajo que, según lo reportado en la literatura, tienen una participación más importante durante la ES: ARF 18 (Cc06_g03950), ARF9 (Cc08_g16330), ARF6 (Cc09_g08740) y ARF5 (Cc10_g01900); así como Aux/IAA7 (Cc03_g04670) y Aux/IAA12 (Cc01_g17790), para cuantificar su expresión mediante qPCR.

Cuadro 3. Genes diferencialmente expresados durante la inducción de ES, pertenecientes a familias de interés relacionadas a auxina.

| -14vs-9 | -14vs0 | -14vs1 | -14vs2 | -14vs21 | Familia de genes [†] |
|---------|--------|---|--|---|-------------------------------|
| | | Cc00_g00210 ARF 19 Cc00_g12260 ARF 2 Cc01_g11410 ARF 4 Cc06_g03950 ARF 18 Cc08_g16330 ARF 9 | Cc00_g12260 ARF 2 Cc06_g03950 ARF 18 Cc08_g16330 ARF 9 Cc09_g08740 ARF 6 Cc10_g01900 ARF 5 | Cc01_g11020 ARF 18 Cc06_g03950 ARF 18 Cc10_g01900 ARF 5 | ARF |
| | | Cc01_g17790 P. IAA12 Cc06_g08150 P. IAA29 Cc07_g07780 IAA9 | Cc01_g17790 P. IAA12 Cc06_g08150 P. IAA29 | Cc03_g04670 IAA7 Cc03_g06400 IAA13 Cc06_g13230 IAA33 Cc08_g00560 P. IAA29 | Aux/IAA |
| | | Cc00_g01360 Prob. GH3.1 Cc00_g04490 GH3.17 Cc00_g04530 GH3.17 Cc05_g06700 Prob. GH3.5 | Cc00_g04530 GH3.17 Cc00_g04540 GH3.17 | Cc00_g01360 Prob. GH3.1 Cc00_g04490 GH3.17 Cc00_g04530 GH3.17 Cc00_g04540 GH3.17 Cc00_g04550 GH3.17 Cc05_g06700 Prob. GH3.5 Cc05_g12940 GH3.6 | GH3 |
| | | | | Cc01_g20250 YUCCA10 Cc08_g08920 YUCCA6 Cc11_g01360 YUCCA4 | YUCCA |

[†]Genes marcados en azul se encuentran regulados a la alta. Genes marcados en rojo se encuentran regulados a la baja. P=Putative. Prob=Probable.

Una vez seleccionados estos genes, se procedió a diseñar a los cebadores para qPCR. Para ello se colocó la secuencia codificante para cada gen obtenida del genoma de *C. canephora* en el programa UGENE y se procedió a buscar el código de cada gen para extraer la secuencia de nucleótidos correspondiente a cada uno. Estas secuencias se

sometieron a la herramienta Primer designing del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para obtener diversas opciones de cebadores. Se seleccionaron aquellos cebadores que amplificaran un producto de longitud aproximada de 200 pb, la cual es adecuada para qPCR y temperatura de alineación similar (Cuadro 4). De igual forma, se seleccionaron tres genes de referencia como testigo interno: la ciclofilina (CYP), el factor de elongación 1 (EF1) y la proteína ribosomal 40S.

Cuadro 4. Lista de cebadores diseñados por cada gen de interés para qPCR y tamaño del producto amplificado.

| Gen | Forward | Reverse | Producto (pb) |
|-----------|-----------------------|-------------------------|---------------|
| ARF5 | GAGCCTGAGCTGCAATCTGA | CTTGGGATGCATCACTTGGC | 223 |
| ARF6 | CCTTTGAGATCAGGCTGGCA | CGCATTCTGGGCTCTTGTA | 237 |
| ARF9 | CCAGAAGCCAACTTCGGTCT | GTTGCTCAACTTTGCTGGGG | 227 |
| ARF18 | GCAAGGCACCCCAATTTGTT | CTTCACACGAGGACCGTTCA | 204 |
| Aux/IAA12 | CTGAGGACTGCAACTCAACCA | CACTGACAGTCGTGCTCGTT | 249 |
| Aux/IAA7 | CCTAACGAGCCTGTTGTGGA | GGTGCACCATCCATGGAAAC | 227 |
| CYP | GATGGCGTGCCTCTTGTTAG | AGCCAAATTGCTTCCAGCCT | 216 |
| EF1 | GACAAGCGTGTGATGCAGAG | GTACCTGTTGCTTTTGGTATGGA | 213 |
| 40S | GGGCTTGAAGAGGAAACCCA | CCAATACCTGGCCTACCGTG | 261 |

Antes de iniciar con el análisis por qPCR se realizó un gradiente de temperatura para evaluar la amplificación de los cebadores, que fue de 54 a 60 °C. De este gradiente se seleccionaron dos temperaturas para corroborar los productos obtenidos (Fig. 2.7). Todos los cebadores amplificaron a 57 °C, a excepción del EF1 por lo que se descartó para los análisis posteriores.

Después de corroborar la amplificación de los cebadores, se realizó la cuantificación por PCR de tiempo real de las muestras de ADNc previamente sintetizado a partir de ARN de los días 14 y 9 dai y 0, 1 y 21 ddi. El nivel de expresión relativa del gen ARF5 presentó un aumento durante los primeros días en la etapa de pre-acondicionamiento, pero fue disminuyendo hasta el día 0 ddi. Posteriormente, la expresión comenzó a aumentar de manera gradual durante las primeras horas de colocarse en el medio de inducción y hasta el día 21 ddi con su valor máximo de expresión (9). Por el contrario, la expresión del gen ARF6 mostró una disminución constante en su expresión durante toda la etapa de pre-acondicionamiento hasta el día 0 ddi. Durante las primeras horas (1 ddi), la expresión de

este gen aumentó hasta alcanzar su valor máximo (2), mismo que no se mantuvo y para el día 21 ddi su valor se redujo hasta que fue prácticamente nulo. En el caso de la expresión del gen ARF9, los niveles de expresión se mantuvieron en cero durante todo el proceso, a excepción del día 21 ddi; sin embargo, el aumento fue muy ligero, sin llegar al mismo nivel que la condición de referencia (14 dai). La expresión del gen ARF18 también reflejó niveles de expresión muy bajos durante toda la inducción; sin embargo, el día 21 ddi su expresión aumentó significativamente e incluso fue el gen ARF que tuvo mayor expresión de los cuatro genes evaluados (47). En resumen, el nivel de expresión de los genes ARF5, ARF9 y ARF18 aumentó hasta el día 21 ddi por encima de los días anteriores del proceso de ES, mientras que la expresión del gen ARF6 se suprimió por completo (Fig. 2.8).

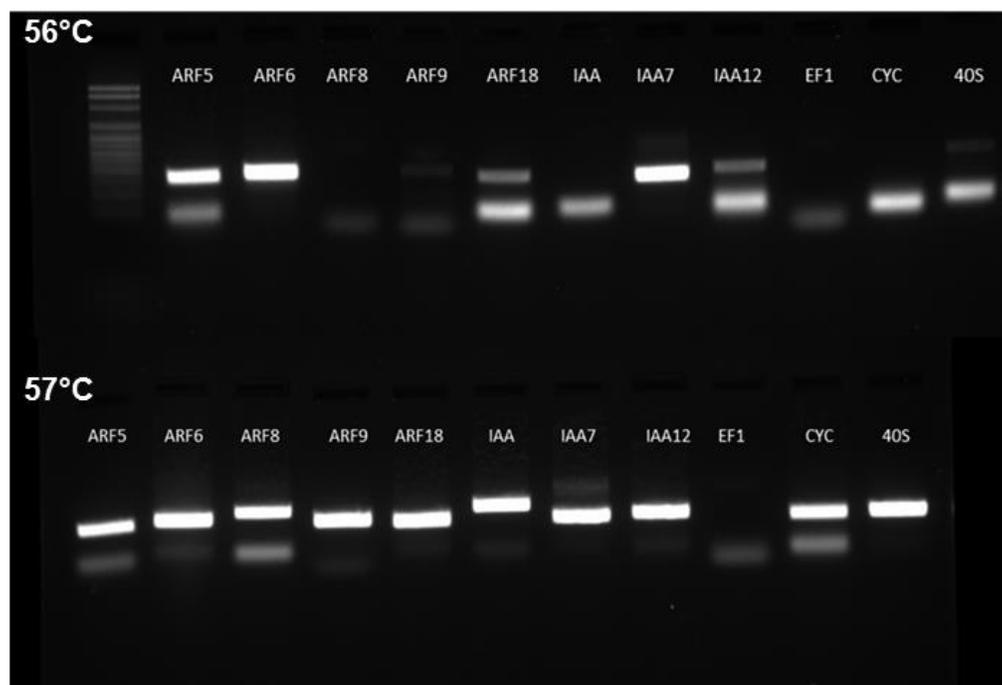


Figura 2.7. Gel de electroforesis con los productos de PCR para la evaluación de las dos temperaturas de amplificación para los cebadores sintetizados.

En el caso de la expresión del gen Aux/IAA7, la expresión fue disminuyendo conforme avanzaba el proceso de inducción de la ES, hasta desaparecer por completo su nivel en el día 21. La expresión del gen Aux/IAA12 tuvo un ligero aumento en su nivel de expresión el día 9 dai, no obstante, para el resto de los días el nivel disminuyó más de la

mitad (Fig. 2.8).

