



CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN A.C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *SERK1* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA DE *Coffea canephora* L**

TESIS QUE PRESENTA:

DANIEL PÉREZ PASCUAL

EN OPCIÓN AL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

(CIENCIAS BIOLÓGICAS: OPCIÓN BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR)

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis del M.C. Daniel Pérez Pascual, titulado “**ANÁLISIS FUNCIONAL DEL GEN *SERK1* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Coffea canephora* L**”, fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de los Drs. José Juan Zúñiga Aguilar y Gregorio Godoy Hernández, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 7 de septiembre de 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Nombre: M.C. Daniel Pérez Pascual

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte de los proyectos titulados “Identificación de procesos celulares modificados por la activación ectópica del dominio de cinasa del receptor *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*” y “Desarrollo, evaluación en campo y análisis de factibilidad comercial de dos cultivos del Sureste Mexicano con Denominación de Origen, editados genómicamente para conferirles resistencia contra patógenos fúngicos y oomicetos”, cuyo responsable es el Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la dirección de los Drs. José Juan Zúñiga Aguilar y Gregorio Godoy Hernández, a quienes agradezco infinitamente el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

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

Daniel Pérez Pascual tuvo una beca de Doctorado del CONACYT (242977).

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que hicieron posible la realización y culminación de esta Tesis.

Agradezco a:

Al director de Tesis: Al Dr. José Juan, por sus valiosas enseñanzas tanto a nivel profesional como personal y por su apoyo constante en la realización de las actividades académicas aquí desarrolladas.

A los Doctores: Rogelio Rodríguez Sotres, Víctor M. Loyola Vargas, Gabriel Lizama Uc y Santy Peraza Echeverría por sus comentarios enriquecedores, sugerencias y sabios consejos en cada examen tutorial y en la elaboración de este trabajo.

A los integrantes de mi comité predoctoral, los Doctores: Georgina Estrada Tapia, Enrique Castaño de la Serna, Rogelio Rodríguez Sotres, Víctor M. Loyola Vargas y Gabriel Lizama Uc.

Al M.C. Ramón Souza Perera por su amistad, comentarios enriquecedores en cada seminario de grupo y por sus sugerencias constructivas que siempre fueron para mejorar.

Al Dr. Gregorio Godoy Hernandez, por aceptar ser coasesor y abrirme las puertas de su grupo de trabajo para la conclusion de la tesis.

A la M.C. Elidé Avilés Berzunza, por su apoyo en la culminación de esta tesis.

A mis compañeros y amigos que formamos parte del grupo del Dr. Zúñiga, por sus comentarios y sugerencias en cada seminario.

Al CICY, al posgrado en ciencias biológicas, a la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por permitirme llevar a cabo esta aventura académica, que lo aprendido durante este proceso marcará mi camino de hoy en adelante.

A todos aquellos que de alguna manera han contribuido, mil gracias.

DEDICATORIAS

Cuando las cosas que mas deseas no siempre son fáciles de conseguir y en la travesía te encuentras con obstáculos y momentos difíciles, solo la fé a Jehová te permite superar las dificultades y lograr cumplir tus metas.

Quiero dedicar esta tesis a mis queridos padres; Lénin Pérez Félix y Martina Pascual García, a quienes les debo la vida y me enseñaron a que el ser humano debe ser agradecido y luchar por sus objetivos e ideales aún en la adversidad y en tiempos críticos.

A mi compañera de vida Doribet Jimenez Guillen por ser mi motor que me impulsa a seguir adelante.

*“Las grandes obras son hechas no con la fuerza,
sino con la perseverancia”.*

Samuel Johnson

	Pag.
ÍNDICE	
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	
ANTECEDENTES	
1.1 La cinasa tipo receptor de la Embriogénesis Somática 1 (SERK1).....	5
1.2 La embriogénesis somática.....	8
1.3 Expresión génica durante la embriogénesis somática.....	11
1.4 Expresión del gen <i>SERK1</i> durante la embriogénesis somática.....	17
1.5 Mecanismo de regulación de la cinasa SERK1.....	20
JUSTIFICACIÓN.....	27
HIPOTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	30
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	31
CAPÍTULO II	
PATRONES TRANSCRIPCIONALES DEL GEN HOMÓLOGO DE <i>SERK1</i> EN <i>Coffea canephora</i> L.	
2.1 INTRODUCCIÓN.....	35
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
2.2.1 Material biológico.....	35
2.2.2 Metodología.....	35
2.2.2.1 Análisis bioinformático de la secuencia de cDNA de <i>CcSERK1</i>	35
2.2.2.2 Análisis filogenético de <i>CcSERK1</i>	35
2.2.2.3 Inducción de la embriogénesis somática de <i>Coffea canephora</i>	36
2.2.2.4 Aislamiento de RNA total.....	36
2.2.2.5 Análisis de expresión de <i>CcSERK1</i> por qRT-PCR.....	37
2.3 RESULTADOS.....	38
2.3.1 Análisis bioinformático de <i>CcSERK1</i>	38
2.3.2 Análisis de expresión de <i>CcSERK1</i> en diferentes tejidos.....	42
2.3.3 Análisis de expresión de <i>CcSERK1</i> durante la embriogénesis.....	44
2.3.4 Análisis de expresión de <i>CcSERK1</i> durante la embriogénesis somática.....	46

2.4	DISCUSIÓN.....	48
-----	----------------	----

CAPÍTULO III

REGULACIÓN EXÓGENA DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *CcSERK1* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Coffea canephora* L.

3.1	INTRODUCCIÓN.....	52
3.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
3.2.1	Material biológico.....	53
3.2.2	Metodología.....	53
3.2.2.1	Evaluación del efecto de la Dexametasona durante el proceso de ES.....	53
3.2.2.2	Extracción de RNA total de explantes foliares de <i>C. canephora</i> L.....	54
3.2.2.3	Extracción de DNA genómico.....	54
3.2.2.4	Generación de las construcciones génicas de <i>CcSERK1</i>	54
3.2.2.5	Transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404.....	55
3.2.2.6	Transformación genética de tejido foliar de <i>C. canephora</i> L.....	56
3.2.2.7	Análisis molecular de la expresión del transgen.....	56
3.2.2.8	Análisis de la cinética de activación y de represión del gen <i>CcSERK1</i>	57
3.3	RESULTADOS.....	58
3.3.1	Efecto de la Dexametasona en la ES de <i>C. canephora</i> L.....	58
3.3.2	Generación de las construcciones génicas de <i>CcSERK1</i>	62
3.3.3	Análisis de la cinética de activación y de represión del gen <i>CcSERK1</i>	66
3.3.4	Análisis del fenotipo causado por la manipulación exógena de <i>CcSERK1</i> ...	68
3.4	DISCUSIÓN.....	73

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA REGULACIÓN EXÓGENA DE LA EXPRESIÓN DE *CcSERK1*, EN LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES HOMEÓTICOS Y DEL METABOLISMO DE AUXINAS DURANTE LA ES DE *Coffea canephora* L.

4.1	INTRODUCCIÓN.....	76
4.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	78
4.2.1	Material biológico.....	78
4.2.2	Metodología.....	78
4.2.2.1	Selección de genes candidato reguladores de la ES	78
4.2.2.2	Diseño de cebadores específicos.....	78

4.2.2.3	Extracción y purificación de RNA total.....	79
4.2.2.4	Análisis de la expresión génica por qRT-PCR.....	79
4.3	RESULTADOS.....	80
4.3.1	Selección de genes blanco.....	80
4.3.2	Análisis de expresión de genes candidatos.....	82
4.4	DISCUSIÓN.....	87
	..	

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

5.1	CONCLUSIONES GENERALES.....	94
5.2	PERSPECTIVAS.....	96
	ANEXOS.....	97
	BIBLIOGRAFÍA.....	106

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pág.
1.1	Representación esquemática de los dominios de la proteína SERK1.....	7
1.2	Genes expresados durante la embriogénesis somática.....	11
1.3	Modelo de interacciones génica que controlan la ES en <i>Arabidopsis thaliana</i> ..	13
1.4	Modelo hipotético de la participación de SERK1 durante la ES con base en evidencias experimentales.....	24
1.5	Estrategia experimental para caracterizar y analizar la funcionalidad del gen <i>CcSERK1</i> durante la inducción de la ES de <i>C. canephora</i> L.....	31
2.1	Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de <i>CcSERK1</i>	39
2.2	Alineamiento de <i>SERKs</i> identificados en el genoma de <i>Coffea canephora</i> L...	40
2.3	Análisis filogenético de <i>CcSERK1</i>	41
2.4	Patrón transcripcional de <i>CcSERK1</i> en diferentes órganos de la planta.....	43
2.5	Patrón transcripcional de <i>CcSERK1</i> durante la embriogénesis cigótica de <i>C. canephora</i> L.....	45
2.6	Patrón transcripcional de <i>CcSERK1</i> durante la embriogénesis somática de <i>C. canephora</i> L.....	47
3.1	Representación esquemática de las construcciones génicas de <i>CcSERK1</i> en el vector pTA211.....	55
3.2	Efecto de la Dexametasona (DEX) en la embriogénesis somática de <i>C. canephora</i> L.....	60
3.3	Efecto de la adición de Dexametasona en un pulso de 24 horas sobre la embriogénesis somática de <i>C. canephora</i> L.....	61

3.4	Verificación por restricción la inserción y la orientación del cDNA del gen <i>CcSERK1</i> en el vector pTA211.....	63
3.5	Verificación por restricción la inserción del fragmento de <i>CcSERK1</i> en orientación antisentido en el vector pTA211.....	65
3.6	Análisis molecular de tejido transformado.....	66
3.7	Análisis de la cinética de inducción y represión exógena del gen <i>CcSERK1</i>	68
3.8	Efecto de la sobreexpresión exógena del gen <i>CcSERK1</i> en el desarrollo de la embriogénesis somática de <i>Coffea canephora</i> L.....	70
3.9	Análisis de la sobreexpresión del gen <i>CcSERK1</i> en tejido embriogénico de <i>Coffea canephora</i> L.....	71
3.10	Efecto del silenciamiento exógeno del gen <i>CcSERK1</i> en el desarrollo de la embriogénesis somática de <i>Coffea canephora</i> L.....	72
4.1	Diagrama de la predicción de asociaciones de SERK1 con otras proteínas.....	81
4.2	Análisis de la integridad del RNA total y síntesis de cDNA.....	82
4.3	Cuantificación por qRT-PCR de la expresión del gen <i>CcSERK1</i>	83
4.4	Efecto de la inducción exógena del gen <i>CcSERK1</i> en la transcripción de genes homéoticos durante la ES de <i>Coffea canephora</i> L.....	84
4.5	Efecto de la inducción exógena del gen <i>CcSERK1</i> en la transcripción de genes implicados en la biosíntesis y el transporte de auxina.....	86
4.6	Representación gráfica de los resultados obtenidos en este estudio.....	93

ANEXOS

A1	Análisis de expresión por RT-PCR del gen <i>CcSERK1</i> de acuerdo con el número de ciclos.....	99
A2	Verificación de la identidad del plásmido pTA211.....	100
A3	Verificación por PCR de la transformación de <i>CcSERK-OE</i> , <i>CcSERK-SL</i> y pTA211 vacío en <i>A. tumefaciens</i>	101

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
1	Tratamientos para la evaluación del efecto de la Dexametasona.....	53
A1	Lista de cebadores específicos para amplificación por PCR de secuencias de DNA genómico y/o cDNA.....	103
A2	Cebadores específicos de CcSERK1 con sitio de corte para enzimas de restricción previamente elegidas.....	103
A3	Lista de cebadores específicos empleados en qRT-PCR.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	Ácido desoxirribonucleico.
cDNA	ADN complementario.
gDNA	ADN genómico.
pDNA	ADN plasmídico.
AGP	Arabinogalactoproteína.
RNA	Ácido ribonucleico.
mRNA	RNA mensajero.
NAA	Ácido naftalenacético.
β-ME	β-Mercaptoetanol.
BA	Benciladenina.
BR	Brasinoesteroides.
BFL	Botón floral en estado latente
BFP	Botón floral en preantesis
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
DIC	Días de cultivo.
DEPC	Dietilpirocarbonato.
DEX	Dexametasona.
DNTPs	Desoxirribonucleótidos.
DMSO	Dimetil sulfoxido.
DPA	Días post antesis
EC	Embriogénesis cigótica
EDTA	Sal disódica del ácido etilén diamino tetra-acético.
ES	Embriogénesis somática.
EtBr	Bromuro de etidio.
GFP	Proteína Verde Flourescente.

HTP	Fosfotransferasa de higromicina.
GUS	-glucuronidasa.
g	Gravedades.
IPTG	Isopropil 3-D-tiogalactósido.
Kbp	Kilopares de bases.
Kin	Kinetina.
LB	Medio Luria-Bertani.
LRR	Región con Repeticiones Ricas en Leucina.
LZ	Cierre de Leucina.
M	Concentración Molar.
MS	Medio de cultivo de Murashige y Skoog.
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
pb	Pares de bases.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
qRT-PCR	PCR en tiempo real cuantitativa.
RLK	Cinasa tipo Receptor.
RNA-seq	Secuenciación de RNA.
pl	Punto isoeléctrico.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT-PCR	PCR con Transcripción Reversa.
SERK1	Cinasa tipo Receptor de la embriogénesis somática 1.
CcSERK1	Gen homólogo de <i>Coffea canephora</i> de la cinasa tipo Receptor de la embriogénesis somática 1.
SN	Sobrenadante.
SPP	Motivo de Serina-Prolina-Prolina.
TA	Temperatura ambiente.
Tm	Temperatura media de fusión.