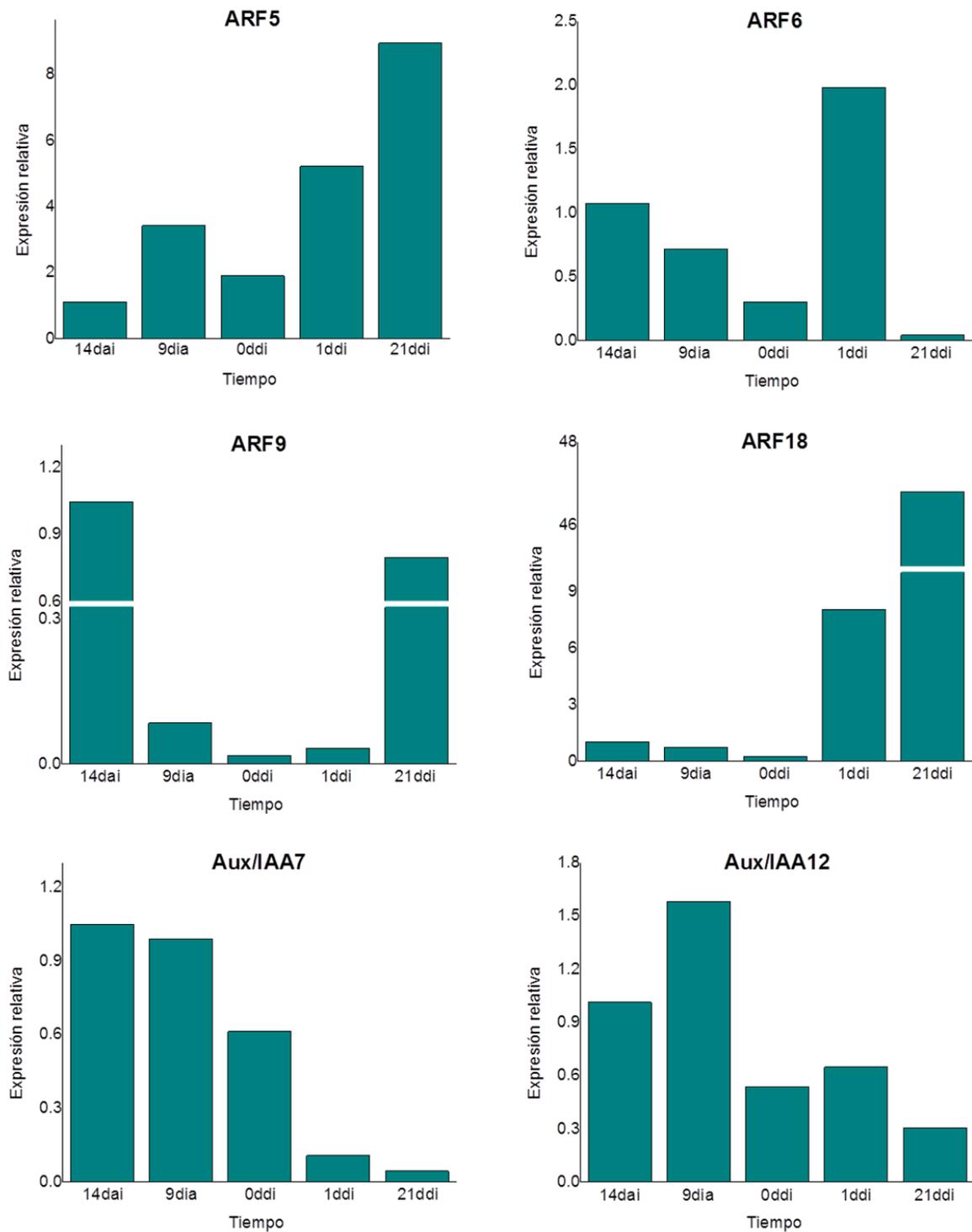


Figura 2.8. Nivel de expresión relativa de ARF y Aux/IAA, relacionados a la señalización de auxinas durante la inducción de ES en *C. canephora*.

Los resultados del nivel de expresión relativa siguen el mismo patrón que el mostrado en el mapa de calor obtenido del transcriptoma para todos genes, a excepción del ARF18 ya que de acuerdo al mapa de calor en el día 21 ddi la expresión disminuye, lo opuesto a lo observado con el análisis cuantitativo.

2.3.3. Obtención y caracterización de suspensiones celulares de *C. canephora*

Para llevar a cabo la producción de suspensiones celulares se colectaron hojas de plántulas cultivadas *in vitro* de *C. canephora*, a las cuales se les recortaron los bordes para después ser colocadas en medio de cultivo semisólido adecuado para la formación de callo. A partir del día 7 ya se observaban indicios de callo en las orillas en donde se realizó el corte. A los 21 d, los explantes ya contaban con callo abundante, mismo que se utilizó para ser transferido a matraces con el mismo medio, pero esta vez líquido, con la finalidad de generar las suspensiones celulares, las cuales se obtuvieron al cabo de 28 d después del cambio de medio (Fig. 2.9).

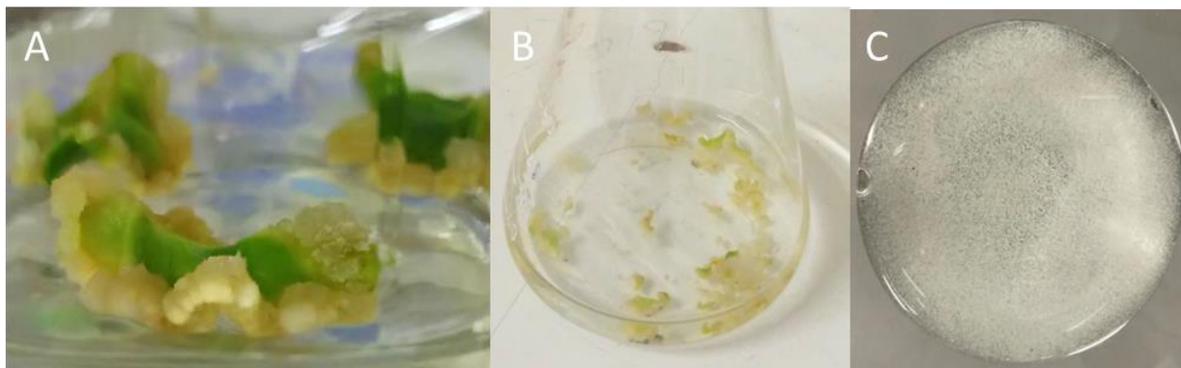


Figura 2.9. Inducción de las suspensiones celulares de *C. canephora*. A) Explantes foliares de *C. canephora* con callo a los 21 d. B) Callo friable inoculado en medio líquido. C) Suspensiones celulares a los 28 d.

Posteriormente se procedió a caracterizar el crecimiento de las suspensiones celulares. Para ello se utilizó como cultivo fuente suspensiones celulares de 21 días de edad. Se reunió el contenido de 10 matraces de suspensiones celulares y se dejaron sedimentar por 30 min. Se eliminó el sobrenadante hasta quedar con alrededor de 400 mL. Se tomaron 3 mL de esta suspensión y se inocularon en 47 mL de medio nuevo. Los cultivos se incubaron como se describe en materiales y métodos. Se tomaron muestras por

triplicado los días cero, uno y después cada dos días hasta el día 21 de cultivo. Con los resultados de la determinación de los pesos fresco y seco, la conductividad y el paquete celular se elaboraron las curvas de crecimiento que se muestran en la figura 2.10.

Como se puede observar en la figura 2.10, la fase inicial o de latencia se alargó más de lo que se esperaba. En esta fase no se observan signos de división celular activa, puesto que las células se están adaptando al nuevo medio de cultivo. A partir del día 13 se observa el inicio de la fase exponencial, con un aumento gradual de los pesos fresco y seco, el paquete celular y una disminución importante en la conductividad eléctrica (Fig. 2.10). En esta fase las células son jóvenes, están en crecimiento activo y constante división. También se observó la formación de una gran cantidad de agregados celulares al mismo tiempo que se observó una disminución en la viabilidad de las células. Los agregados celulares de gran tamaño en las suspensiones dificultaron el conteo celular y a su vez, la determinación de la viabilidad.

Se concluyó que para realizar el conteo celular será necesario realizar diluciones y posteriormente tratar las células con CrO_3 para disgregar los grumos. De igual forma, se sugiere para posteriores análisis, realizar una ligera digestión enzimática de las células y utilizar otro método de viabilidad que no sea basado en la espectrofotometría. Lo anterior es debido a que, al ser de gran tamaño los agregados celulares, se dificulta el paso del colorante de tinción hacia el centro de los mismos.

A los 23 d la cantidad de células en las suspensiones fue excesiva, sin embargo, no se observó oxidación de las mismas, ni otro tipo de daño. También cabe mencionar que durante todo el periodo de evaluación (23 d), no se llegó a observar la fase estacionaria ni de decaimiento del cultivo (Fig. 2.10). Hay diversos factores que influyen en el paso de las células por cada una de estas fases, tales como el medio de cultivo, las condiciones ambientales, entre otros. Por lo tanto, es recomendable identificar la fase estacionaria, puesto que es un indicador del momento en el cual es necesario refrescar el medio de cultivo, ya que en general la desaceleración del crecimiento se debe a una disminución de los nutrientes del medio de cultivo, un aumento en la densidad celular y a un aumento en la producción de subproductos tóxicos. Este retraso en el crecimiento pudo deberse a que la cantidad de inóculo fue muy baja (100 mg), por lo que para posteriores caracterizaciones se sugiere aumentar el peso del inóculo inicial.

Por lo anterior, y tomando en cuenta el crecimiento activo de las células y su viabilidad, se decidió realizar las transformaciones a partir del día 14 de cultivo de las suspensiones.

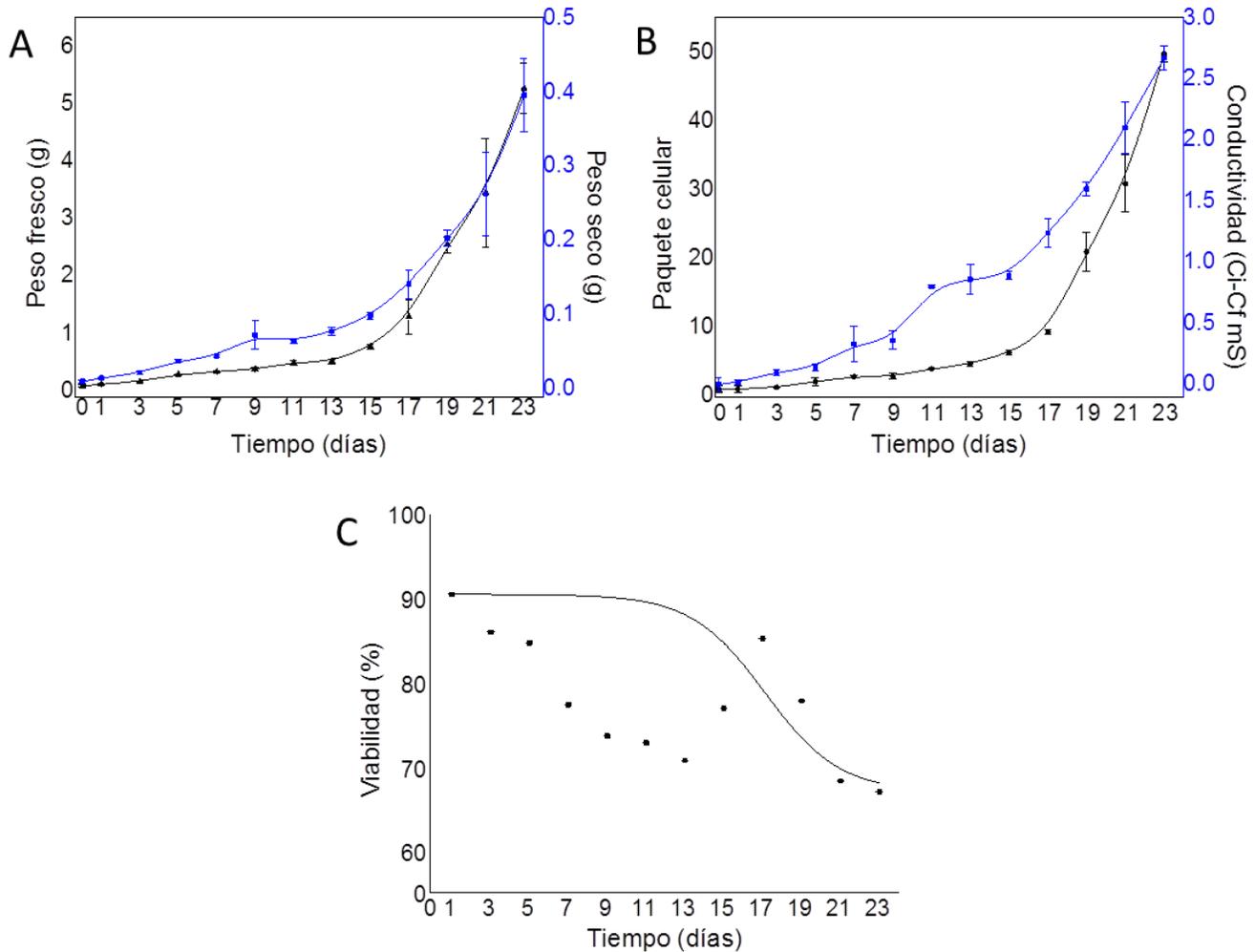


Figura 2.10. Parámetros de crecimiento celular evaluados en suspensiones celulares de *C. canephora*: A) Peso fresco y peso seco, B) paquete celular y conductividad, y C) viabilidad.

2.3.4. Transformación de las suspensiones celulares

Como herramienta, el DR5v2 permite dar seguimiento al proceso de percepción y señalización de las auxinas, por lo que se consideró como parte complementaria de este trabajo. Existe un protocolo exitoso establecido para café por agroinfiltración que garantiza la viabilidad de los explantes transformados para llevar a cabo la ES hasta el desarrollo de embriones (Canché-Moor et al., 2006). Sin embargo, al ser el DR5v2 un

plásmido pGREEN es necesaria la acción conjunta del plásmido ayudador pSOUP para poder ser replicado en *Agrobacterium*. Por lo anterior, se optó por probar otro método de transformación debido a su facilidad y éxito en *Chlamydomonas*, aunque poco reportado en otro tipo de células. Sin embargo, no se descartó el método de agroinfiltración y se realizó la clonación de ambos plásmidos para incrementar la cantidad de material para realizar las transformaciones. Este procedimiento se realizó por electroporación en células de *E. coli* DH5 α , y por choque térmico con células Top10.

En el caso de la clonación del plásmido pSOUP se utilizaron 5 y 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de tetraciclina como antibiótico de selección, mientras que para el DR5v2 se utilizaron 30 y 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina. En ambos casos, la concentración más alta fue la adecuada, ya que permitió el crecimiento de colonias aisladas y definidas. Posteriormente, se extrajo el plásmido de las colonias transformadas por dos vías: con el kit Quick Plasmid Miniprep de Invitrogen y por lisis alcalina casera. Con el primer método se garantiza un producto más limpio y puro, pero en menor concentración; mientras que con el segundo método se obtiene de manera inversa. Posterior a la extracción del plásmido, se realizó una PCR de los productos, con el fin de comprobar la identidad de los plásmidos.

Para la transformación de las suspensiones se seleccionaron células de 14 d. Se filtraron para descartar los agregados de gran tamaño que pudieran dificultar la transformación, y se tomaron alícuotas que fueron centrifugadas en tubos Eppendorf (Figura 2.11).



Figura 2.11. Proceso de transformación de suspensiones celulares. A) Suspensiones celulares de *C. canephora*. B) Filtración de suspensiones celulares. C) Suspensiones celulares, perlas de vidrio y plásmido sometidos a agitación en vortex.

Se realizó un primer ensayo de transformación en el cual se evaluaron tres concentraciones de suspensiones celulares (100, 150 y 300 mg PF) y tres tiempos de agitación con perlas de vidrio (20, 40 y 60 segundos) con una concentración de 16 μ g de plásmido DR5v2. Un día después de que se realizó la transformación, las células se observaron con un microscopio confocal: 3eGFP fue excitada a 488 nm y detectada a 498–530 nm, ntdTomato fue excitado a 561 nm y detectado a 571–630 nm. Se ajustó el voltaje de acuerdo con el testigo para evitar ver autofluorescencia.

A pesar de que en los tratamientos con 100 y 150 mg no se observó ninguna de las dos señales, en los tratamientos con 300 mg de suspensiones y tiempo de agitación de 20 y 40 s, se observó tanto la señal de la 3eGFP como la del ntdTomato. No obstante, la señal fue muy tenue y no se localizó en el núcleo como se esperaba, por lo que se propuso cultivar las células por más tiempo antes de realizar la observación al microscopio para asegurar que el plásmido se integró en el genoma de las células (Fig. 2.12).

Un aspecto que no se había considerado fue el daño ocasionado a las células durante el proceso de transformación. Así, para corroborar la integridad de las células después de realizar la transformación con la técnica de las perlas de vidrio se evaluaron cuatro tiempos de agitación: 30, 60, 90 y 120 s. Se observó que durante los primeros 60 s el daño fue mínimo, mientras que a los 90 s se observaron ligeros restos celulares y a los 120 s las células ya estaban muy disgregadas e incluso rotas (Fig. 2.13). Con estos resultados se optó por repetir el proceso de transformación, pero con mayor tiempo de agitación y la visualización al microscopio 28 d después.

En el segundo proceso de transformación se utilizaron 300 mg PF células con 60 s de agitación con perlas de vidrio. En la figura 2.14 se muestran las imágenes de suspensiones celulares 28 d después de la transformación. El panel 2.14A, corresponde al testigo sometido a agitación con las perlas, pero sin adicionar el plásmido por lo que únicamente se observó la señal de DAPI en los núcleos de las células.

Las figuras 2.14B-D corresponden a diferentes muestras de suspensiones transformadas. En el panel B se observa poca densidad de células (I/campo claro), y es posible que esta sea la razón por la que la señal de la 3eGFP (III) y la de ntdTomato (IV) se ven con menor intensidad que en los paneles C y D en los cuales hay un mayor número de células

aglomeradas que incluso dificulta la identificación de las células definidas e individuales. La señal de la 3eGFP y de ntdTomato coincide, en ciertos casos, con la localización de los núcleos (V/superposición) e incluso alrededor de ellos y en diferentes partes de las células.