RESUMEN

El gen *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK)* fue identificado por primera vez en *Daucus carota* (zanahoria) como marcador de células individuales competentes a formar embriones somáticos. Genes homólogos de *DcSERK1* han sido aislados y caracterizados en diferentes especies de plantas, que incluyen mono y dicotiledóneas. En *D. carota*, *Arabidopsis thaliana* y *Medicago truncatula*, se ha demostrado que la proteína SERK1 está involucrada en el proceso de ES, mientras que estudios en otras especies indican que esta cinasa también puede estar involucrada en una diversidad de procesos que incluyen el desarrollo de plantas y la defensa contra patógenos.

A. thaliana ha servido como modelo de investigación para estudiar el papel de cada uno de sus cinco genes *SERK* (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3 / AtBAK1*, *AtSERK4 / AtBKK1* y *AtSERK5*) en diferentes procesos biológicos, proporcionando evidencias de que la proteína SERK1 funciona como un co-receptor indispensable para la activación de receptores específicos, formando heterodímeros con capacidad para unir al ligando y para transducir señales externas que conducen a la modificación de los patrones de expresión génica en respuesta a diferentes procesos, como la respuesta a brasinólidos, la formación del tapetum floral o la abscisión de los órganos florales. Sin embargo, se han generado pocas evidencias para comprender los mecanismos moleculares por los cuales el gen *SERK1* participa en la regulación del inicio de la ES.

Tomando en cuenta la información anterior, el objetivo del presente trabajo fue generar información científica que contribuya a la comprensión de los mecanismos afectados por *SERK1*, que regulan el establecimiento de la ES. Para ello, la expresión del gen *SERK1* fue regulada externamente durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora*, mediante la transformación genética de explantes de hojas con el gen homólogo *SERK1* (*CcSERK1*) bajo el control de un promotor inducible por glucocorticoides, y posteriormente se evaluó los efectos de su expresión sobre el fenotipo embrionario y sobre los patrones de transcripción de genes homeóticos y genes implicados en la biosíntesis y el transporte de auxinas.

Los resultados mostraron que la sobreexpresión de *CcSERK1* causó un incremento del doble en el potencial embriogénico de los explantes de hojas y además indujo la producción adicional de embriones en la vena central. Por el contrario, la supresión de *CcSERK1* provocó una inhibición casi total de la respuesta embriogénica. Con relación a sus efectos sobre la expresión génica, la regulación exógena de la expresión de *CcSERK1* condujo a la inducción génica de *CcAGL15*, *CcWUS*, *CcEMK*, *CcBBM*, *CcPKL*, *CcTAA1*, *CcYU1*, *CcYUC4*, *CcTIR1*, *CcPIN1*, *CcPIN4* y la represión génica de *CcLEC1*, *CcL1L* y posiblemente genes *CcYUC10*. Estos resultados demostraron que *CcSERK1* es un regulador clave de la iniciación y del avance de la ES y que al menos parte del mecanismo por el cual la cinasa SERK1 de *C. canephora* ejerce su función es a través de la activación del metabolismo de auxinas y la concertada inducción-represión de genes homeóticos que son responsables de la diferenciación celular durante etapas tempranas (*CcWUS*, *CcBBM*) y las últimas etapas (*CcLEC1*) del proceso embriogénico.

ABSTRACT

The *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase (SERK)* gene was first identified in *Daucus carota* (carrot) as a marker for single cells competent to form somatic embryos. *DcSERK1* gene homologues have been isolated and characterized in different plant species, which include mono and dicotyledonous. In *D. carota*, *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*, SERK1 protein has been shown to be involved in the ES process, while studies in other species indicate that this kinase may also be involved in a diversity of processes that include plant development and defense against pathogens.

A. thaliana has served as a research model to study the role of each of its five *SERK* genes (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3/AtBAK1*, *AtSERK4/AtBKK1* and *AtSERK5*) in different biological processes, providing evidence that SERK1 protein functions as an indispensable co-receptor for the activation of specific receptors, forming heterodimers with ligand-binding capacity and transducing external signals to modify gene expression patterns in response to different processes, such as the response to brassinolides, the formation of the floral tapetum or the abscission of floral organs. However, few evidences have been generated to understand the molecular mechanisms by which the *SERK1* gene participates in the regulation of the somatic embryogenesis onset.

Taking the background information into account, the goal of the present work was to generate scientific information to improve our understanding of the *SERK1*-induced mechanisms that regulate the establishment of SE. To do so, the expression of the *SERK1* gene was externally regulated during the SE of *Coffea canephora*, by genetic transformation of leaf explants with the *SERK1* homologous gene (*CcSERK1*) under the control of a glucocorticoid-inducible promoter, and then its expression effects on the embryonic phenotype and on the transcription patterns of homeotic genes and genes involved in the biosynthesis and auxin transport were analyzed.

From the results, the overexpression of *CcSERK1* caused a two-fold increase in the embryogenic potential of leaf explants and induced embryos in the middle vein. In contrast, *CcSERK1* suppression caused an almost total inhibition of the embryogenic response. In relation to its effects over gene expression, the exogenous regulation of *CcSERK1* expression conducted to gene induction of *CcAGL15*, *CcWUS*, *CcEMK*, *CcBBM*, *CcPKL*, *CcTAA1*, *CcYU1*, *CcYUC4*, *CcTIR1*, *CcPIN1*, *CcPIN4*, and gene repression of *CcLEC1*, *CcL1L* and possibly *CcYUC10* genes. These results demonstrated *CcSERK1* to be a key regulator of the initiation and progression of SE. These data point to an involvement of *CcSERK1* on auxin metabolism and the concerted induction-repression of those homeotic genes responsible for cell differentiation during early (*CcWUS*, *CcBBM*) and late (*CcLEC1*) embryogenesis.

INTRODUCCIÓN

Las cinasas tipo receptor (RLK: *Receptor-Like Kinase*) son un grupo diverso de proteínas de plantas, ancladas en la membrana citoplasmática, parecidas en estructura y en función a los receptores con actividad de cinasa de tirosina de animales, y cuya función principal es percibir señales extracelulares de carácter biótico y abiótico. Estas proteínas permiten a las células reconocer su entorno extracelular y establecer respuestas específicas para adecuarse a este (van der Geer *et al.*, 1994). Todas las proteínas RLK tienen una estructura similar, formada por un dominio extracelular capaz de percibir señales, un dominio transmembranal hidrofóbico mediante el cual se anclan en la membrana plasmática y un dominio intracelular con actividad de cinasa. Esta estructura permite a las RLK funcionar como transductores de señales, pues el dominio extracelular recibe una señal externa y el dominio intracelular la convierte en una señal diferente, constituida por la fosforilación de sustratos, hacia el interior de la célula.

En los últimos 15 años, el análisis funcional de RLKs en plantas empleadas como modelo de investigación ha revelado numerosos ejemplos de su participación en la diferenciación celular. Por ejemplo, en un estudio en *A. thaliana* se demostró la participación de diferentes RLKs [*SHORT SUSPENSOR (SSP)*, *RECEPTOR PROTEINKINASE1 (RPK1)*, y *TOADSTOOL2 (TOAD2)*, *CRINKLY4 (CR4)*, *ABNORMAL LEAF SHAPE2 (ALE2)*, *GASSHO1 (GSO1)* y *GASSHO2 (GSO2)*] en funciones de señalización intercelular y en la regulación de eventos de comunicación célula a célula durante etapas tempranas de la embriogénesis vegetal (Nodine *et al.*, 2011).

Uno de los RLKs que se expresa durante las primeras etapas de la embriogénesis somática (ES) es la cinasa tipo receptor de la embriogénesis somática 1 (SERK1, por las siglas en inglés de *Somatic Embryogenesis Receptor-Like Kinase 1*; Schmidt *et al.*, 1997). En las especies vegetales en donde se ha estudiado, SERK1 es un marcador de las células somáticas que adquieren la competencia embriogénica (Pérez-Núñez *et al.*, 2009 Santos *et al.*, 2005; Hecht *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1997).

CAPÍTULO II

Se ha propuesto que la expresión del gen *SERK1* es necesaria para el establecimiento de la ES, pues su sobreexpresión parece incrementar el potencial embriogénico (Hecht *et al.*, 2001). No obstante, otras evidencias indican que *SERK1* puede tener un papel determinante en diversos procesos de la diferenciación celular; por ejemplo, *SERK1* se expresa en el procambium vascular, un tejido en dónde ocurren procesos de diferenciación celular en las plantas (Savona *et al.*, 2012; Nolan *et al.*, 2009; Kwaaitaal y de Vries, 2007), por lo que es probable que sus funciones no sean exclusivas de la ES. Los datos experimentales indican que *SERK1* está implicado en mas de una vía de señalización, mediante la unión del ligando al complejo receptor-co-receptor (Meng *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2013; Jaillais *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2008). A pesar de las evidencias que sugieren su participación en diferentes eventos de diferenciación celular, se desconoce el mecanismo mediante el cual *SERK1* participa en estos procesos. Tampoco se sabe si en la ES ocurre algo similar o si los mecanismos de participación son diferentes en estos procesos. Específicamente se desconoce el ligando de *SERK1* o del complejo receptor-co-receptor que forma, así como las vías de señalización citosólica activadas, así como los cambios en los patrones de expresión génica que son inducidos después de su activación en la membrana plasmática.

Con base en estos antecedentes, en el presente estudio tuvo como objetivo principal obtener evidencia de los mecanismos por medio de los cuales *SERK1* participa en la diferenciación celular, empleando para ello a la ES de *Coffea canephora* como modelo de estudio. Esto debido a que el protocolo para su establecimiento en el laboratorio es altamente reproducible y supera en eficiencia los procesos de ES de las plantas modelo. Además, en nuestro laboratorio se clonó el cDNA completo del gen *SERK1* y se determinaron de manera preliminar sus niveles expresión a lo largo de la ES.

En el desarrollo de este proyecto se analizó la implicación del gen *SERK1* durante la ES, para tal motivo se manipuló su expresión de manera controlada mediante la transformación de explantes embrionarios con el cDNA completo o con un fragmento en orientación antisentido, cuya expresión fue dirigida por un promotor inducible por glucocorticoides.

El papel de *SERK1* en el desarrollo de la ES se evidenció mediante el análisis del fenotipo resultante en los explantes embrionarios, así como en el efecto de la manipulación sobre la transcripción de genes homeóticos y de genes responsables de la biosíntesis de auxinas.

En primera instancia se investigaron los niveles de transcritos del gen *SERK1* en diferentes órganos de la planta adulta, así como durante los procesos de la embriogénesis cigótica (EC) y somática. Los resultados indicaron que:

(i) *SERK1* se expresa muy poco en hoja y en botón floral cerrado, pero la expresión es mayor en raíces, en tallo y en botón floral abierto, siendo el meristemo apical del tallo (SAM) el sitio de mayor transcripción.

(ii) En cuanto al desarrollo del embrión cigótico, *SERK1* se transcribe durante el periodo post-antesis (después de la apertura floral), presentando dos picos transcripcionales al primer y siete días post antesis (DPA). Posteriormente, los transcritos de *SERK1* se incrementan en la etapa globular o corazón, disminuyendo en las etapas torpedo y cotiledonar.

(iii) En el proceso de la embriogénesis somática, *SERK1* se transcribe desde las etapas de pre-inducción, inducción y en los diferentes estadios del desarrollo, siendo los días siete-diez, 20 y el estadio globular los que presentaron la mayor transcripción.

Los resultados de la regulación exógena de la expresión de *SERK1* a los siete días de haber iniciado la ES, mostraron además que la sobre-expresión incrementó el número de embriones somáticos por explante, mientras que la represión provocó la reducción casi total de la respuesta embriogénica.

Con relación al efecto de la manipulación exógena de *SERK1* a los siete días del proceso, sobre la transcripción de los genes considerados en este estudio, se pudo constatar que genes homeóticos con funciones en etapas tempranas de la embriogénesis, así como genes participantes en la biosíntesis y el transporte de auxinas son inducidos por *SERK1*, mientras que genes homeóticos con funciones en etapas tardías son reprimidos por la acción de *SERK1* en etapas tempranas.

CAPÍTULO II

Los datos generados en este proyecto, empleando *Coffea canephora* como modelo de estudio, apoyan la hipótesis de que la cinasa SERK1 participa directamente en la regulación del inicio y el avance de la embriogénesis somática mediante la inducción de genes clave y que su presencia es necesaria para que este proceso ocurra.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 La cinasa tipo receptor de la Embriogénesis Somática 1 (SERK1)

La proteína AtSERK1 pertenece a una pequeña familia de cinco miembros en *A. thaliana*: AtSERK1, AtSERK2, AtSERK3 (BAK1: *BRI1-ASSOCIATED KINASE1*), AtSERK4 (BKK1) y AtSERK5, agrupadas con base en la similitud de sus secuencias. De acuerdo con análisis filogenéticos, los cinco SERKs se agrupan en un solo clado, el de la subfamilia II de las cinasas tipo receptor con repeticiones ricas en leucinas (RLK-LRR) (Gou *et al.*, 2010, Shiu y Bleecker 2001). La presencia del motivo RD (-Arg-Asp-) en el subdominio VI del sitio catalítico (ver Figura 1.1) y el motivo conservado DFG en el subdominio VII indica que la proteína SERK1 pertenece a las cinasas de la clase RD (Johnson *et al.*, 1996).

El árbol filogenético de la familia de las proteínas AtSERK indica que SERK1 y SERK2 forman un subgrupo, mientras que SERK3, SERK4 y SERK5 forman otro subgrupo (Chinchilla *et al.*, 2009). *AtSERK1* es el más parecido a *DcSERK* tanto a nivel de nucleótidos (74%) como de aminoácidos (92% de identidad), mientras que SERK5 podría no ser funcional debido a una mutación natural en el motivo altamente conservado "RD" (He *et al.*, 2007).

La proteína predicha para *AtSERK1* tiene 625 aminoácidos con una masa molecular calculada de 69 kD y es ligeramente ácida (pI predicho de 5.25; De Vries *et al.*, 2003). Como todas las RLK, la proteína SERK1 consta de un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular, que consta de los once sub-dominios característicos del sitio catalítico de las proteínas cinasas de serina/treonina (Figura 1.1).