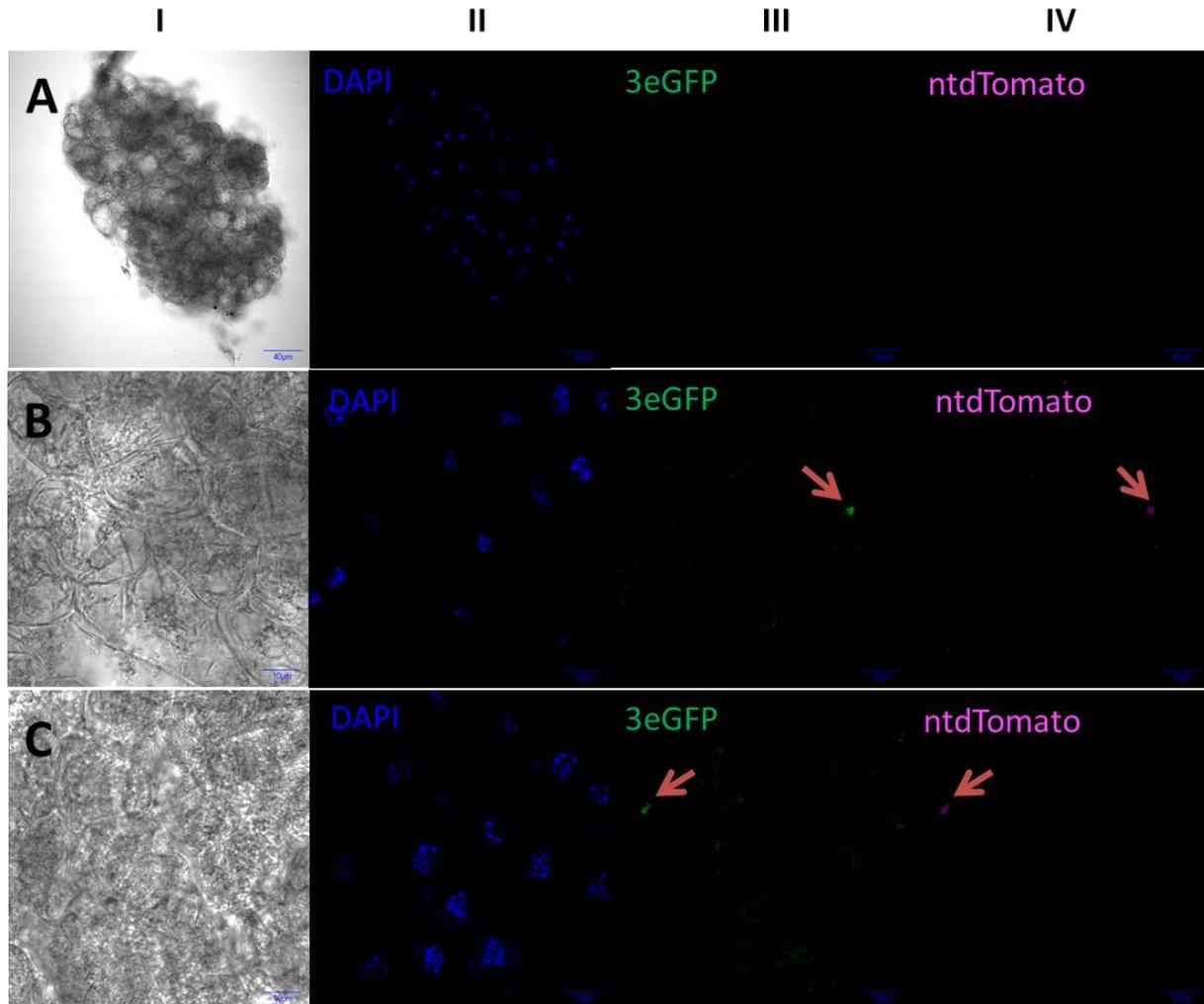


Figura 2.12. Imágenes de microscopía confocal obtenidas un día después de la transformación de suspensiones celulares con DR5v2. En las columnas se muestra el campo claro (I), tinción de núcleos con DAPI (II), las dos señales proporcionadas por el plásmido: 3eGFP (III) y ntdTomato (IV). A) Testigo. B) Suspensiones sometidas a agitación por 20 s y C) 40 s. Las flechas indican la presencia de la señal del 3eGFP y del ntdTomato.

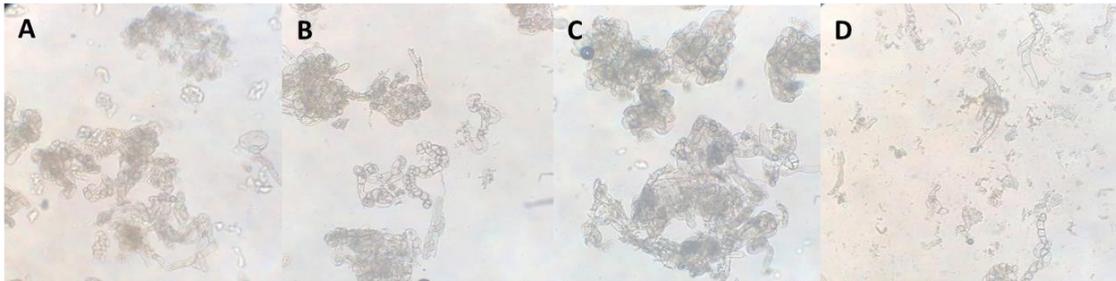


Figura 2.13. Evaluación del daño ocasionado por las perlas de vidrio sobre las suspensiones celulares, sometidas a diferentes tiempos de agitación. A) 30 s. B) 60 s. C) 90 s. D) 120 s.

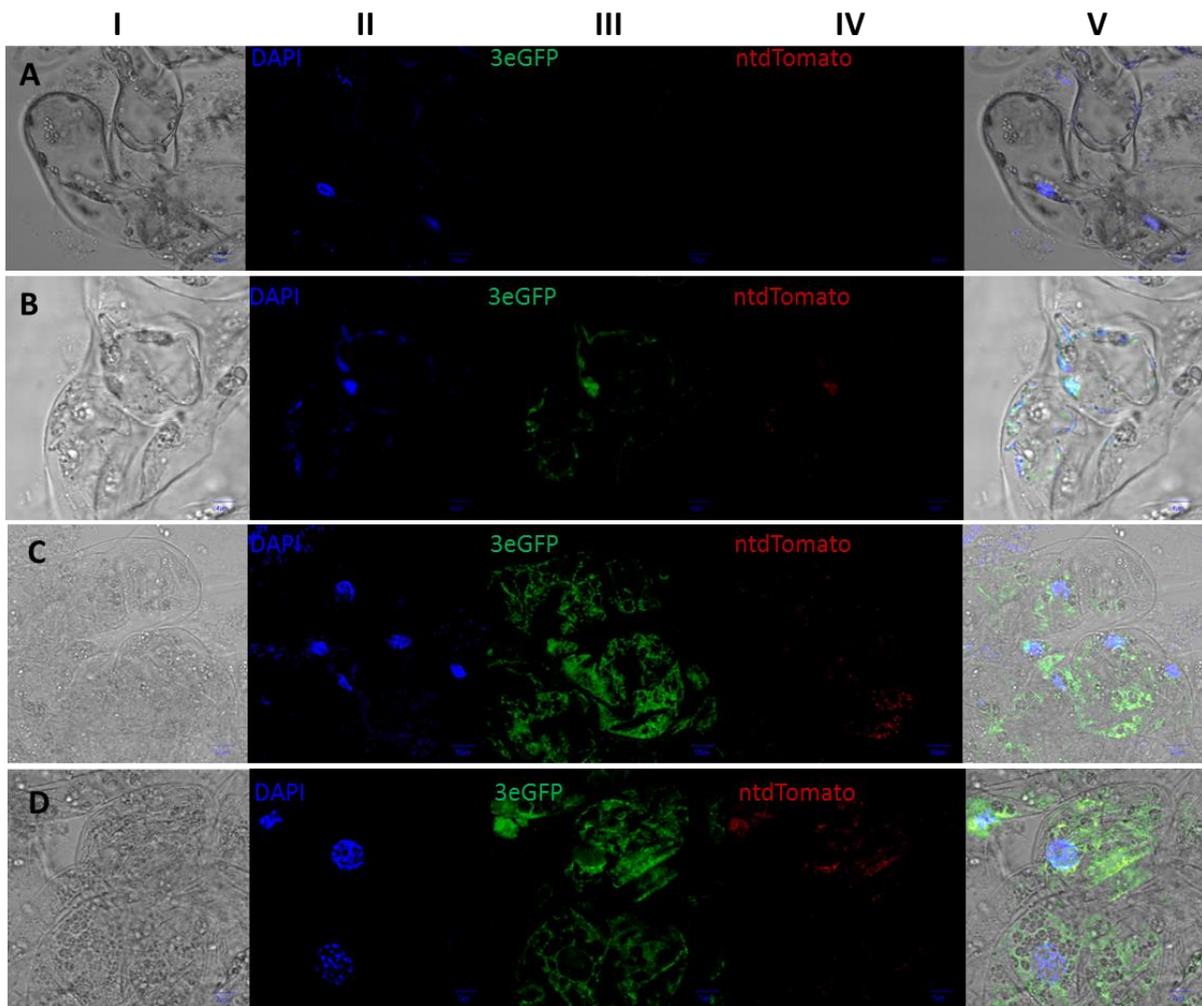


Figura 2.14. Imágenes de microscopía confocal obtenidas 28 días después de la transformación de las suspensiones celulares de *C. canephora* con DR5v2. En las columnas se muestra el campo claro (I), tinción de núcleos con DAPI (II), las dos señales proporcionadas por el plásmido: 3eGFP (III) y ndtTomato (IV), y la superposición de las anteriores (V). A) Testigo. B-D) Diferentes muestras de suspensiones transformadas.

A diferencia de las imágenes obtenidas un día después de la transformación, la señal de fluorescencia ahora es más notoria y dispersa, por lo que puede sugerir una movilización de la proteína, además de la señal nuclear que reporta la literatura. Para corroborar lo anterior en estudios posteriores, podría hacerse un seguimiento de la señal en diferentes días de muestreo. A pesar de que la señal del ntdTomato es más ligera que la de 3eGFP, ambas coinciden en el lugar de identificación, lo cual es una forma de asegurar la correcta integración del plásmido DR5v2 completo. Como paso siguiente, se espera la conversión de las suspensiones transformadas en un sistema embriogénico.

2.3.5. Obtención de protoplastos a partir de suspensiones celulares

Para la transformación de *C. canephora*, además de las suspensiones celulares y explantes foliares, se consideró utilizar protoplastos. Para lo anterior, el primer paso fue obtener un protocolo eficiente para el aislamiento de los mismos. Después de probar diversos explantes y combinaciones de enzimas, el método más exitoso fue la digestión enzimática con celulasa y pectinasa de suspensiones celulares durante 2 h (Fig. 2.15 A, B).

Se monitoreó el proceso de digestión cada 30 min hasta las 2 h cuando se observó gran cantidad de protoplastos liberados ($750,000$ protoplastos mL^{-1}). Sin embargo, aún se apreciaban grumos de células de gran tamaño (Fig 2.15 C) por lo que se procedió a separarlos mediante un filtrado con malla de $100 \mu\text{m}$ (Fig 2.15 D).

Después del filtrado la cantidad de protoplastos disminuyó a $690,000$. Posteriormente, se lavaron y recuperaron los protoplastos por centrifugación (Fig 2.15 E). Para corroborar que los protoplastos quedaron en la pastilla se tomó una muestra del sobrenadante para visualizar al microscopio (Fig 2.15 F) y solo se observaron algunos restos celulares. Los protoplastos se localizaron exitosamente en la pastilla (Fig 2.15 G), con una concentración de $510,000 \text{ mL}^{-1}$. Los protoplastos se obtuvieron íntegros, con forma definida, sin daño visible (Fig 2.15 H), y con un porcentaje de viabilidad de 92%.