El dominio extracelular de AtSERK1 está conformado por un motivo de péptido señal, posteriormente se localiza un motivo tipo cierre de leucina (LZ), seguido de cinco repeticiones ricas en leucinas (LRR; Hecht *et al.*, 2001) y sitios putativos de *N*-glucosilación, los cuales son esenciales para la correcta localización de la proteína SERK1 en la membrana plasmática (Shah *et al.*, 2001a).

CAPÍTULO II

El dominio extracelular LRR es indispensable para su asociación con receptores que contienen LRR de unión específica a ligando, sirviéndole como plataforma para el ensamblaje molecular de la señal (Jaillais *et al.*, 2011). De hecho, se demostró recientemente mediante el análisis de la estructura cristalina, que existe una interacción directa y dependiente de la unión de ligando entre los dominios LRR del co-receptor SERK1 y el receptor de brasinoesteroides (BR) BRI1 (por las siglas en inglés de *Brassinosteroid Insensitive 1*; Santiago *et al.*, 2013).

En la región yuxtamembranal (JxM) del receptor SERK1 se encuentra una treonina en la posición 304 del polipéptido; este residuo es indispensable para su autofosforilación (Shah *et al.*, 2001b). Entre el subdominio VII y el VIII del dominio de cinasa se encuentra el asa (*loop*) crítica de activación (Shah *et al.*, 2001b). Los residuos de treonina en las posiciones 462 y 468 son necesarios para su auto y transfosforilación (Shah *et al.*, 2001b). El residuo de lisina en la posición 330 es indispensable para la actividad de cinasa (Shah *et al.*, 2001b), por lo que es probable que estos residuos y el residuo Thr³⁰⁴ sean fosforilados por el co-receptor después de la hetero-dimerización inducida por la unión del ligando. En AtSERK1 se demostró *in vitro* que existe una región desordenada en los subdominios X y XI del dominio de cinasa (Aan den Toorn *et al.*, 2012). La región C-terminal está potencialmente implicada en la interacción proteína a proteína, en donde el residuo de serina 562 controla la actividad completa de autofosforilación, pues la mutación de la serina por una alanina abolió dicha actividad (Karlova *et al.*, 2009). También en el dominio de cinasa se encuentra el motivo YPYM, que pertenece al motivo conservado basado en Tirosina YXX (Donde \square representa un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba). Esta secuencia es importante para la endocitosis del receptor, y también está presente en los receptores SERK3, BRI1 y EFR (EF-TU Receptor; Beck y Robatzek, 2012).

SERK1 tiene un motivo RPPS394QPP, el cual se ha sugerido que está involucrado en la interacción con el regulador transduccional 14-3-3, lo cual ya fue demostrado para las proteínas 14-3-3 y 14-3-3 (Karlova *et al.*, 2006, Rienties *et al.*, 2005).

La identidad de las secuencias de aminoácidos entre AtSERK1 y AtSERK2 es del 90%, y entre AtSERK1 con AtSERK5 es de 67%. La identidad dentro del dominio de cinasa es entre 85% y 95% para las secuencias de las cinco SERK y todas contienen las secuencias centrales característicos de Ser/Thr cinasas. La identidad es también alta en la región LRR (89%-66%) y en el dominio transmembranal (82%-54%). La mayor divergencia se encuentra en los dominios SPP (47%, 38%, y 31% de identidad, respectivamente) y C-terminal (44%, 38%, y 38% de identidad, respectivamente) de AtSERK3, AtSERK4 y AtSERK5 (Figura 1.1; Hecht *et al.*, 2001).

La estructura genómica de todos los homólogos descritos en otras especies es similar a la de *AtSERK1*, con 10 intrones y 11 exones predichos, cada uno de los cuales codifica un dominio diferente de la proteína.

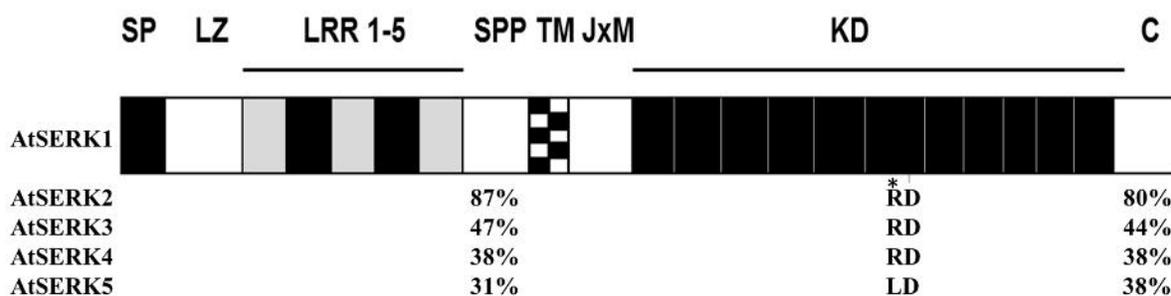


Figura 1.1 Representación esquemática de los dominios de la proteína SERK1. Los datos de identidad de los cinco SERK en los dominios SPP y C-terminal fueron tomados de Hecht *et al.*, 2001. Las abreviaturas utilizadas en figura se describen a continuación. SP: péptido señal, LZ: cierre de leucina, LRR: región con repeticiones ricas en leucina, SPP: dominio serina-prolina-prolina, TM: dominio transmembranal, JxM: región yuxtamembranal, KD: dominio de cinasa, C: dominio carboxilo terminal, RD: -Arginina-Ácido aspártico-, LD: -Lisina - Ácido aspártico-.

1.2 La embriogénesis somática

La ES es el proceso mediante el cual las células somáticas se diferencian para producir un embrión completo. En la ES, cuyo origen puede ser unicelular (Schmidt *et al.*, 1997) o multicelular (Taylor y Vasil 1996), las estructuras embriogénicas logran la bipolaridad desde etapas tempranas como sucede en la embriogénesis cigótica (EC), pero sin la fusión de gametos (Williams y Maheswaran, 1986, Sharp *et al.*, 1980). Su estudio puede ofrecer información valiosa para elucidar la regulación de la EC, además, la ES puede constituir una poderosa herramienta para la propagación de especies con características agronómicas sobresalientes o de especies en peligro de extinción.

El inicio de la ES involucra la existencia de células somáticas diferenciadas, que adquieren un estado de competencia embriogénica y proliferan como células embrionarias. El inicio de la vía embriogénica se limita a ciertas células sensibles que tienen el potencial para activar los genes involucrados (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002, Nomura y Komamine, 1985). La inducción de la ES y el mantenimiento del potencial embriogénico dependen también, en gran medida, de factores exógenos. Primero, las células dentro del explante deben tener el potencial de expresar totipotencia. En segundo lugar, las células deben ser competentes para responder a señales exógenas. En tercer lugar, la diferenciación de las células competentes debe ser inducida por señales extracelulares específicas, las cuales a menudo son reguladores del crecimiento vegetal (RCV), pero para que respondan hace falta que estén "comprometidas" con la ruta embriogénica (Elhiti *et al.*, 2013).

Aunque la ES fue descrita por vez primera hace más de 50 años (Reinert, 1958; Steward *et al.*, 1958; Krikorian y Simola, 1999), aún continúa siendo objeto de numerosos estudios por su gran importancia como modelo para estudiar la diferenciación celular y como herramienta biotecnológica para la clonación de genotipos élite (von Arnold *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos moleculares precisos que regulan este proceso siguen sin estar claros hasta la fecha (Yan *et al.*, 2012); de hecho, la regulación de la ES es una de las 25 preguntas fundamentales que permanecen sin contestar en la actividad científica, de acuerdo con una lista de 125 preguntas establecidas en la revista Science en su aniversario 125 (Vogel, 2005).

Fundamentalmente, se desconoce la naturaleza de la(s) señal(es) extracelular(es) que dispara(n) el proceso de diferenciación en las células somáticas, así como las vías de transducción de señales que al ser activadas en las células competentes conducen a la activación de la expresión génica en el núcleo.

Se sabe que existen varios factores que influyen de forma positiva en la inducción de la ES, entre los que se encuentran la adición de RCV, el tipo de explante y el estadio de desarrollo del individuo que se empleo para obtener dicho explante, así como, los requerimientos nutricionales y el genotipo (Rose *et al.*, 1999, Ammirato, 1983).

Diferentes estudios indican que el estrés en sí mismo actúa como un inductor de la ES (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003; Touraev *et al.*, 1997; Kamada *et al.*, 1993); de hecho, el estrés por herida es el primer evento experimentado por las células del corte del explante o por el aislamiento de una célula antes de iniciar el proceso de cultivo (Rose *et al.*, 2010). Aunque el medio basal es esencial y puede modificar la cantidad de ES en un explante dado (Ammirato, 1983), por lo general no es un regulador clave.

Las auxinas y las citocininas (solos o en combinación) son los principales reguladores del crecimiento involucradas en la regulación de la división y diferenciación celular. La influencia de las auxinas aplicadas exógenamente en la inducción de la ES está bien documentada, sobre todo el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Yeung, 1995, Dudits *et al.*, 1991). Sin embargo, el desarrollo de embriones somáticos en los tejidos también se ha reportado en ausencia de reguladores del crecimiento (Choi *et al.*, 1998). Aunque las auxinas son necesarias para la transición hacia un estado embriogénico, también pueden inhibir el desarrollo ulterior del embrión después del estadio globular (Komamine *et al.*, 1990). La aplicación de una nueva generación de reguladores de crecimiento, tales como los oligosacáridos, el éstress del ácido jasmónico, las poliaminas y los BR ha demostrado ser útil para iniciar la ES en muchas especies de plantas (Jiménez, 2005).

Durante los últimos años, se ha acumulado una gran cantidad de evidencias experimentales sobre el papel central que juegan el ácido indolacético (IAA) y el ácido abscísico (ABA) endógenos, durante las primeras fases de la embriogénesis. Una concentración endógena alta de IAA ha demostrado estar asociada con el aumento de la respuesta embriogénica en varias especies/explantos (Jiménez y Bangerth, 2001a, b, c; Michalczuk y Druart, 1999; Ivanova *et al.*, 1994; Rajasekaran *et al.*, 1987).

La activación simultánea de las respuestas de auxinas y el estrés puede ser un evento clave en la adaptación celular, causando cambios genéticos, metabólicos y fisiológicos, en una reprogramación que se traduce en la competencia embriogénica de las células somáticas vegetales.

El incremento durante la ES de mensajeros codificantes para genes característicos del estrés oxidativo y de reguladores de la división celular, sugiere que la disposición de las nuevas células en estructuras organizadas puede depender de un equilibrio genéticamente controlado entre la proliferación celular y la muerte celular (Thibaud-Nissen *et al.*, 2003).

Existen estudios que remarcan la importancia de los mecanismos epigenéticos que operan en la reprogramación génica durante la ES a través de la metilación del DNA, la remodelación de la cromatina y la regulación mediada por pequeños RNA (Neelakandan y Wang 2012, Miguel y Marum 2011). Por lo tanto, estos mecanismos epigenéticos podrían ser utilizados como una primera señal de diferenciación entre los estados embriogénicos y los no embriogénicos (Mahdavi-Darvari *et al.*, 2014).

1.3 Expresión génica durante la embriogénesis somática

Durante la ES, las células somáticas totipotentes son inducidas a formar células embriogénicas capaces de regenerar plantas completas. Durante este proceso, el paso más crítico en las células somáticas es la adquisición de la competencia embriogénica (Guan *et al.*, 2016). Este cambio implica una serie de acontecimientos asociados con el reconocimiento molecular de señales internas, con estímulos externos (Chugh y Khurana, 2002) y con cambios drásticos en el transcriptoma de las células del explante (Nowak y Gaj 2016). Mediante análisis de expresión diferencial se han identificado genes que codifican para proteínas extracelulares, intermediarios de vías de traducción de señales, genes que responden a RCV, genes del ciclo y pared celular, genes involucrados en la regulación epigenética, así como, diferentes factores de transcripción (TF; Figura 1.2). La mayor atención se centra en los genes específicos y altamente expresados en etapas tempranas de la ES. Sin embargo, la mayoría de los genes identificados poseen funciones diversas, que no son exclusivas de la ES (Ikeda *et al.*, 2006).

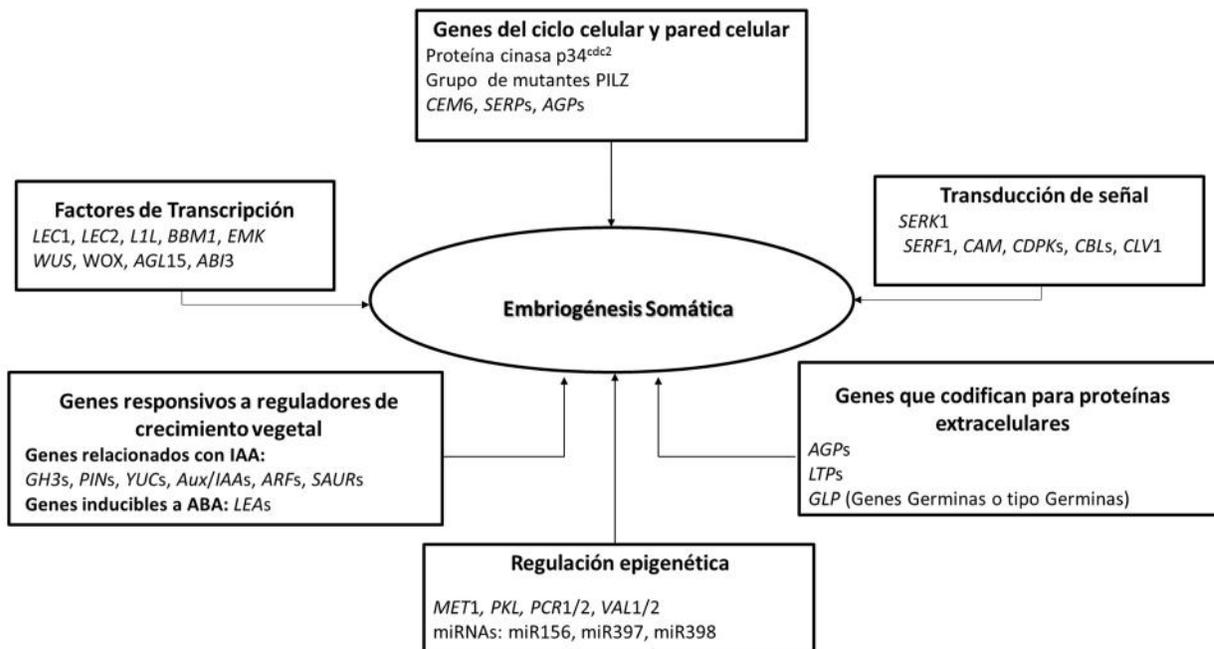


Figura 1.2 Genes expresados durante la embriogénesis somática. La identificación de los genes expresados diferencialmente durante la ES, permite agruparlos de acuerdo con su función. (Modificado de Yang y Zhang, 2011).

Entre los genes identificados y que han resultado ser esenciales para la ES, se

CAPÍTULO II

encuentran *LEAFY COTYLEDON1* (*LEC1*; Lotan *et al.*, 1998), *LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*; Stone *et al.*, 2001; Gaj *et al.*, 2005; Ledwo y Gaj, 2009; Wójcikowska *et al.*, 2013), *BABY BOOM* (*BBM*; Heidmann *et al.*, 2011; El Ouakfaoui *et al.*, 2010; Deng *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 2007; Boutilier *et al.*, 2002), *EMBRYOMAKER/AINTEGUMENTA-LIKE5/PLETHORA5* (*EMK/AIL5/PLT5*; Tsuwamoto *et al.*, 2010), *WUSCHEL* (*WUS*; Zuo *et al.*, 2002, Arroyo-Herrera *et al.*, 2008), y *AGAMOUS-LIKE15* (*AGL15*; Zheng *et al.*, 2013; Thakare *et al.*, 2008; Harding *et al.*, 2003), *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*; Elhiti *et al.*, 2010), *KNOTTED1-like homeodomain protein 3* (*HBK3*; Belmonte *et al.*, 2007), *RWP-RK domain 4* (*RKD4*; Waki *et al.*, 2011), *Gibberellin 2-oxidase 6* (*GA2ox6*; Wang *et al.*, 2004), *SERK1* (Hu *et al.*, 2005, Hecht *et al.*, 2001). Por otra parte, se han identificado genes reguladores negativos de la ES, tales como *Polycomb repressive complex 1* y *2* (*PRC1* y *2*; Bratzel *et al.*, 2010, Chanvivattana *et al.*, 2004), *PICKLE* (*PKL*), que codifica un factor de remodelación de cromatina *CHD3* (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 3*; Ogas *et al.*, 1999), y *VP1/ABI3-LIKE 1/2* (*VAL1/2*; Suzuki *et al.*, 2007), entre otros.

La identificación de genes claves en *A. thaliana* ha contribuido al entendimiento de la red de regulación de la ES (Figura 1.3). Las evidencias indican que *LEC1* y *L1L* especifican la identidad celular en los cotiledones y mantienen el destino de las células del suspensor (Meinke *et al.*, 1994; West *et al.*, 1994; Meinke, 1992). Posteriormente, ambos genes controlan el inicio y/o el mantenimiento de la maduración del embrión, así como la supresión de la germinación prematura (Lotan *et al.*, 1998, Parcy *et al.*, 1997). La sobreexpresión ectópica de *LEC1* conduce a la detención temprana del crecimiento de las plántulas y a un desarrollo anormal, ocasionalmente acompañado por la formación de estructuras tipo embriogénicas (Lotan *et al.*, 1998). Por lo tanto, *LEC1* confiere potencial embriogénico a las células somáticas. Además, *LEC1* promueve la biosíntesis de auxinas mediante la regulación del gen *YUC10* (Junker *et al.*, 2012).

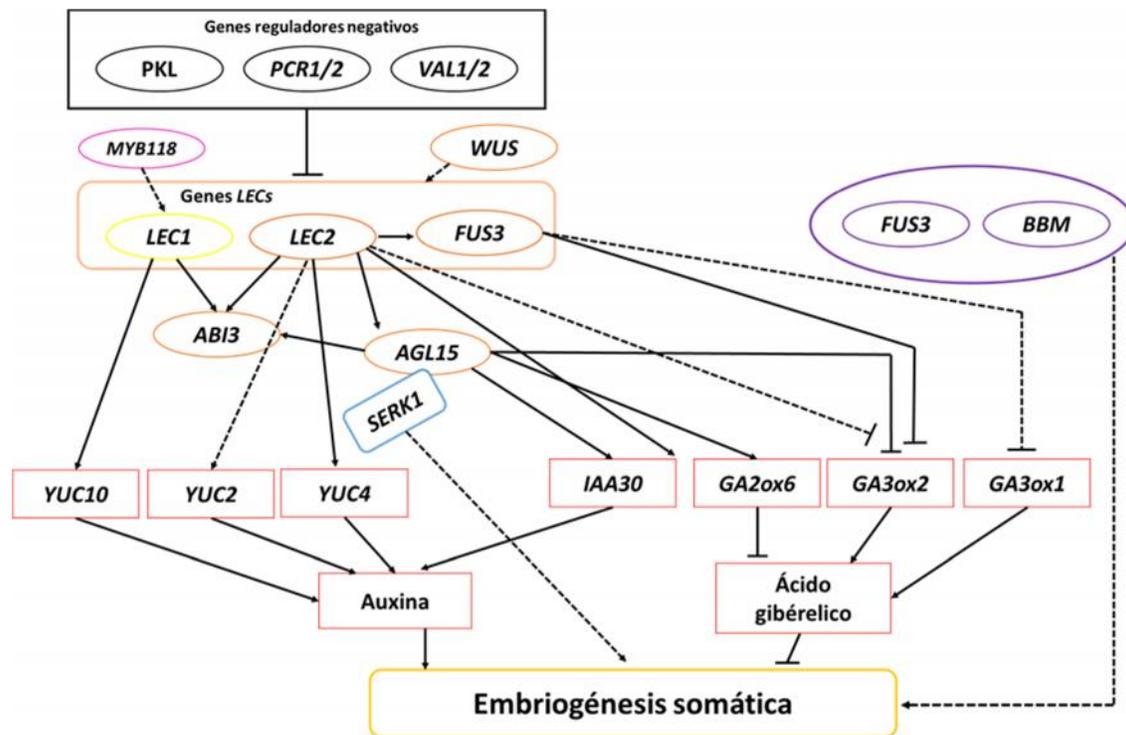


Figura 1.3 Modelo de interacciones génicas que controlan la ES en *Arabidopsis thaliana*. Las flechas con una línea continua indican la regulación transcripcional directa por evidencia molecular. Las flechas con una línea punteada indican la regulación transcripcional de los mecanismos que no están claros. Modificado de Guan *et al.*, (2016).

Entre los factores de transcripción que poseen un dominio B3, como *LEC2*, *FUS3*, *ABI3* y *Viviparous1* (*Vp1*; Stone *et al.*, 2001; McCarty *et al.*, 1991; Luerssen *et al.*, 1998), *LEC2* y *FUS3* son importantes para la estructura del embrión temprano y la maduración, mientras que *ABI3* solo es importante para la maduración (Stone *et al.*, 2001). La expresión ectópica de *LEC2* conduce a la formación de embriones somáticos, de callos y de estructuras tipo cotiledones (Stone *et al.*, 2001), mientras que la regulación negativa de *LEC2*, de *FUS3* y de *ABI3* inhibe la ES indirecta (Gaj *et al.*, 2005). *LEC2* funciona como un regulador de la embriogénesis reprimiendo la expresión de *GA3ox2* e induciendo los genes de la biosíntesis (*YUC2*, *YUC4*) y señalización de auxinas (a través de *IAA30*; Stone *et al.*, 2008; Braybrook *et al.*, 2006; Curaba *et al.*, 2004).

CAPÍTULO II

La expresión de *FUS3* está regulada por auxinas (Gazzarrini *et al.*, 2004) y la expresión de los genes *LEC1*, *LEC2* y *FUS3* resulta esencial para la inducción de la ES (Gaj *et al.*, 2005). Al mismo tiempo, *FUS3* regula la síntesis de ABA y regula negativamente la síntesis de ácido giberélico (AG) mediante la represión de los genes de biosíntesis de AG, *GA3ox1* y *GA3ox2*, durante la maduración del embrión (Gazzarrini *et al.*, 2004). *ABI3* funciona regulando genes responsivos a ABA durante el desarrollo de la semilla y es regulado positivamente por *LEC1*, *LEC2* y *AGL15* (Zheng *et al.*, 2009, To *et al.*, 2006), mientras que *VAL1/2* reprimen la transcripción de los genes *LEC1*, *L1L*, *FUS3* y *ABI3*, pero no de *LEC2* (Suzuki *et al.*, 2007). Las proteínas *VAL* pueden suprimir la expresión de los genes de la vía embriogénica mediante el reclutamiento del Polycomb repressive complex 1 (PRC1) mediada por la ubiquitinación de la histona H2A (H2Aub) y el mantenimiento de la represión por PRC2 mediada por la trimetilación de la lisina 27 de la histona H3 (H3K27me3; Yang *et al.*, 2013).

El gen *WUS* juega un papel esencial en el mantenimiento de un estado de proliferación celular y de receptividad a señales del desarrollo (Gallois *et al.*, 2002, Mayer *et al.*, 1998). Durante la ES en *A. thaliana*, la transcripción de *WUS* se hace evidente incluso antes del establecimiento de un gradiente de auxina y la formación de embriones en estadio globular (Su *et al.*, 2009). La supresión genética de *WUS* por la expresión ectópica de *CLV1* redujo significativamente la capacidad de respuesta a los estímulos de ES, lo que pudo ser rescatado por la adición de mayores concentraciones de 2,4-D (Elhiti *et al.*, 2010).

La expresión ectópica inducible de *WUS* en *A. thaliana* inhibe el desarrollo de las plántulas, pero promueve la ES directa en ausencia de 2,4-D (Zuo *et al.*, 2002). De igual forma, la sobreexpresión de *AtWUS* en la ES de *Coffea canephora* promueve un incremento hasta de 400 veces en la formación de embriones somáticos (Arroyo-Herrera *et al.*, 2008).

La familia de genes *AtKNOX* se ubica en dos clados, *KNOXI* y *KNOXII*. El grupo *KNOXI* consta de cuatro miembros, *STM*, *BP* (*BRAVIPEDICELLUS*), *KNAT2* (*kn1-like 2*) y *KNAT6*. La expresión de *STM* es detectable en el meristemo apical en el estadio embrionario de 32 células (Long *et al.*, 1996), y persiste en los meristemos apicales y florales durante el desarrollo postembrionario.

La expresión ectópica de *STM* de *B. napus* promueve ES (Elhiti *et al.*, 2010). El homólogo *KNAT2* de soya (*SBH*, soybean homeobox) se expresa en embriones somáticos en estadios tempranos, alcanzando el nivel máximo de transcripción en el estadio cotiledonar, posteriormente disminuye (Ma *et al.*, 1994).

Los homólogos de *KNOXI* de *Picea abies* (*HBK*), son marcadores y reguladores importantes de la ES. *HBK2* se expresa en embriones somáticos, pero no en una línea celular carente del potencial embriogénico (Hjortswang *et al.*, 2002). *HBK1* y *HBK3* son regulados inmediatamente después del inicio de la ES cuando esta se desarrolla en un medio sin RCV. La expresión de *HBK4* se hace evidente en etapas posteriores, después de la degradación del suspensor. Junto con *HBK2*, *HBK4* juega un papel en el establecimiento del meristemo apical (Larsson *et al.*, 2012). La expresión ectópica de *HBK3* aumentó el rendimiento de embriones somáticos. El meristemo apical en estos embriones fue significativamente mayor que en los embriones de tipo silvestre. En consecuencia, la regulación negativa de *HBK3* redujo la capacidad embriogénica (Belmonte *et al.*, 2007). Las vías *KNOXI* y *WUS* están entrelazadas en la regulación de la ES: *STM* regula positivamente la transcripción de *WUS* y consecuentemente los niveles más altos de *WUS* promueven ES. Además, *STM* mejora la transcripción de genes implicados en la percepción hormonal (Elhiti *et al.*, 2010).

En *A. thaliana*, la inducción de la expresión ectópica de *RKD4* por un período de 8 días indujo la expresión de genes relacionados con la embriogénesis y promovió la ES, mientras que su expresión ectópica de forma constitutiva dio como resultado una proliferación continua sin diferenciación (Waki *et al.*, 2011).

CAPÍTULO II

El gen *AGL15* exhibe altos niveles de expresión en cultivos embriogénicos (Thakare *et al.*, 2008) y su expresión ectópica aumenta la eficiencia tanto de la ES directa como indirecta en *A. thaliana* y soya (Thakare *et al.*, 2008, Harding *et al.*, 2003), mientras que su silenciamiento reduce la eficiencia de la ES (Thakare *et al.*, 2008).

Es importante destacar que *AGL15* está integrado a diferentes procesos de señalización durante la embriogénesis. En primer lugar, *AGL15* es un componente del complejo *SERK1* (Karlova *et al.*, 2006), en segundo lugar, su expresión está controlada por *LEC2* y está regulada por auxinas (Braybrook *et al.*, 2006; Zhu y Perry, 2005; Gazzarrini *et al.*, 2004), en tercer lugar, promueve la transcripción de *LEC2*, *FUS3* y *ABI3* (Zheng *et al.*, 2009), en cuarto lugar, regula positivamente la transcripción de un miembro de la subfamilia B-3 de los factores de transcripción *APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR* (*AP2/ERF*, At5g61590, Zheng *et al.*, 2013); finalmente, en cooperación con *LEC2* y *FUS3*, *AGL15* induce la expresión de las enzimas del catabolismo de giberelina GA2-oxidasas *GA2ox6* (Wang *et al.*, 2004) y *GA2ox2* (Zheng *et al.*, 2009) reduciendo así el contenido de giberelinas activas. La capacidad de controlar el nivel de giberelinas activas hace que *GA2ox6* sea un potente regulador de la ES y su sobreexpresión aumenta la eficiencia de la ES en casi siete veces (Wang *et al.*, 2004).