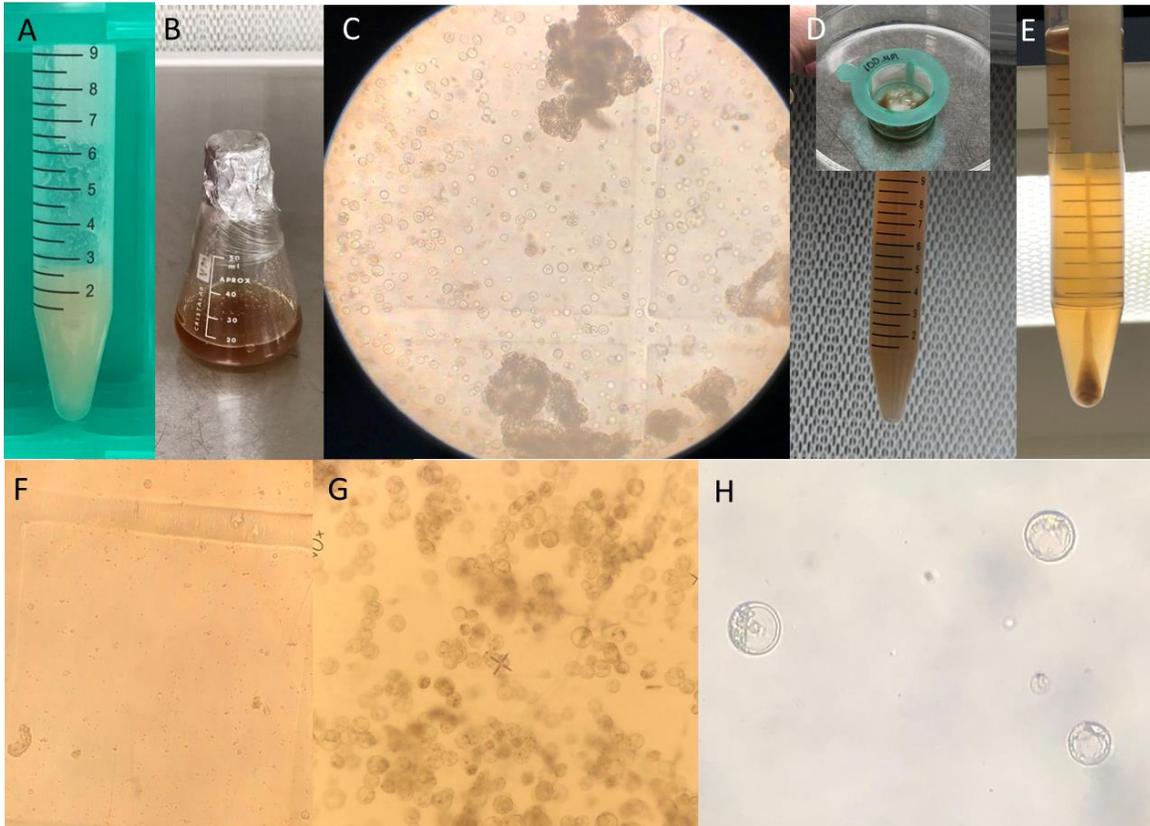


Figura 2.15. Proceso de obtención de los protoplastos. A) 2.5 mL de paquete celular de suspensiones celulares. B) Digestión enzimática. C) Muestra a las 2 h de digestión, antes de la filtración ($750,000$ protoplastos mL^{-1}). D) Filtración en malla de $100 \mu\text{m}$ ($690,000$ protoplastos mL^{-1}). E) Muestra filtrada y centrifugada; en la pastilla se concentran los protoplastos. F) Muestra de sobrenadante. G) Muestra de la pastilla de protoplastos resuspendida en el medio de cultivo ($510,000$ protoplastos mL^{-1}). H) Acercamiento.

2.4. DISCUSIÓN

Con la liberación del genoma de *C. canephora* se ampliaron los horizontes para realizar estudios que impliquen el conocimiento de la secuencia de sus genes. Esto desde luego amplió el número de las preguntas que se pueden realizar. Una de las más importantes preguntas de hoy en día se centra alrededor de ¿qué determina el cambio del programa genético de una célula somática para dar lugar a una célula embriogénica?

Si bien el conocimiento de los cambios en el programa genético de las células vegetales ha crecido exponencialmente en los últimos años (Sisodia y Bhatla, 2018; Kumar y van Staden, 2017; Fehér et al., 2016; Loyola-Vargas et al., 2016; Loyola-Vargas y Ochoa-

Alejo, 2016), aún existen diversos aspectos del proceso que no se conocen, por lo que no tenemos un modelo que explique de forma completa el proceso de ES.

Entre las nuevas tecnologías, la de RNA-Seq ha permitido tener un panorama más completo sobre los genes que se están expresando durante el proceso de inducción de la ES. De esta manera se está pudiendo identificar el comportamiento y el perfil de expresión de los genes que se expresan a lo largo de la inducción de la ES. En la mayoría de los estudios realizados hasta ahora empleando transcriptomas, los cambios más importantes y determinantes inician al final de la etapa de inducción de la ES y al inicio del desarrollo de las primeras estructuras (Enríquez-Valencia et al., 2019; Cao et al., 2017; Chu et al., 2017; Jamaluddin et al., 2017b; Cheng et al., 2016; Shi et al., 2016; Tao et al., 2016; Trontin et al., 2016).

Los genes ARF y Aux/IAA juegan un papel primordial en la percepción y señalización de las auxinas y el consiguiente desencadenamiento de las respuestas celulares. No obstante, la importancia de los genes ARFs y Aux/IAAs en los diversos procesos de desarrollo vegetal, aún siguen sin ser caracterizados de forma sistemática. Por lo tanto, su estudio en diferentes modelos vegetales permite ampliar el conocimiento de su regulación, su expresión y función, para poder formular mejores hipótesis relacionadas con el crecimiento y el desarrollo de las plantas, específicamente en el proceso de la ES (Li et al., 2015).

Los patrones de expresión de los genes ARF no son estáticos, es decir, diferentes ARFs experimentan cambios dinámicos en su patrón de expresión a lo largo del desarrollo embrionario y pueden variar de una célula a otra. Debido a que los genes ARFs tienen distintas funciones, las auxinas desencadenan diferentes respuestas y a su vez regulan diferentes familias de genes. En otras palabras, los ARFs encontrados en diferentes tipos de células, son capaces de producir distintas respuestas ante la presencia de las auxinas (Rademacher et al., 2011).

A pesar de la dinámica en la expresión de estas familias de genes, diversos estudios han permitido identificar la función que tienen algunos de los 23 ARFs y los 29 Aux/IAAs ante la presencia de auxinas en diferentes procesos del desarrollo vegetal gracias a la generación de mutantes de pérdida o ganancia de función. Por mencionar algunos, los

ARF1 y ARF2 controlan la senescencia foliar y la abscisión de órganos florales. El ARF3 interactúa con proteínas KANADI para formar un complejo funcional importante para la especificación de la polaridad foliar, y con AGAMUS y APETALA2 para la determinación del meristemo floral. El ARF4 interviene en la polaridad de los órganos, mientras que el ARF5 es crítico para la formación del eje y la raíz embriogénica, el desarrollo de las flores, así como de parte del tejido vascular. Por su parte, ARF8 regula la fertilización y el desarrollo de frutos y de manera similar al ARF6, actúan en la maduración de las flores. Los ARF19 y ARF7 actúan de manera redundante en el control de la expansión foliar y el crecimiento de las raíces laterales (Chen et al., 2017; Li et al., 2016; Weijers y Wagner, 2016; Li et al., 2015).

Por otro lado, mutaciones en los Aux/IAA3, Aux/IAA6, Aux/IAA7 y Aux/IAA17 producen fenotipos de hipocotilo corto y deformidades en las hojas; mutaciones en los Aux/IAA12, Aux/IAA14 y Aux/IAA28 provocan anomalías en las raíces y mutaciones en los Aux/IAA18 y Aux/IAA19 en los hipocotilos (Liscum y Reed, 2002).

Tanto los ARFs como los Aux/IAAs funcionan como reguladores transcripcionales. Mientras que los Aux/IAAs funcionan como represores de los genes de respuesta a auxina, los ARF pueden activar, tanto como reprimir, la transcripción dependiendo de la estructura de la región media de la proteína. Los Aux/IAA codifican proteínas nucleares de vida corta que actúan como represores de la activación transcripcional mediada por auxinas y, aunque no todos los Aux/IAAs responden a las auxinas, aquellos que sí lo hacen difieren en cuanto a su sensibilidad y el tipo de respuesta ante este RC. De esta forma, los Aux/IAA controlan la expresión por medio de la actividad de los ARF a los que se unen con diferente nivel de especificidad, sin embargo, la expresión de un conjunto determinado de ARFs con Aux/IAAs varía de una especie a otra, e incluso de un tipo de tejido a otro (Jain y Khurana, 2009; Paponov et al., 2008; Liscum y Reed, 2002).

A pesar de que no se conoce a ciencia cierta las combinaciones de unión entre los ARFs y los Aux/IAAs, el caso mayormente estudiado es el de la interacción de los genes MONOPTEROS (MP/ARF5) y BODENLOS (BDL/IAA12), pues son efectores importantes de la acción de las auxinas en el embrión, cuyas mutantes producen defectos en el patrón embriogénico, en particular en la formación del eje embrionario, la formación de los cotiledones y de los meristemos apicales y radicales. La proteína BDL/IAA12

normalmente es degradada en respuesta a auxinas, por lo tanto, una mutación en BDL/IAA12 evita su degradación provocando fenotipos embriogénicos anormales. Hasta ahora, se desconocen los mecanismos de regulación de las auxinas por parte de otros ARF relacionados directamente con la embriogénesis. Además de las mutantes MP/ARF5, ningún otro fenotipo anormal de embriones ha sido encontrado en otras mutantes individuales de ARFs (Mironova et al., 2017; Weijers y Wagner, 2016).