En *Medicago truncatula*, *MtSERF1* es un gen inducible por etileno, expresado en los embriones cigóticos, en cultivos embriogénicos en proliferación y embriones somáticos (Mantiri *et al.*, 2008a, 2008b). La localización de la expresión se restringe a la región del meristemo apical del embrión en el estadio corazón. El silenciamiento de *MtSERF1* inhibe la ES.

Otro miembro de este grupo de genes es *EMK*, el cual se expresa en etapas tempranas y en la maduración, y tiene un papel redundante en el mantenimiento de la identidad de las células embrionarias (Tsuwamoto *et al.*, 2010). La expresión ectópica de *EMK* promueve el inicio de embriones somáticos a partir de cotiledones.

El miembro mas estudiado de la familia *AP2/ERF* es *BBM*. Este gen se expresa durante

todas las etapas de la EC en *A. thaliana*, desde la fase globular hasta las semillas maduras (Boutilier *et al.*, 2002). Además, *BBM* se identificó como un marcador de la ES en suspensiones celulares de *B. napus*.

La expresión ectópica de *BBM* aumenta la ES y promueve otras respuestas morfogénicas en un medio sin RCV (El Ouakfaoui *et al.*, 2010, Boutilier *et al.*, 2002). La sobreexpresión de *BBM* indujo la ES indirecta en *N. tabacum*, *Populus tomentosa* y *Capsicum annuum* (Heidmann *et al.*, 2011; Deng *et al.*, 2009; Srinivasan *et al.*, 2007).

1.4 Expresión del gen *SERK1* durante la embriogénesis somática

En explantes de *D. carota*, las células con competencia embriogénica se originan a partir del tejido vascular. Después del tratamiento con la auxina 2,4-D, la proliferación celular se inicia en las células provasculares (Guzzo *et al.*, 1994). En *D. glomerata* L., las células que dan lugar a embriones somáticos se originan cerca de los haces vasculares de los explantes de hoja y un subconjunto de estas células expresan *SERK1* (Somleva *et al.*, 2003).

En *A. thaliana*, la expresión de *AtSERK1* aumenta como respuesta a la presencia de auxinas en el lado adaxial de los cotiledones, en el meristemo apical y en el tejido vascular de las plántulas (Hecht *et al.*, 2001). *AtSERK1* también se expresa en la megasporogénesis y en todas las células del saco embrionario hasta la fase de la fertilización, después de ello se expresa también en todas las células del embrión en desarrollo hasta el estadio de corazón.

En cultivos *in vitro*, *AtSERK1* se expresa en estructuras embriogénicas que se forman en el tejido del callo, mientras que no es detectable en las células no embriogénicas (Hecht *et al.*, 2001). En callos derivados de una línea transgénica que sobre-expresa *AtSERK1*, la sobre-expresión condujo al aumento significativo de la competencia embriogénica (Hecht *et al.*, 2001).

El patrón de expresión ectópica de *AtSERK1::GUS* en las células individuales y pequeños

CAPÍTULO II

grupos de células en los embriones proporcionó evidencia adicional de que *AtSERK1* es un marcador de la competencia embriogénica (Salaj *et al.*, 2008).

Para obtener células competentes en *M. truncatula*, es necesario adicionar la auxina ANA y la citocinina BA (Nolan *et al.*, 2003). El aumento en la expresión de *MtSERK1* fue observado como respuesta a la adición de los dos reguladores de crecimiento; sin embargo, la expresión de *SERK1* no se limitó a los callos embriogénicos, porque también se expresó en callos no embriogénico y se indujo por auxinas y citocininas en ambas líneas (Nolan *et al.*, 2003).

Como hipótesis los autores proponen que otros factores desconocidos cercanos a *SERK1* se necesitan en la adquisición de la competencia embriogénica, mismos que podrían estar ausentes en la línea no embriogénica (Nolan *et al.*, 2003).

El análisis con alelos mutantes de la familia SERK demostró que la mutante *serk1-3* tiene una reducción en la capacidad embriogénica, mientras que las mutantes dobles de *serk2* y *serk3* no mostraron ninguna alteración en la competencia embriogénica, lo que sugiere que la señalización de *SERK1* es esencial para la adquisición de competencia embriogénica y que la presencia de la proteína *SERK1* se requiere para la formación de células embriogénicas (Kwaaitaal y de Vries, 2007).

Los primeros trabajos relacionados con *SERK1* se centraron en la capacidad de las plantas para expresar su naturaleza totipotencial a través de la ES (Salaj *et al.*, 2008; Hecht *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1997); no obstante, otros estudios comenzaron a indicar un papel mas amplio para este gen. Además de la expresión durante la ES, *SERK1* desempeñaba un papel en la pluripotencia (Savona *et al.*, 2011; Nolan *et al.*, 2009; Kwaaitaal, 2007) en la formación de brotes *in vitro* (Thomas *et al.*, 2004) y en la organogénesis (Sharma *et al.*, 2008).

El argumento a favor de un papel de *SERK* como regulador de la manifestación de la pluripotencia se desarrolló aun mas a través de los datos de expresión en *Arabidopsis*.

SERK1 se expresa en las células pluripotentes del procambium vascular, por lo que se especuló que la función de *SERK1* es mantener el carácter pluripotente de las células del procambium (Kwaaitaal, 2007).

Existe una hipótesis de que la aplicación de la auxina sintética 2,4-D da como resultado una reversión de células pluripotentes hasta un estado de células madre totipotentes, las cuales son capaces de progresar hacia el inicio de la embriogénesis (Kwaaitaal, 2007).

Los resultados de un trabajo reciente en *Cyclamen persicum*, especie con la que se analizó la formación de células madre, el mantenimiento de la ES y la organogénesis *in vitro*, dan apoyo a la hipótesis enunciada en el párrafo anterior, ya que *CpSERK1* y *CpSERK2* se expresan en las células madre pluripotentes *in planta* e *in vitro*. Dado lo anterior, se propone que la alta expresión de estos genes en los derivados de las células madre de amplificación transitoria (TA) mantiene una condición pluripotente que conduce a la totipotencia y, en consecuencia, a la ES (Savona *et al.*, 2011).

Los resultados enunciados en este apartado, son coincidentes con la concepción, ampliamente aceptada de que la expresión de *SERK1* es un marcador de células madre pluripotentes en los haces vasculares. Dichas células, después del tratamiento con las moléculas adecuadas, tales como auxinas, parecen ser capaces de adquirir totipotencia y de iniciar la ES (Kwaaitaal, 2007).

En el modelo de ES de *Coffea canephora*, se aisló el cDNA completo de *SERK1* de café (Cc*SERK1*) a partir de RNA extraído de los explantes inducidos hacia el proceso de ES (Pérez-Pascual, 2013) y mediante experimentos de RT-PCR semicuantitativa con cebadores específicos se demostró que el gen *CcSERK1* se expresa entre los cinco y los diez días después de la adición de BA, disminuyendo posteriormente, hacia los días 25 y 30 (Villanueva-Alonzo, 2006). El análisis de expresión mediante RT-PCR mostró que, *in planta*, el transcrito de *CcSERK1* no se expresa en tejidos diferenciados como la raíz, el tallo, las hojas o yemas laterales, pero sí, se expresa en embriones provenientes de fruto verde, amarillo y rojo cereza. Estos datos son consistentes con un patrón de expresión preferencial en planta adulta y durante la EC.

1.5 Mecanismo de regulación de la cinasa *SERK1*

CAPÍTULO II

Las moléculas señal presentes en el entorno celular son percibidas, entre otras moléculas, por RLK situadas en la membrana plasmática. Los ligandos de muchas RLKs son desconocidos y es probable que se produzcan inclusive en la pared celular. La percepción de las señales puede a continuación afectar a procesos citoplasmáticos o estas pueden ser transducidas hacia el núcleo, donde regulan los cambios en los patrones de transcripción (Smertenko y Bozhkov, 2014b). En la ES, uno de los RLKs que se expresa durante las primeras etapas de la ES es SERK1 (Hecht, *et al.*, 2001), un marcador de células que son competentes para formar embriones somáticos en el medio de cultivo (Schmidt, *et al.*, 1997). Los estudios generados hasta el momento han ayudado a entender parte del mecanismo de activación de SERK1, sin embargo, estos estudios se han realizado en otros procesos, que no incluye la ES.

Se ha demostrado la unión indirecta de varias proteínas que interactúan con el dominio de cinasa de SERK1. Se ha demostrado que SERK1 se une a la proteína fosfatasa asociada a cinasas (KAPP por las siglas en inglés de *Kinase-Associated Protein Phosphatase*), en una manera dependiente de la fosforilación (Shah *et al.*, 2002). KAPP desfosforila a SERK1, posiblemente regulando negativamente la señalización de SERK1. La co-expresión de KAPP y SERK1 en protoplastos resulta en la internalización de ambas proteínas, pero ambas solo interactúan después de la internalización. Esto sugiere que la desfosforilación de SERK1 por KAPP juega un papel positivo en la endocitosis de SERK1.

La AAA-ATPasa CDC48 (por las siglas en inglés de *Cell-Division Cycle 48*) y la proteína 14-3-3 GF14 se aislaron de un escrutinio de doble híbrido en levaduras como proteínas que interactúan con la cinasa SERK1 (Rienties *et al.*, 2005). Su interacción con SERK1 se verificó tanto *in vitro* (Rienties *et al.*, 2005) como en protoplastos (Rienties *et al.*, 2005; Aker *et al.*, 2006). La co-inmunoprecipitación de una variante SERK1-CFP a partir de extractos proteicos vegetales y el posterior análisis por espectrometría de masas (MS) del complejo de proteínas asociadas demostró que CDC48, 14-3-3 y SERK1 se encuentran formando un complejo en esos extractos.

Además, CDC48 y 14-3-3 se unen preferentemente a SERK1 en un estado fosforilado, mientras que SERK1 transfosforila a ambas proteínas (Karlova *et al.*, 2006). En

protoplastos de *A. thaliana*, GF14 (Rienties *et al.*, 2005) y CDC48A (Aker *et al.*, 2006) interactúan con SERK1 principalmente en la membrana plasmática. CDC48A y SERK1 también interactúan en el retículo endoplasmático (Aker *et al.*, 2006). Las proteínas 14-3-3 se cree que actúan como adaptadores en la estabilización de la fosforilación dependiente de las interacciones proteína-proteína (Sorrell *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 1997a; Wu *et al.*, 1997b).

En *A. thaliana*, la proteína CDC48 es altamente expresada durante la proliferación de células vegetativas de la raíz, en la inflorescencia, en flores, en células en rápido crecimiento y durante el desarrollo de óvulos y microsporas (Feiler *et al.*, 1995). Por lo tanto, SERK1 y CDC48 son co-expresados en varios tejidos vegetales, pero ninguna hipótesis clara sobre la función de CDC48 o 14-3-3 en la señalización SERK1 ha sido formulada.

Las primeras evidencias que sugirieron la identidad de la señal transducida por la proteína SERK1 vino de la identificación de SERK3, que interactúa con BRI1 para la señalización de BR (Li *et al.*, 2002, Nam y Li, 2002). La interacción entre BRI1 y SERK3 en las plantas es dependiente del ligando, así como del estado de fosforilación de ambos receptores (Wang *et al.*, 2005). SERK3 funciona como un co-receptor que no une al ligando de BRI1 en la señalización de BR. Sin embargo, el dominio extracelular LRR de SERK3 es crítico para su asociación con BRI, sirviendo a este como plataforma para el ensamblaje molecular de la señal. El dominio LRR es además importante para la correcta formación de alta afinidad del dúo receptor/co-receptor (Jaillais *et al.*, 2011).

SERK1 está presente junto con BRI1 y SERK3 en un complejo de proteínas y, al igual que SERK3, interactúa genéticamente con BRI1, por lo cual se sugirió que SERK1 también funciona como un co-receptor para BRI1 en la señalización de BR (Karlova *et al.*, 2006). De hecho, las evidencias recientes indican que SERK1 puede actuar como co-receptor, donde el dominio extracelular juega un papel importante en la activación del complejo receptor BRI1 (Santiago *et al.*, 2013).

La fosforilación de SERK1 se mejora en presencia de brasinolido (BL), y a su vez, BRI1 puede transfosforilar a SERK1 (Karlova *et al.*, 2009). Hasta el momento no se ha

CAPÍTULO II

identificado sustratos de SERK1; no obstante, teniendo en cuenta que la vía de BRI1 depende de la actividad de SERK1 (Gou *et al.*, 2012) y que se requiere de esteroides en la ES (Pullman *et al.*, 2003) y la EC (Schrack *et al.*, 2004), se puede hipotetizar que al menos una de las funciones de SERK1 sea modular la señalización de BR durante la embriogénesis (Smertenko y Bozhkov, 2014b). Sin embargo, esto tiene que ser demostrado experimentalmente. Durante el aislamiento y el análisis subsiguiente del complejo de la proteína SERK1, excepto para BRI1 y SERK3, ninguna de las proteínas que ya se sabían que estaban involucrados en la señalización de BR se encontró (Karlova *et al.*, 2006). Sin embargo, dos nuevas proteínas no aisladas previamente como interactores de SERK1 estaban presentes en el complejo: una proteína dedos de zinc de la familia *CONSTANS*, y el factor de transcripción *AGAMOUS-LIKE 15* (AGL15; Karlova *et al.*, 2006).

Mediante análisis de desplazamiento de fluorescencia (FRET-FLIM) en protoplastos, se demostró la interacción física de AGL15-CFP con SERK1-YFP y 14-3-3 -YFP en la membrana plasmática. Además, se observó que AGL15 se localiza en el citoplasma y en el núcleo (Karlova, 2008). La localización nuclear de AGL15 fue dependiente de la presencia de BR.

AGL15 se expresa en las primeras etapas de la embriogénesis y es relocalizada desde el citoplasma al núcleo en las primeras etapas del desarrollo de embriones cigóticos (Perry *et al.*, 1999). La sobreexpresión de *AGL15* da lugar a un aumento de la competencia embriogénica y un aumento en la expresión de SERK1 (Harding *et al.*, 2003), mientras que la pérdida de función de los mutantes de *AGL15* exhiben una disminución en la capacidad para formar embriones somáticos (Thakare *et al.*, 2008). Es interesante y de gran relevancia para entender la regulación de la ES, que se haya identificado AGL15 como un componente de SERK1 en un complejo de proteínas (Karlova *et al.*, 2006), pues eso sugiere que sus respectivos roles en la vía de transducción de señales se ubican en puntos inmediatos o muy cercanos. Además, *SERK1* y *AGL15*, se expresan como respuesta al tratamiento con auxinas (Zhu y Perry, 2005; Gazzarrini *et al.*, 2004; Nolan *et al.*, 2003).

Por otra parte, otros resultados indican que LEC2 puede inducir directamente la expresión de AGL15, y viceversa (Zheng *et al.*, 2009, Braybrook *et al.*, 2006). También, se conoce

que AGL15 induce la reducción del ácido giberélico (GA) mediante la elevación de los niveles de una GA2 oxidasa (AtGA2ox6) (Wang *et al.*, 2004, Harding *et al.*, 2003), la cual inactiva al GA. El GA ha sido más comúnmente asociado con el crecimiento de plántulas y la disminución de la ES (Henderson *et al.*, 2004), pero no induce la diferenciación celular, por lo que se desconoce cómo se integran estos eventos en la vía de transducción de señales de SERK1.

AGL15 es un factor de transcripción, por lo tanto, la observación de que se encuentra en el citoplasma y en el núcleo (Karlova, 2008) sugiere un proceso de secuestro citoplasmático (Chan, 2013). Por ello, es posible que AGL15 sea secuestrado en el citoplasma por proteínas 14-3-3 hasta su interacción con SERK1 activado, lo cual desacoplaría su unión a 14-3-3 y permitiría la importación nuclear de AGL15 (Chan, 2013; véase el modelo de la Figura 1.4).

Dos investigaciones independientes demostraron que la función de *AtSERK1* y *AtSERK2* en el desarrollo de las anteras puede ser redundante (Albrecht *et al.*, 2005, Colcombet *et al.*, 2005). En estos trabajos demostraron que las dobles mutantes *serk1-1/serk2-2* son estériles masculinos debido a un fallo en la especificación del tapetum y que la fertilidad puede ser restaurada por una sola copia de cualquiera de estos dos genes.

Los patrones de expresión de *SERK1* y *SERK2* se traslapan (Albrecht *et al.*, 2005, Kwaaitaal *et al.*, 2005), pero a diferencia de la mutante *serk1-1*, un alelo mutante *serk2-2* no modifica un alelo mutante débil de *bri1* (Karlova *et al.*, 2006), lo que sugiere que *SERK1* y *SERK2* funcionan juntos en la esporogénesis masculina, pero no en la señalización de BR. Las proteínas *SERK1* y *SERK2* pueden formar homo o heterodímeros en protoplastos, lo que sugiere que son intercambiables en el complejo de señalización *SERK1/SERK2* (Albrecht *et al.*, 2005).

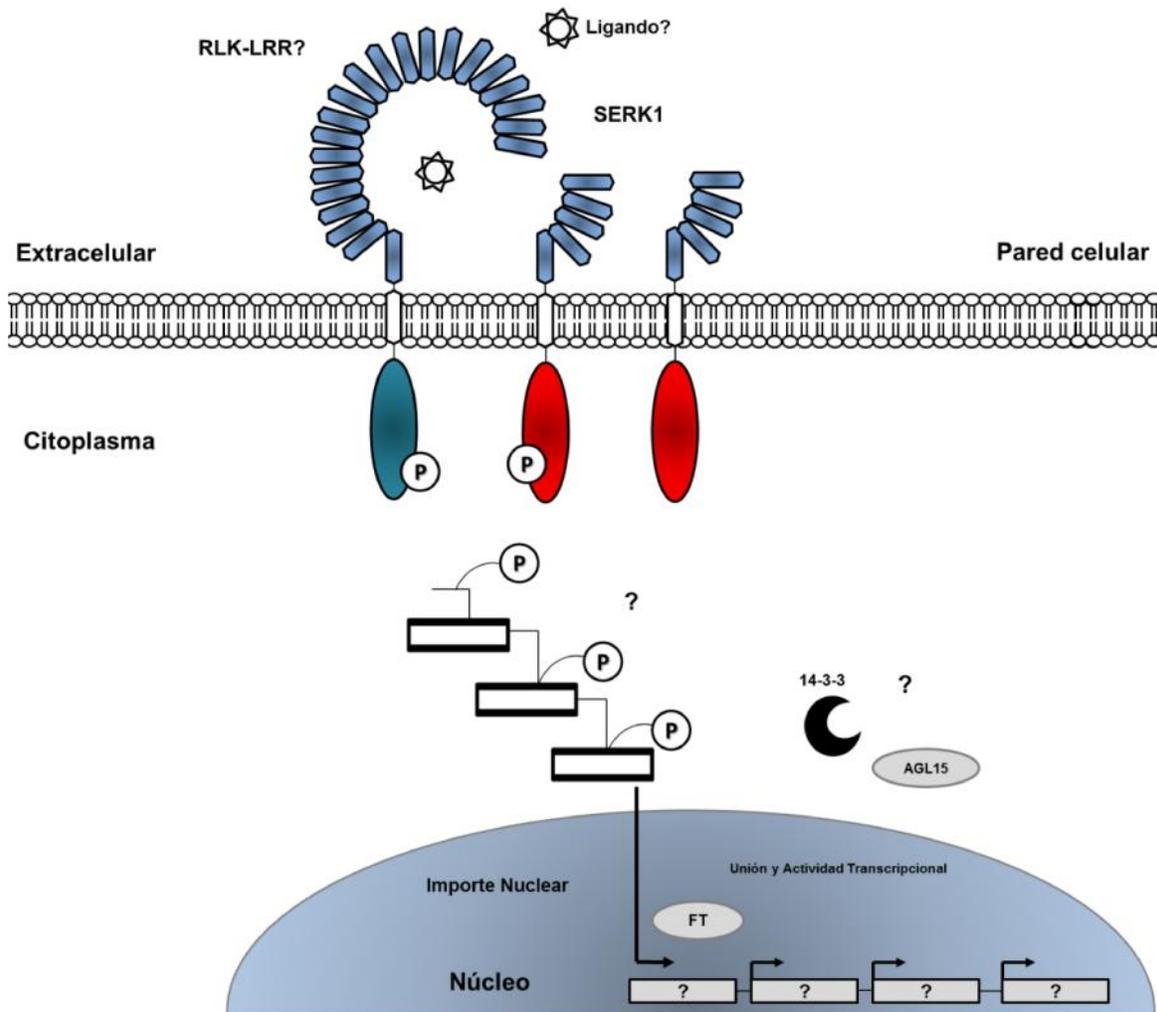


Figura 1.4 Modelo hipotético de la participación de SERK1 durante la ES con base en evidencias experimentales. Después de la heterodimerización de SERK1 con un RLK-LRR de unión a ligando (todavía desconocido) activa a SERK1 a través del dominio de cinasa intracelular, transduciendo la señal desde la membrana celular hacia el sitio de acción, regulando así sucesivos transductores corriente abajo. Eventualmente, la actividad transcripcional conduce en la formación de la ES. Se desconoce cómo se integran en esta vía las proteínas 14-3-3 y AGL15.

El fenotipo observado en la doble mutante *serk1-1/serk2-2* fue similar al observado en las

mutantes *excess microsporocytes1/extra sporogenous cells (ems1/exs)*; Canales *et al.*, 2002; Zhao *et al.*, 2002) y *tapetum determinant1 (tpd1)*; Yang *et al.*, 2003). EMS/EXS son LRR-RLK localizados en la membrana plasmática (Canales *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2002) y TPD1 es un supuesto péptido secretado (Yang *et al.*, 2003).

Lo anterior sugiere que SERK1/SERK2 actúan en la misma vía de EMS1/EXS, incluso formando un complejo (Ge *et al.*, 2010). Además, TPD1 podría actuar como un ligando para EMS1/EXS, o para el complejo putativo de EMS1-SERK1/2 (Jia *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2003), lo cual tiene que ser demostrado experimentalmente.

En otro estudio se ha propuesto que SERK1 puede regular a dos RLK-LRR candidatos, HAE (HAESA) y HSL2 (HAESA-LIKE2). Se ha propuesto que estos receptores “obligan” al péptido secretado IDA (*Infloriscence Deficient in Abscission*) a activar la abscisión del órgano floral a través de la cascada de señalización de las MAPK (Cho *et al.*, 2008, Stenvik *et al.*, 2008). El análisis genético sugiere que NEVERSHED (NEV) y SERK1 funcionan corriente arriba de los receptores HAE/HSL2 y/o en una vía de señalización que regula en paralelo la separación de las células (Lewis *et al.*, 2010). Para este proceso, en lugar de actuar como un co-receptor para el ligando enlazado a HAE/HSL2, SERK1 podría interactuar directamente en un complejo con HAE/HSL2 para promover la endocitosis y/o el cargo interno de estos receptores antes de la unión a ligando y, de ese modo, limitar su capacidad de activar la señalización de abscisión (Bryan, *et al.*, 2012).

En estudios *in planta* se ha encontrado a la proteína SERK1 en los haces vasculares de raíces, tallos, hojas y raíces laterales (Kwaaitaal *et al.*, 2005, Hecht *et al.*, 2001). Colectivamente, estas observaciones sugieren que la señalización mediada por SERK1 es parte de varios procesos del desarrollo que requieren diferenciación celular, que probablemente involucran la función de los BR, incluyendo también la formación de células embriogénicas (Kwaaitaal y de Vries, 2007).

En *A. thaliana* se determinó que SERK1, SERK3 y SERK4 son esenciales para la vía de

CAPÍTULO II

señalización de BR (Gou *et al.*, 2012). Los tres SERK juegan un papel importante en el control del desarrollo de la raíz, en vías dependiente e independiente de BR (Gou *et al.*, 2012, Du *et al.*, 2012); en esta última vía, SERK1 actuaría a través de sus interacciones con un RLK desconocido que si une ligando. Esta vía puede ser regulada a través de la modulación de la expresión de genes del transporte de auxinas y otros genes relacionados con el desarrollo de las raíces tales como *SHORT-ROOT (SHR)* y *WOX5* (Du *et al.*, 2012).

Hasta la fecha, no hay pruebas de que los SERKs puedan actuar como receptores de unión a ligando. Por el contrario, se sugiere que en general son correceptores que regulan múltiples vías independientes por asociación con diferentes LRR-RLKs (Roux y Zipfel, 2012; Chinchilla *et al.*, 2009, 2007; Nam y Li, 2002; Li *et al.*, 2002).

JUSTIFICACIÓN

Los receptores anclados en la membrana juegan un papel fundamental en todos los organismos al reconocer señales del ambiente y de otras células, activando cascadas de señalización corriente abajo, induciendo una respuesta celular específica para cada señal (Morillo y Tax., 2006). Hasta el momento, la cinasa SERK1 marca a las células vegetales que adquieren la competencia embriogénica y al parecer también influye positivamente en la adquisición de la competencia embriogénica. Por ejemplo, En callos derivados de una línea transgénica que sobre-expresa *AtSERK1* se aumentó significativamente la competencia embriogénica (Hecht *et al.*, 2001), mientras que el silenciamiento de *OsSERK1* por RNAi dio como resultado una reducción significativa en las tasas de regeneración (de 72% a 14%; Hu *et al.*, 2005). Por otro lado, mutantes naturales de SERK1 (*serk1-3*) presentan una capacidad embriogénica reducida. Estos resultados sugieren que la señalización de SERK1 es necesaria para la adquisición de competencia embriogénica y la presencia de la proteína se requiere para la formación de células embriogénicas (Kwaaitaal y de Vries, 2007). A pesar de las evidencias anteriores, la participación de la cinasa SERK1 en los mecanismos de regulación de la ES siguen aún sin estar definidos, aunque las evidencias indican que SERK1 es necesaria para regular múltiples vías independientes de diferenciación celular mediante su heterodimerización con diferentes receptores LRR-RLKs. Los datos anteriores generan la interrogante de si la sobre-expresión o la represión de *SERK1* puede ser suficiente para activar o inhibir la vía de señalización durante la diferenciación celular. Además, no se sabe cuáles pueden ser los genes blanco modulados tras la activación del co-receptor *SERK1*, lo cual podría ofrecer información sobre el mecanismo de diferenciación celular que se induce tras su activación. Para contestar estas preguntas, en el presente estudio tuvo como meta generar información que coadyuvara a determinar la dependencia del establecimiento de ES con la expresión del gen SERK1, además de evaluar el nivel de transcripción de genes importantes en procesos de diferenciación celular, con la finalidad de evidenciar cuál(es) de ellos son influenciados directamente por la expresión del gen *SERK1* durante la ES.

CAPÍTULO II

Debido a que por su posible naturaleza regulatoria durante el desarrollo embrionario, los genes blanco de *SERK1* pueden estar expresados en ventanas espacio-temporales pequeñas, lo cual dificultaría su detección, se implementó una estrategia para evidenciar estos genes al enriquecer la población de sus transcritos, mediante la sobre-expresión y la represión regulada de *SERK1* de *C. canephora* en una etapa del proceso en donde normalmente *SERK1* es inducido, para entonces comparar los resultados con los tratamientos testigo.