En nuestros resultados se observó una disminución en la expresión de Aux/IAA12 a medida que el ARF5 aumenta. En este sentido, Mironova (2017) menciona que la degradación de Aux/IAA12, asociada con la señalización del ARF5, es necesaria si las señales de las auxinas se deben traducir a programas de morfogénesis y desarrollo celular. Además, se ha determinado que MP/ARF5 puede autorregular su transcripción y la de BDL/IAA12, así como la de otros genes Aux/IAA, mediante la acción de las auxinas. De esta forma se infiere que las auxinas funcionan como un desencadenante provocando la degradación de BDL/IAA12 (Chandler, 2016).

Wojcikowska et al., (2017) observó que los ARFs que más se expresan son los ARF5, ARF6, ARF8, ARF10, ARF16 y ARF17 siendo los ARF5 y ARF10 los que presentan una mayor acumulación de transcritos; mientras que los que menos se expresan son los ARF1, ARF2, ARF3, ARF11 y ARF18. De manera similar, nuestros resultados de expresión diferencial muestran que los mayores niveles de expresión los presentan los genes ARF5 y ARF6, al igual que también coincide con el hecho de que los ARF2 y ARF18 son regulados a la baja. Sin embargo, en la comprobación por qPCR, el ARF18 mostró tener los niveles de expresión relativa más altos, seguido del ARF5. Otra similitud encontrada fue que el ARF18 tuvo una reducción de su actividad en las etapas tempranas de la inducción de la ES, al igual que lo observado en esta investigación, si bien para el último día del proceso de inducción incremento de manera considerable sus niveles de expresión. Por otro lado, el gen ARF5 también mostró una expresión más elevada y el nivel de transcritos incrementó en la etapa temprana de la ES. Esta observación sugiere que existe una estrecha relación entre este gen con la transición embriogénica de las células.

En relación con la expresión de los genes Aux/IAAs, Yang et al., (2012) observaron que la mayoría de éstos disminuyeron durante la etapa de transición a la embriogénesis, aunque

estos aumentaron durante el desarrollo de los embriones. De la misma forma, nuestros resultados indican que Aux/IAA7 y Aux/IAA12 disminuyen su expresión de forma gradual a medida que avanza el proceso de inducción de la ES, casi hasta valores cercanos a cero.

Con el reportero DR5 es posible relacionar la unión de los ARF. Para 10 ARF distintos se identificó que hay diferencias en las posiciones 5 y 6 del motivo AuxRE TGTCTC, por lo que el núcleo TGTC es suficiente para la unión de los ARF con el ADN. Actualmente se sabe que los ARF1 y ARF5 se unen con mayor afinidad al motivo AuxRE TGTCGG, con el cual se desarrolló el promotor DR5v2. Así pues, la eficiencia de la unión de los ARF varía de un motivo AuxRE a otro, por lo que el DR5 podría dar información únicamente de cierto grupo de respuestas a auxinas. Sin embargo, al utilizar el promotor DR5v2 podemos visualizar la actividad de los ARF en la activación de la transcripción génica después de la degradación de los Aux/IAA inducida por la señalización de las auxinas (Chandler, 2016). Al regenerar las suspensiones celulares transformadas con dicho promotor, será posible dar seguimiento al proceso de señalización de las auxinas por acción de los ARFs y Aux/IAAs durante las diferentes etapas del proceso embriogénico de *C. canephora*.

Como información complementaria obtenida, del total de genes diferencialmente expresados únicamente cinco se expresan de manera diferencial y constante durante todo el proceso de ES. Estos cinco genes, a excepción de la proteína hipotética no identificada, están relacionados con procesos de estrés tanto biótico como abiótico; sin embargo, se relacionan indirectamente con el proceso de embriogénesis y desarrollo vegetal, como es el caso de las proteínas SIS (Salt Induced Serine rich) y adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily. Un dato interesante acerca de esta proteína es que se determinó que tiene una participación importante en la función protectora del endospermo sobre el embrión (en conjunto con otros factores y proteínas) en *Brassica napus* (Lorenz et al., 2014).

En el caso de las proteínas con dominio NAC, se ha detectado que son una gran familia de factores de transcripción que están involucradas en diferentes procesos del desarrollo vegetal. A pesar de que tienen un dominio de unión al ADN muy conservado, su diversificación ha dado origen a las múltiples y diversas funciones que tienen y, recientemente han recibido especial atención debido a su relación con respuestas al

estrés, tanto biótico como abiótico, así como a la interacción que tienen con ciertos RC (Puranik et al., 2012). De manera similar a lo determinado en este trabajo, en el estudio de la ES en callos de *Citrus sinensis* se identificó una proteína con dominio NAC como factor de transcripción diferencialmente expresado (Ge et al., 2012). En otro estudio que buscaba identificar los genes que son el blanco de los Baby Boom (BBM), se determinó uno de ellos con dominio NAC, si bien fue en tejidos diferentes a embriones. Sin embargo, hay que destacar la importancia que tienen los BBM durante el desarrollo celular y la embriogénesis en plantas (Passarinho et al., 2008).

Una de las primeras respuestas que tienen los explantes durante el proceso de inducción de ES en *C. canephora* es la formación de callo o masa de células indiferenciadas alrededor del explante. Ikeuchi et al., (2013) menciona que después de hacer un corte a los tallos de *Arabidopsis* se inicia un proceso de proliferación en la zona de la herida en el cual las auxinas tienen un papel importante, pues se acumula en la zona de corte y esto a su vez induce la expresión de una proteína con dominio NAC (ANAC071). De esta manera, al reprimir la acción de la proteína NAC se suprimiría la proliferación celular en la zona del corte; por ello, estas proteínas son reguladores esenciales en el proceso de regeneración vegetal.

Ahora bien, las proteínas mitogen-activated kinase kinase kinase (MAPKKK) juegan papeles importantes en la transducción de señales intra y extra celulares relacionadas al estrés y al desarrollo celular vegetal. Se ha demostrado que una proteína MAPKKK (MEKK1) regula diversos procesos, dentro de ellos la homeostasis de especies reactivas de oxígeno y la respuesta a RC en *Arabidopsis* (Nakagami et al., 2006). Otros procesos en los cuales se ha detectado la participación de estas proteínas son la senescencia foliar, la división celular, y la formación de raíces laterales, entre otros (Xu y Zhang, 2015).

En resumen, los resultados mostrados en esta investigación confirman que diversos ARF controlan la transición embriogénica que sufren las células somáticas. No obstante, de todos los ARF que participan, el ARF5 es el que parece tener una particular importancia para que se lleve a cabo la ES.

CAPÍTULO III

3. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1. CONCLUSIONES

Existen diversos procesos del desarrollo vegetal relacionados con la señalización de las auxinas por parte de genes de las familias ARF y Aux/IAA. El papel que tienen cada uno de estos genes puede variar de una especie a otra y en el género *Coffea*, específicamente en la especie *canephora*, no se tienen registros de la expresión de los mismos durante la ES.

Como un primer acercamiento, con el uso de herramientas bioinformáticas fue posible identificar en este trabajo aquellos ARF y Aux/IAA expresados diferencialmente durante todo el proceso de inducción de la ES. De una familia de 22 genes de ARF encontrados en *C. canephora*, 17 se expresan en nuestro modelo de estudio; ocho de ellos se encuentran diferencialmente expresados en diferentes puntos del proceso de ES. En el caso de los 14 auxin-responsive genes (Aux/IAA), todos se expresan; sin embargo, solo siete tienen una expresión diferencial.

Con el análisis cuantitativo por qPCR, se determinó que los genes ARF18 y ARF5 tienen los mayores niveles de expresión relativa al cabo de 21 ddi. Por el contrario, los genes Aux/IAA7 y Aux/IAA12 disminuyen su expresión a valores casi cercanos a cero en las etapas finales del proceso.

Como parte complementaria, se caracterizó el cultivo de suspensiones celulares y se estableció un protocolo para su transformación con el promotor de respuesta a las auxinas DR5v2, el cual permitirá la localización espacio-temporal de la ruta de señalización del AIA en la cual intervienen los ARF y Aux/IAA.

Además, con el procesamiento de los datos transcriptómicos será posible la búsqueda futura de genes implicados en diversos procesos, así como la visualización de su comportamiento a lo largo de las diferentes etapas del proceso de ES. De esta forma, con los resultados obtenidos, se amplía el panorama para posteriores estudios encaminados a comprender el proceso de ES.

3.2. PERSPECTIVAS

Realizar el perfil transcriptómico de la familia completa de ARF y Aux/IAA durante todo el proceso de inducción, así como en los diferentes estadios embriogénicos.

Dar seguimiento al proceso de respuesta a las auxinas mediante el promotor sintético DR5v2, durante las diferentes etapas de la ES.

Determinar si existe una correlación entre los sitios de acumulación de auxina reportados en el laboratorio previamente, con los sitios en los que se efectúa la respuesta a la misma por medio del DR5v2.

Determinar en qué medida interaccionan las auxinas y las citocininas durante la inducción de la ES.