HIPÓTESIS

Si la expresión del gen *SERK1* es necesaria para la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*, entonces la modulación exógena de su expresión durante este proceso modificará el potencial embriogénico y la transcripción de genes regulatorios de la embriogénesis somática.

OBJETIVOS

Objetivo general

Inducir la expresión exógena de *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *Coffea canephora* para analizar su implicación sobre la capacidad embriogénica y la expresión de genes reguladores de la embriogénesis somática.

Objetivos específicos

- 1. Caracterizar la expresión del gen *SERK1* de *C. canephora* L.**
 - a. Analizar los cambios en los niveles de transcrito de *SERK1* en diferentes tejidos, durante la EC y la ES de *C. Canephora*.
- 2. Modular de forma regulada la expresión del gen *SERK1* durante la embriogénesis somática de *C. canephora* L.**
 - a. Evaluar el efecto intrínseco de la Dexametasona en la formación de embriones somáticos.
 - b. Generar las construcciones génicas del gen *CcSERK1*, que permita su inducción y su represión exógena.
 - c. Modular exógenamente la actividad transcripcional del gen *CcSERK1* en los explantes transformados de *C. canephora*, mediante la adición de Dexametasona.
- 3. Analizar el fenotipo de los explantes transformados con las construcciones génicas de *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *C. canephora* L.**
 - a. Comparar el número de embriones formados en tejidos testigo y transformados con las construcciones génicas del gen *CcSERK1*.
- 4. Analizar la expresión de genes reguladores de la embriogénesis en tejido transformados con las construcciones génicas de *CcSERK1*.**
 - a. Comparar los niveles de transcritos de genes reguladores de la ES en tejidos testigo y transformados con las construcciones génicas del gen *CcSERK1*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

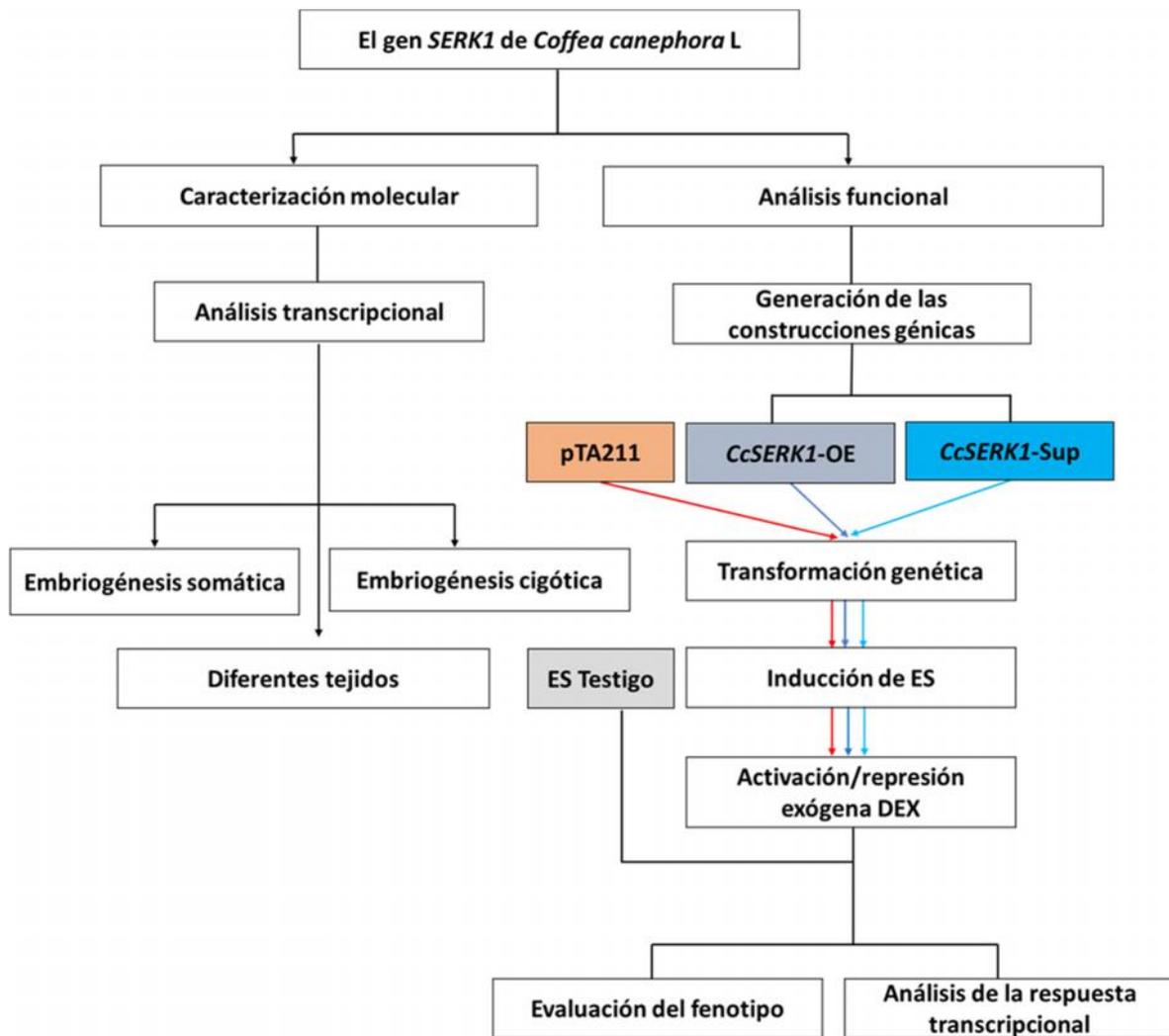


Figura 1.5 Estrategia experimental para caracterizar y analizar la funcionalidad del gen *CcSERK1* durante la inducción de ES de *C. canephora* L.

CAPÍTULO II**PATRONES TRANSCRIPCIONALES DEL GEN HOMÓLOGO DE *SERK1* EN *Coffea canephora* L.**

Parte del contenido de este capítulo se publicó en la revista *Physiologia Plantarum*:

Pérez-Pascual Daniel^a, Jiménez-Guillen Doribet^a, Villanueva-Alonzo Hernán^b, Souza-Perera Ramón^a, Godoy-Hernández Gregorio^a and Zúñiga-Aguilar José Juan^{c,*}(2018). Ectopic expression of the *Coffea canephora* SERK1 homologue induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 163:530-551, DOI: 10.1111/pp.12709.

^aCentro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Mérida, Yucatán, México.

^bCentro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi, Mérida, Yucatán, México.

^cInstituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco, México.

* Corresponding author

2.1 INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de varios genes homólogos de *SERK* en diferentes especies vegetales indica que la familia de genes *SERK* es multigénica. Algunas especies tienen un solo homólogo de *SERK* mientras que otras como *A. thaliana*, *Zea mays*, *M. truncatula*, *Oryza sativa*, *Triticum aestivum*, *Vitis vinífera*, *Rosa hybrida*, *Cyclamen persicum* Mill, y *Ananas comosus*, tienen varios homólogos. (Ma *et al.*, 2012; Savona *et al.*, 2012; Zakizadeh *et al.*, 2010; Maillot *et al.*, 2009; Singla *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2005; Nolan *et al.*, 2003; Baudino *et al.*, 2001; Hecht *et al.*, 2001). Sin embargo, todas las proteínas *SERK* tienen dominios muy conservados que se han utilizado para su identificación en diferentes especies de plantas. El gen *SERK* aislado en *Daucus carota* se relacionó con la expresión de la competencia embriogénica en suspensiones celulares de zanahoria (Schmidt *et al.*, 1997) y a partir de este reporte se han analizado los niveles de expresión a nivel cualitativo y cuantitativo en varias especies como *A. thaliana* (*AtSERK1*; Salaj *et al.*, 2008, Hecht *et al.*, 2001), *Dactylis glomerata* (*DgSERK*; Somleva *et al.*, 2000), *M. truncatula* (*MtSERK*; Nolan *et al.*, 2003), *Theobroma cacao* (Alemanno *et al.*, 2008, de Oliveira Santos *et al.*, 2005), *Triticum aestivum*, (Singla *et al.*, 2008), *Vitis vinífera* (Schellenbaum *et al.*, 2008) entre otras. En estos modelos se ha encontrado que la expresión génica también se le ha asociado con la adquisición de la competencia embriogénica. Por estos antecedentes, la expresión del gen *SERK* se considera como un marcador de las células competentes para formar embriones somáticos e inclusive ha sido sugerido su uso para distinguir las células embriogénicas competentes y no competentes para la embriogénesis somática (Suprasanna y Bapat, 2005).

En este trabajo, uno de los objetivos específicos fue caracterizar la secuencia aislada del cDNA del gen *SERK1* mediante la bioinformática, así como medir sus niveles de expresión durante el proceso de ES, durante la embriogénesis cigótica y en diferentes tejidos de la planta.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material biológico

Se emplearon plántulas de la especie *Coffea canephora* cultivadas *in vitro* en medio de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog 1962), suplementado con tiamina-HCl 29.6 μM , myo-inositol 550 μM , cisteína 0.15 μM , ácido nicotínico 16.24 μM , sacarosa 87.64 μM y Gelrite 0.25 % (w/v), pH 5.8 y se cultivaron a 25 ± 2 °C bajo un fotoperiodo estándar de 16/8h ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2.2 Metodología

2.2.2.1 Análisis bioinformático de la secuencia de cDNA de *CcSERK1*

La secuencia de nucleotídica completa del cDNA y la secuencia deducida de aminoácidos de *CcSERK1* fueron utilizadas para buscar secuencias homólogas a través de búsquedas BLASTn y BLASTp en el genoma de *Coffea canephora* [Coffee Genome Hub (<http://coffee-genome.org/>)].

2.2.2.2 Análisis filogenético de *CcSERK1*

La secuencia deducida de aminoácidos del marco de lectura abierto (Open Reading Frame: ORF) de *CcSERK1* fue utilizada para el análisis filogenético utilizando el programa Mega 7 (<http://www.megasoftware.net>), mediante el método “Neighbor-Joining” (NJ) con el criterio p-distance colectando 1000 réplicas bootstrap.

2.2.2.3 Inducción de la embriogénesis somática de *Coffea canephora*

El proceso de ES se realizó de acuerdo con el protocolo reportado por Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006, el cual consta de dos etapas:

- i. Una etapa de precondicionamiento de las plántulas cultivadas *in vitro*, por un período de 14 días en un medio de cultivo MS que contiene ácido naftalénacético (NAA) 0.54 μM (Sigma-Aldrich Chemical Co., Louis, MO) y Kinetina (Kin) (2.32 μM) (Sigma-Aldrich).
- ii. La etapa de embriogénesis, inducida en los explantes foliares cultivados en medio Yasuda modificado (Yasuda *et al.*, 1985) mediante la adición de 6-BA 5 μM (Sigma-Aldrich) y se cultivaron a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 55 rpm.

2.2.2.4 Aislamiento de RNA total

El RNA total fue extraído a partir de 100 mg tejido colectado durante el proceso de ES, EC, hoja, tallo, raíz, SAM, botón floral, utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen, Carlsbad CA), como se describe en el anexo I.I.

La concentración se analizó mediante el uso del Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE) y integridad del RNA total se verificó en electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

2.2.2.5 Análisis de expresión de *CcSERK1* por qRT-PCR

La eliminación de DNA genómico y la síntesis de cDNA de todas las muestras se realizó utilizando 600 ng de RNA total de acuerdo con el protocolo de Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase (Thermo Scientific).

Para el análisis de expresión de *CcSERK1* se utilizó el termociclador Rotor-Gene Q 5-Plex (Qiagen, Valencia, CA) en un volumen final de 20 μ L utilizando el QuantiNovaTM SYBR Green PCR kit (Qiagen), 5 μ L de cDNA (160 ng), 1.4 μ L de cada cebador específico (0.7 μ M concentración final).

Las condiciones fueron 95 °C durante 2 min, seguido por 40 ciclos 95 °C durante 5 s y 62 °C durante 10 s, las reacciones se realizaron por triplicado. El gen EF-1 se utilizó como control interno y los datos fueron calculados de acuerdo con el método 2^{-CT} (Livak y Schmittgen, 2001). Los cebadores específicos utilizados se encuentran en el anexo I.VII

Previo al análisis de qRT-PCR se determinó la ausencia de dímeros de los cebadores específicos empleados, mediante el análisis de la curva de fusión y la eficiencia de amplificación de ambos genes.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Análisis bioinformático de *CcSERK1*

En el año 2013, en un trabajo previo se aisló en nuestro laboratorio el DNAC completo del gen homólogo de *SERK1* de *Coffea canephora* (Pérez-Pascual, 2013), en ese entonces se empleó la técnica de RACE debido que la secuencia del genoma de esta especie no se había publicado, el análisis bioinformático utilizando secuencias de homólogos de los genes *SERK* reportadas en NCBI indicó que se había clonado a un ortólogo de *SERK1* de café.

En el presente trabajo se utilizó la base de datos del genoma de café (Denoëud *et al.*, 2014), para comparar la secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del cDNA aislado en nuestro laboratorio (*CcSERK1*) con la secuencia reportada en la base de datos. El posible gen *SERK1* de *C. canephora* se encuentra en el cromosoma 10 (Cc10_g06160). Los resultados del análisis mostraron que ambas secuencias tienen un 99 % de identidad, con 100 % de cobertura.

La secuencia deducida de aminoácidos del cDNA clonado en nuestro laboratorio tiene siete cambios con respecto a la secuencia reportada en la base de datos. La mayoría de los cambios de aminoácidos son conservados y significan el cambio de un aminoácido alifático por otro. Aunque estos cambios se localizan en el dominio de cinasa, no hay reportes que mencionen que esos cambios puedan afectar la actividad de la proteína.