BIBLIOGRAFÍA

- Afolabi, A. S., B. Worl, J. Snape y P. Vain (2013). Novel pGreen/pSoup dual-binary vector system in multiple T-DNA co-cultivation as a method of producing marker-free (clean gene) transgenic rice (*Oriza sativa* L) plant. *African Journal of Biotechnology*, 4, 531-540.
- Ahn, Y. K., S. Tripathi, J. H. Kim, Y. I. Cho, H. E. Lee, D. S. Kim, J. G. Woo y M. C. Cho (2014). Transcriptome analysis of *Capsicum annuum* varieties Mandarin and Blackcluster: Assembly, annotation and molecular marker discovery. *Gene*, 533, 494-499.
- Anders, S., D. J. McCarthy, Y. Chen, M. Okoniewski, G. K. Smyth, W. Huber y M. D. Robinson (2013). Count-based differential expression analysis of RNA sequencing data using R and Bioconductor. *Nature Protocols*, 8, 1765-1786.
- Anders, S., P. T. Pyl y W. Huber (2015). HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 31, 166-169.
- Ayil-Gutiérrez, B. A., R. M. Galaz-Ávalos, E. Peña-Cabrera y V. M. Loyola-Vargas (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998.
- Barbez, E. y J. Kleine-Vehn (2013). Divide Et Impera-cellular auxin compartmentalization. *Current Opinion in Plant Biology*, 16, 78-84.
- Bargmann, B. O. R., S. Vanneste, G. Krouk, T. Nawy, I. Efroni, E. Shani, G. Choe, J. Friml, D. C. Bergmann, M. Estelle y K. D. Birnbaum (2013). A map of cell type-specific auxin responses. *Molecular Systems Biology*, 9, 688.
- Bennett, T. y O. Leyser, (2014). The auxin question: A philosophical overview, en: *Auxin and Its Role in Plant Development*, Zazimalová, E., J. Petrášek y E. Benková, (eds). Springer. Vienna. pp. 3-19.
- Bhatla, S. C., (2018). Auxins, en: *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Bhatla, S. C. y A. Lal, (eds). Springer. Singapore. pp. 569-601.
- Canché-Moor, R. L. R., A. Kú-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, 373-377.
- Cao, A., Y. Zheng, Y. Yu, X. Wang, D. Shao, J. Sun y B. Cui (2017). Comparative

-
- transcriptome analysis of SE initial dedifferentiation in cotton of different SE capability. *Scientific Reports*, 7, 8583.
- Cetz-Chel, J. E. y V. M. Loyola-Vargas, (2016). Transcriptome profile of somatic embryogenesis, en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 39-52.
- Chandler, J. W. (2016). Auxin response factors. *Plant, Cell & Environment*, 39, 1014-1028.
- Chen, Z., Y. Yuan, D. Fu, C. Shen y Y. Yang (2017). Identification and expression profiling of the auxin response factors in *Dendrobium officinale* under abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 18, 927.
- Cheng, W. H., H. G. Zhu, W. G. Tian, S. H. Zhu, X. P. Xiong, Y. Q. Sun, Q. H. Zhu y J. Sun (2016). De novo transcriptome analysis reveals insights into dynamic homeostasis regulation of somatic embryogenesis in upland cotton (*G. hirsutum* L.). *Plant Molecular Biology*, 92, 279-282.
- Chu, Z., J. Chen, J. Sun, Z. Dong, X. Yang, Y. Wang, H. Xu, X. Zhang, F. Chen y D. Cui (2017). De novo assembly and comparative analysis of the transcriptome of embryogenic callus formation in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *BMC Plant Biology*, 17, 244.
- DaMatta, F. M. y J. D. C. Ramalho (2006). Impacts of drought and temperature stress on coffee physiology and production: a review. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 55-81.
- Denoeud, F., L. Carretero-Paulet, A. Dereeper, G. Droc, R. Guyot, M. Pietrella, C. Zheng, A. Alberti, F. Anthony, G. Aprea, J. M. Aury, P. Bento, M. Bernard, S. Bocs, C. Campa, A. Cenci, M. C. Combes, D. Crouzillat, C. Da Silva, L. Daddiego, F. De Bellis, S. Dussert, O. Garsmeur, T. Gayraud, V. Guignon, K. Jahn, V. Jamilloux, T. Joët, K. Labadie, T. Lan, J. Leclercq, M. Lepelley, T. Leroy, L. T. Li, P. Librado, L. Lopez, A. Muñoz, B. Noel, A. Pallavicini, G. Perrotta, V. Poncet, D. Pot, Priyono, M. Rigoreau, M. Rouard, J. Rozas, C. Tranchant-Dubreuil, R. VanBuren, Q. Zhang, A. C. Andrade, X. Argout, B. Bertrand, A. De Kochko, G. Graziosi, R. J. Henry, Jayarama, R. Ming, C. Nagai, S. Rounsley, D. Sankoff, G. Giuliano, V. A. Albert, P. Wincker y P. Lashermes (2014). The coffee genome provides insight into the convergent evolution of caffeine biosynthesis. *Science*, 345, 1181-1184.
- Dereeper, A., S. Bocs, M. Rouard, V. Guignon, S. Ravel, C. Tranchant-Dubreuil, V. Poncet, O. Garsmeur, P. Lashermes y G. Droc (2015). The coffee genome hub: a resource for coffee genomes. *Nucleic Acids Research*, 43, D1028-D1035.
-

- Dubas, E., J. Moravciková, J. Libantová, I. Matusiková, E. Benková, I. Zur y M. Krzewska (2014). The influence of heat stress on auxin distribution in transgenic *B. napus* microspores and microspore-derived embryos. *Protoplasma*, 251, 1077-1087.
- Dublin, P. (1981). Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25, 237-242.
- Elbl, P., B. S. Lira, S. C. S. Andrade, L. Jo, A. L. W. dos Santos, L. L. Coutinho, E. S. Floh y M. Rossi (2015). Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 120, 903-915.
- Enríquez-Valencia A. J., F. A. Vázquez-Flota, J. R. Ku-Cauich y R. M. Escobedo-GraciaMedrano, (2019). Differentially expressed genes during the transition from early to late development phases in somatic embryo of banana (*Musa* spp. AAB group, Silk subgroup) cv. Manzano, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1514-6>. (En prensa).
- Fehér, A., D. Bernula y K. Gémes, (2016). The many ways of somatic embryo initiation, en: *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer International Publishing. Cham. pp. 23-37.
- Fendrych, M., J. Leung y J. Friml (2016). TIR1/AFB-Aux/IAA auxin perception mediates rapid cell wall acidification and growth of *Arabidopsis hypocotyls*. *eLife*, 5, e19048.
- Gao, Y. y Y. Zhao, (2014). Auxin biosynthesis and catabolism, en: *Auxin and Its Role in Plant Development*, Zazimalová, E., J. Petrášek y E. Benková, (eds). Springer. Vienna. pp. 21-38.
- Garber, M., M. G. Grabherr, M. Guttman y C. Trapnell (2011). Computational methods for transcriptome annotation and quantification using RNA-seq. *Nature Methods*, 8, 469-477.
- Ge, X. X., L. J. Chai, Z. Liu, X. M. Wu, X. X. Deng y W. W. Guo (2012). Transcriptional profiling of genes involved in embryogenic, non-embryogenic calluses and somatic embryogenesis of Valencia sweet orange by SSH-based microarray. *Planta*, 236, 1107-1124.
- Góngora-Castillo, E., G. I. Nic-Can, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas, (2018). Elaboration of transcriptome during the induction of somatic embryogenesis, en: *Plant Cell Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer New York. New York, NY. pp. 411-427.

- Goodwin, S., J. D. McPherson y W. R. McCombie (2016). Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17, 333-351.
- Hagihara, S., R. Yamada, K. Itami y K. U. Torii (2019). Dissecting plant hormone signaling with synthetic molecules: perspective from the chemists. *Current Opinion in Plant Biology*, 47, 32-37.
- Hatanaka, T., T. Azuma, N. Uchida y T. Yasuda, (1995). Effect of plant hormones on somatic embryogenesis of *Coffea canephora*, en: 16^è Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Anonymus, Association Scientifique Internationale du Café. Paris. pp. 790-797.
- Hayashi, K. i., S. Nakamura, S. Fukunaga, T. Nishimura, M. K. Jenness, S. MurphyAngus, H. Motose, H. Nozaki, M. Furutani y T. Aoyama (2014). Auxin transport sites are visualized in planta using fluorescent auxin analogs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111, 11557-11562.
- Heberle, H., G. V. Meirelles, F. R. da Silva, G. P. Telles y R. Minghim (2015). InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. *BMC Bioinformatics*, 16, 169.
- Hellens, R. P., A. C. Allan, E. N. Friel, K. Bolitho, K. Grafton, M. D. Templeton, S. Karunairetnam, A. P. Gleave y W. A. Laing (2005). Transient expression vectors for functional genomics, quantification of promoter activity and RNA silencing in plants. *Plant Methods*, 1, 13.
- Herman, E. B. y G. J. Haas (1975). Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10, 588-589.
- Hurny, A. y E. Benková, (2017). Methodological advances in auxin and cytokinin biology, en: *Auxins and Cytokinins in Plant Biology: Methods and Protocols*, Dandekar, T. y M. Naseem, (eds). Springer. New York. pp. 1-29.
- Ikeuchi, M., K. Sugimoto y A. Iwase (2013). Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell*, 25, 3159-3173.
- Iquebal, M. A., S. Jaiswal, C. S. Mukhopadhyay, C. Sarkar, A. Rai y D. Kumar, (2015). Applications of bioinformatics in plant and agriculture, en: *PlantOmics: The Omics of Plant Science*, Barh, D., M. S. Khan y E. Davies, (eds). Springer. India. pp. 755-789.
- Jain, M. y J. P. Khurana (2009). Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *The FEBS Journal*, 276, 3148-3162.

- Jamaluddin, D., N. M. Noor y H. H. Goh (2017a). Transcriptome analysis of *Carica papaya* embryogenic callus upon de-etiolated 1 (DET1) gene suppression. *Genomics Data*, 12, 120-121.
- Jamaluddin, N. D., N. Mohd Noor y H. H. Goh (2017b). Genome-wide transcriptome profiling of *Carica papaya* L. embryogenic callus. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23, 357-368.
- Kumar, V. y J. van Staden (2017). New insights into plant somatic embryogenesis: an epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 194.
- Langmead, B. y S. L. Salzberg (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*, 9, 357-359.
- Li, S.-B., W.-Z. Ou Yang, X.-J. Hou, L.-L. Xie, C.-G. Hu y J.-Z. Zhang (2015). Genome-wide identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) gene family in sweet orange (*Citrus sinensis*). *Frontiers in Plant Science*, 6, 119.
- Li, S.-B., Z. Z. Xie, C. G. Hu y J. Z. Zhang (2016). A review of auxin response factors (ARF) in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 47.
- Liao, C. Y., W. Smet, G. Brunoud, S. Yoshida, T. Vernoux y D. Weijers (2015). Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nature Methods*, 12, 207-210.
- Liscum, E. y J. W. Reed (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology*, 49, 387-400.
- Livak, K. J. y T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25, 402-408.
- Ljung, K. (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development*, 140, 943-950.
- Lorenz, C., H. Rolletschek, S. Sunderhaus y H. P. Braun (2014). Brassica napus seed endosperm - Metabolism and signaling in a dead end tissue. *Journal of Proteomics*, 108, 382-426.
- Love, M. I., W. Huber y S. Anders (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (2016). Somatic embryogenesis. An overview, en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer.

Switzerland. pp. 1-10.

- Loyola-Vargas, V. M., J. R. Avilez-Montalvo, R. N. Avilez-Montalvo, R. E. Márquez-López, R. M. Galaz-Ávalos y E. Mellado-Mojica, (2016). Somatic embryogenesis in *Coffea* spp., en: Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 241-266.
- Ludwig-Müller, J. (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany*, 62, 1757-1773.
- Ma, Q., P. Grones y S. Robert (2018). Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. *Journal of Experimental Botany*, 69, 313-328.
- Márquez-López, R. E., C. A. Pérez-Hernández, Á. Kú-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2018). Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 255, 695-708.
- Marraccini, P., F. Vinecky, G. S. C. Alves, H. J. O. Ramos, S. Elbelt, N. G. Vieira, F. A. Carneiro, P. S. Sujii, J. C. Alekcevetch, V. A. Silva, F. M. DaMatta, M. A. G. Ferrao, T. Leroy, D. Pot, L. G. E. Vieira, F. R. da Silva y A. C. Andrade (2012). Differentially expressed genes and proteins upon drought acclimation in tolerant and sensitive genotypes of *Coffea canephora*. *Journal of Experimental Botany*, 63, 4191-4212.
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal*, 17, 10-12.
- Martins, M. Q., A. S. Fortunato, W. P. Rodrigues, F. L. Partelli, E. Campostrini, F. C. Lidon, F. M. DaMatta, J. C. Ramalho y A. I. Ribeiro-Barros (2017). Selection and validation of reference genes for accurate RT-qPCR data normalization in *Coffea* spp. under a climate changes context of interacting elevated [CO₂] and temperature. *Frontiers in Plant Science*, 8, 307.
- Mironova, V., W. Teale, M. Shahriari, J. Dawson y K. Palme (2017). The systems biology of auxin in developing embryos. *Trends in Plant Science*, 22, 225-235.
- Nakagami, H., H. Soukupová, A. Schikora, V. Zársky y H. Hirt (2006). A mitogen-activated protein kinase kinase kinase mediates reactive oxygen species homeostasis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 38697-38704.
- Ni, D. A., L. J. Wang, C. H. DING y Z. H. Xu (2001). Auxin distribution and
-

- transport during embryogenesis and seed germination of Arabidopsis. *Cell Research*, 11, 273-278.
- Nic-Can, G. I. y C. De-la-Peña, (2014). Epigenetic advances on somatic embryogenesis of agronomical and important crops, en: *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications*, Álvarez-Venegas, R., C. De-la-Peña y J. A. Casas-Mollano, (eds). Springer. Cham Heidelberg New York Dordrecht London. pp. 91-109.
- Nic-Can, G. I. y V. M. Loyola-Vargas, (2016). The role of the auxins during somatic embryogenesis, en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 171-181.
- Paponov, I. A., M. Paponov, W. Teale, M. Menges, S. Chakrabortee, J. A. H. Murray y K. Palme (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 1, 321-337.
- Passarinho, P., T. Ketelaar, M. Xing, J. van Arkel, C. Maliepaard, M. Hendriks, R. Joosen, M. Lammers, L. Herdies, B. den Boer, L. van der Geest y K. Boutilier (2008). BABY BOOM target genes provide diverse entry points into cell proliferation and cell growth pathways. *Plant Molecular Biology*, 68, 225-237.
- Puranik, S., P. P. Sahu, P. S. Srivastava y M. Prasad (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 17, 369-381.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2006a). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas, (2006b). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: *Plant cell culture protocols*, Loyola-Vargas, V. M. y F. A. Vázquez-Flota, (eds). Humana Press. Totowa, New Jersey. pp. 111-117.
- Rademacher, E. H., B. Möller, A. S. Lokerse, C. I. Llavata-Peris, W. van den Berg y D. Weijers (2011). A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. *The Plant Journal*, 68, 597-606.
- Rhee, S. Y., J. Dickerson y D. Xu (2006). Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 335-360.
- Santana-Buzzy, N., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Ávalos, R. Ku-Cauich, J. O.
-

- Mijangos Cortés, L. C. Gutiérrez-Pacheco, A. Canto-Flick, F. R. Quiroz-Figueroa y V. M. Loyola-Vargas (2007). Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 43, 507-520.
- Santner, A., L. I. Calderon-Villalobos y M. Estelle (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology*, 5, 301-307.
- Sauer, M., S. Robert y J. Kleine-Vehn (2013). Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany*, 64, 2565-2577.
- Schaller, G. E., A. Bishopp y J. J. Kieber (2015). The Yin-Yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *The Plant Cell*, 27, 44-63.
- Sghaier, N., R. Ben Ayed, R. Ben Marzoug y A. Rebai (2018). Dempster-Shafer theory for the prediction of auxin-response elements (AuxREs) in plant genomes. *BioMed Research International*, 2018, 3837060.
- Shi, X., C. Zhang, Q. Liu, Z. Zhang, B. Zheng y M. Bao (2016). De novo comparative transcriptome analysis provides new insights into sucrose induced somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.). *BMC Genomics*, 17, 26.
- Sisodia, R. y S. C. Bhatla, (2018). Embryogenesis, vegetative growth, and organogenesis, en: *Plant Physiology, Development and Metabolism*, Bhatla, S. C. y A. Lal, (eds). Springer. Singapore. pp. 767-796.
- Skoog, F. y C. O. Miller (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology Journal*, 11, 118-131.
- Smedley, M. A. y W. A. Harwood, (2015). Gateway®-compatible plant transformation vectors, en: *Agrobacterium Protocols: Volume 1*, Wang, K., (ed). Springer. New York. pp. 3-16.
- Söndahl, M. R. y W. R. Sharp (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 81, 395-408.
- Söndahl, M. R., T. Nakamura y W. R. Sharp (1985). Propagation of coffee. *Basic Life Sciences*, 32, 215-232.
- Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Botanica Neerlandica*, 19, 509-514.
-

- Tang Q., P. Yu, M. Tillmann, J. D. Cohen y J. P. Slovin, (2019). Indole-3-acetylaspartate and indole-3-acetylglutamate, the IAA-amide conjugates in the diploid strawberry achene, are hydrolyzed in growing seedlings, *Planta*, DOI: <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3061-0>. (En prensa).
- Tao, L., Y. Zhao, Y. Wu, Q. Wang, H. Yuan, L. Zhao, W. Guo y X. You (2016). Transcriptome profiling and digital gene expression by deep sequencing in early somatic embryogenesis of endangered medicinal *Eleutherococcus senticosus* Maxim. *Gene*, 578, 17-24.
- Thorpe, T., (2012). History of plant tissue culture, en: *Plant Tissue Culture Protocols*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Humana Press. Heidelberg. pp. 9-27.
- Trapnell, C., D. G. Hendrickson, M. Sauvageau, L. Goff, J. L. Rinn y L. Pachter (2013). Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nature Biotechnology*, 31, 46-53.
- Trontin, J. F., K. Klimaszewska, A. Morel, C. Hargreaves y M. A. Lelu-Walter, (2016). Molecular aspects of conifer zygotic and somatic embryo development: A review of genome-wide approaches and recent insights, en: *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*, Germanà, M. A. y M. Lambardi, (eds). Springer. New York. pp. 167-207.
- Vinod, K., M. M. Naidu y G. A. Ravishankar (2006). Developments in coffee biotechnology-in vitro plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87, 49-65.
- Vondráková, Z., J. Krajnáková, L. Fischerová, M. Vágner y K. Eliášová, (2016). Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis, en: *Vegetative Propagation of Forest Trees*, Park, S., J. M. Bonga y H.-K. Moon, (eds). National Institute of Forest Science. Seoul, Korea. pp. 123-169.
- Weijers, D. y D. Wagner (2016). Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 539-574.
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: elegant graphics for data analysis*,
- Wójcikowska, B. y M. D. Gaj (2017). Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 36, 843-858.
- Wojcikowska B. y M. D. Gaj, (2017). Expression profiling of AUXIN RESPONSE FACTOR genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*, *Plant Cell Reports*, DOI: 10.1007/s00299-017-2114-3. (En prensa).
-

- Xu, J. y S. Zhang (2015). Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science*, 20, 56-64.
- Xu, Z., C. Zhang, X. Zhang, C. Liu, Z. Wu, Z. Yang, K. Zhou, X. Yang y F. Li (2013). Transcriptome profiling reveals auxin and cytokinin regulating somatic embryogenesis in different sister lines of cotton cultivar CCRI24. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55, 631-642.
- Yakovlev, I. A., E. Carneros, Y. Lee, J. E. Olsen y C. G. Fossdal (2016). Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. *Planta*, 243, 1237-1249.
- 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, 110.
- Yasuda, T., Y. Fujii y T. Yamaguchi (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, 26, 595-597.
- Yasuda, T., M. Tahara, T. Hatanaka, T. Nishibata y T. Yamaguchi, (1995). Clonal propagation through somatic embryogenesis of coffee species, en: 16^e Colloque Scientifique International sur le café, Anonymous, ASIC. Paris. pp. 537-541.
- Zazimalová, E., P. Krecek, P. Skúpa, K. Hoyerová y J. Petrášek (2007). Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64, 1621-1637.
- Zazimalová, E., J. Petrášek y E. Benková (2014). Auxin and its role in plant development, Springer, Wien Heidelberg New York Dordrecht London. 444 p.
- Zhang, H., J. Chen, F. Zhang y Y. Song (2019). Transcriptome analysis of callus from melon. *Gene*, 684, 131-138.
- Zhao, Y. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 49-64.
- Zheng, Q. y S. Perry (2014). Alterations in the transcriptome of soybean in response to enhanced somatic embryogenesis promoted by orthologs of AGAMOUS-like 15 and AGAMOUS-like 18. *Plant Physiology*, 164, 1365-1377.
-