Cc10_g06160	MAR	EGLVSV	VLWLMVFP	LKLILANMEG	DALHSLRNTL	QDPNNVLQSW	DPTLVNPCTW	FHVTCNNDNS	VIRVDLGNA			
CcSERK1	MAR	EGLVSV	VLWLMVFP	LKLILANMEG	DALHSLRNTL	QDPNNVLQSW	DPTLVNPCTW	FHVTCNNDNS	VIRVDLGNA			
	81								160			
Cc10_g06160	LSGQLVPQLG	LLKNLQYLEL	YSNNISGPIP	SDLGNLTNLV	SLDLYLNSFN	GPIPDTLGKL	SKLRFRLN	NSLTGPIPLS				
CcSERK1	LSGQLVPQLG	LLKNLQYLEL	YSNNISGPIP	SDLGNLTNLV	SLDLYLNSFN	GPIPDTLGKL	SKLRFRLN	NSLTGPIPLS				
	161								240			
Cc10_g06160	LTNISSLQVL	DLSNRLSGA	VPDNGSFSLF	TPISFANNLD	LCGPVTGRPC	PGSPPFSPPP	PFVPPPPIAT	PGGNSATGAI				
CcSERK1	LTNISSLQVL	DLSNRLSGA	VPDNGSFSLF	TPISFANNLD	LCGPVTGRPC	PGSPPFSPPP	PFVPPPPIAT	PGGNSATGAI				
	241								320			
Cc10_g06160	AGGVAAGAAL	LFAAPAIAFA	WRRRKPQEY	FFDVPAEEDP	EVHLGQLKRF	SLRELQVATD	SFSNKNILGR	GGFGKVKGR				
CcSERK1	AGGVAAGAAL	LFAAPAIAFA	WRRRKPQEY	FFDVPAEEDP	EVHLGQLKRF	SLRELQVATD	SFSNKNILGR	GGFGKVKGR				
	321								400			
Cc10_g06160	LADGSLVAVK	RLKEERTPGG	ELQFQTEVEM	ISMVHRNLL	RLRGFCMTPT	ERLLVYPYMA	NGSVAS	CLRE	RPPNEPPLNW			
CcSERK1	LADGSLVAVK	RLKEERTPGG	ELQFQTEVEM	ISMVHRNLL	RLRGFCMTPT	ERLLVYPYMA	NGSVAS	RLRE	RPPNEPPLNW			
	401								480			
Cc10_g06160	STRKRI	ALGS	ARGL	SYLHDH	CDPKIIHRD	V	KAANILLDEE	FEAVVGFGL	AKLMDYKDT	VTTAVRG	TIG	HIAPEYLSTG
CcSERK1	STRKRI	VLGS	ARGL	LILHDH	CDPKIIHRD	A	KAANILLDEE	FEAVVGFGL	AKLMDYKDT	VTTAVRG	TIG	HIAPEYLSTG
	481											560
Cc10_g06160	KSSEKTDVFG	YGIMLLELIT	GQRAFDLARL	ANDDVMLLD	WVKGLLKEKK	LEMLVDPDLQ	NNYVE	SEVEQ	LIQVALLCTQ			
CcSERK1	KSSEKTDVFG	YGIMLLELIT	GQRAFDLARL	ANDDVMLLD	WVKGLLKEKK	LEMLVDPDLQ	NNYVE	SEVEQ	LIQVALLCTQ			
	561											625
Cc10_g06160	GNPMDRPKMS	EVVRMLEG	GG	LAERWDEWQK	VEV	FRQVEL	APPPNSDWIV	DSTENLHAVE	LSGPR			
CcSERK1	GNPMDRPKMS	EVVRMLEG	GG	LAERWDEWQK	VEV	FRQVEL	APPPNSDWIV	DSTENLHAVE	LSGPR			

Figura 2.1 Alineamiento de la secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1. Análisis de la secuencia aislada en nuestro laboratorio con la secuencia del genoma de *Coffea canephora*, en gris se muestra los cambios de aminoácidos en ambas secuencias. La secuencia denominada CcSERK1 es la que se clonó en el laboratorio, Cc10_g0616 es la clona reportada en el genoma de *C. canephora*.

Con el objetivo de determinar de manera indirecta el número probable de genes que integran la familia SERK en *C. canephora*, se utilizó la secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1 y las secuencias de los SERK de *A. thaliana*, para realizar una búsqueda tipo Blast y el análisis de las secuencias identificadas en los cromosomas del genoma de *C. canephora*.

Los resultados demostraron que, además de alinear con la clona Cc10_g06160, CcSERK1 se alineó con otras dos secuencias. Una de ellas esta parcialmente secuenciada con un tamaño de 420 aminoácidos y esta localizada en el cromosoma 11 (Cc11_g17480), mientras que la otra secuencia, anotada como SERK3/BAK1, se encuentra localizada en el cromosoma 2 (Cc02_g21820).

CAPÍTULO II

El alineamiento múltiple indica que la secuencia SERK3/BAK1 tiene mayor semejanza con la clona Cc10_g06160 (Figura 2.2) con un 83% de identidad, por lo que en realidad esta clona (Cc02_g21820) debe corresponder al homólogo del gen *SERK2* y no al gen *SERK3/BAK1* como se encuentra anotada en el genoma.

```

1                                     80
Cc10_g06160  MAREEGL VSVVLWLMV FHPKLILAN MEGDALHSLR TNLQDPNNVL QSWDPTLVNP CTWFHVTCNN DNSVIRVDLG
Cc02_g21820  MDRSVVSAIS ASAFISFLLL FLRFLRVSGN AEGDALNALK TNLADPNVNL QSWDPTLVNP CTWFHVTCNS DNSVTRVDLG
Cc11_g17480  MAFRIL FHLSSLFLHL LLAPRGINAN FEGDALYALR RAVKDPDNVL QSWDPTLVDP CTWFHVTCDG DNRVTRLDLG

81                                     160
Cc10_g06160  NAALSGQLVP QLGLLKNLQY LELYSNNISG PIPSDLGNTL NLVSLDLYLN SFNGPIPDTL GKLSKLRFLR LNNNSLTGPI
Cc02_g21820  NANLSGQLVP QLGLLPNLQY LELYSNNISG RIPNELGNLT NLVSLDLYLN SLNGPIPDTL GKLQKLRFLR LNNNTLTGHI
Cc11_g17480  NAKLSGNLVP ELGRLERLQY LELYMNNLGG AIPAEGLGK RLISLDLYHN NLTGPIPPSL SNLSALRFLR LNGNRLTGR

161                                    240
Cc10_g06160  PLSLTNISSL QVLDLSNNRL SGAVPDNGSF SLFTPIISFAN NLDLCGPVTG RPCPGSPFFS PPPPFVPPPP IATPGGNSAT
Cc02_g21820  PMTLTTVQTL QVLDLSNNQL TGQIPVNGSF TLFPTISFQN NH--LDPL-- -----PVS PPPPISPTPP SAR-GTNSAT
Cc11_g17480  PRQLTKLGNL KILDVSNNDL CGTIPSTGPF SKFGEESFAN NPRLEGP--- -----

241                                    320
Cc10_g06160  GAIAGGVAAG AALLFAAPAI AFAWRRRKP QEYFFDVPAE EDPEVHLGQL KRFSLRELQV ATDSFSNKNI LGRGGFGKVV
Cc02_g21820  GAIAGGVAAG AALLFAAPAI LLAWRRRKP QDHFFDVPAE EDPEVHLGQL KRFSLRELQV ATDSFSNKNI LGRGGFGKVV
Cc11_g17480  -ELMGFVR-- ----- -YDVGSC N----- -RELQV ATNFFSKNI LKGGGFGNVY

321                                    400
Cc10_g06160  KGRLADGSLV AVKRLKEERT PGGELQFQTE VEMISMAVHR NLLRLRGFCM TPTERLLVYP YMANGSVASC LRERPNEPP
Cc02_g21820  KGRLADGSLV AVKRLKEERT QGGELQFQTE VEMISMAVHR NLLRLRGFCM TPTERLLVYP YMVNGSVASC LRERPSEPP
Cc11_g17480  KGYLQDGTIV AVKRLKDGNA IGGDIQFQTE VEMISLAVHR NLLRLYGFCI TPTERLLVYP FMSNGSVA-- -----PP

401                                    480
Cc10_g06160  LNWSTRKRRIA LGSARGLSYL HDHCDPKIIH RDVKAANILL DEEF EAVVGD FGLAKLMDYK DTHVTTAVRG TIGHIAPEYL
Cc02_g21820  LDWPIRKRIS LGSARGLAYL HDHCDPKIIH RDVKAANILL DEEF EAVVGD FGLAKLMDYK DTHVTTAVRG TIGHIAPEYL
Cc11_g17480  LDWGRKRRIA LGAARGLLYL HEQCDPKIIH RDVKAANILL DDYCEAVVGD FGLAKLLDHR DSHVTTAVRG TVGHIAPEYL

481                                    560
Cc10_g06160  STGKSSEKTD VFGYGIMLLE LITGQRAF DL ARLANDDV M LLDWVKGLL EKKLEMLVDP DLQNNYVESE VEQLIQVALL
Cc02_g21820  STGKSSEKTD VFGYGVMLLE LITGQRAF DL ARLANDDV M LLDWVKGLL EKKLETLVDA DLQGNVVEDE VEQLIQVALL
Cc11_g17480  STGQSSEKTD VFGFGILLE LITGQRAL-- ----- EKKLETLVDA DLQGNVVEDE VEQLIQVALL

561                                     629
Cc10_g06160  CTQGNPMDRP KMSEVVRMLE GDGLAERWDE WQKVEVLRQE VELAPPNSD WIV-DSTENL HAVELSGPR
Cc02_g21820  CTQSSPTEP KMSEVVRMLE GDGLAERWEE WQKEEMFRQD FNHTHHPNTD WIADSTSNL RPDELSGPR
Cc11_g17480  -----

```

Figura 2.2 Alineamiento de *SERKs* identificados en el genoma de *Coffea canephora* L. Comparación de las tres secuencias deducidas de aminoácidos anotadas en el genoma de *Coffea canephora*.

Las secuencias de los tres genes putativos genes de *SERK* de *C. canephora* fueron alineados con las correspondientes secuencias de los genes *SERK* de *A. thaliana*, para construir un árbol filogenético para predecir la distancia genética entre estos genes (Figura 2.3).

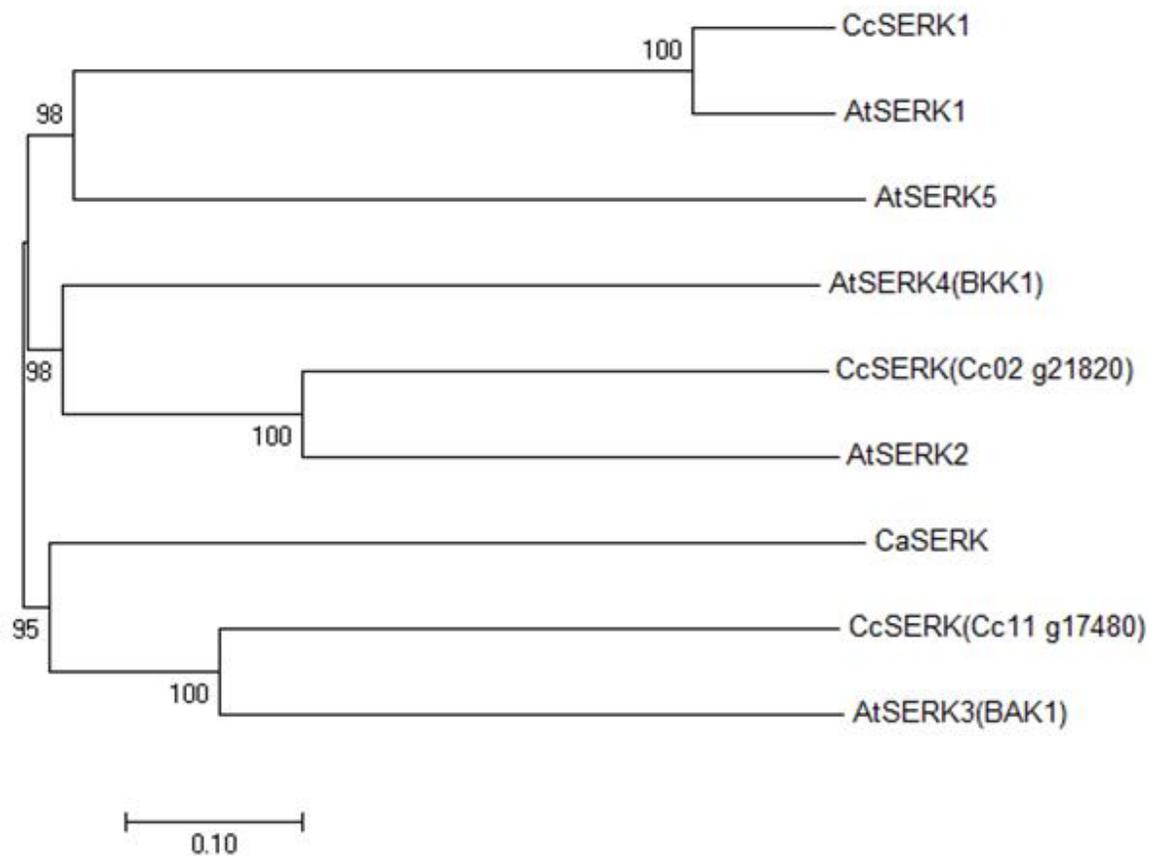


Figura 2.3 Análisis filogenético de CcSERK1. El árbol sin raíz fue construido con el programa MEGA 7, se empleó el método “Neighbor-Joining” (NJ), con 1000 réplicas bootstrap. Se utilizó la secuencia deducida de aminoácidos de CcSERK1 aislada por Perez-Pascual, 2013. El número de accession de SERKs de *Arabidopsis thaliana*; AtSERK1 (AAK82463), AtSERK2 (AAK68073), AtSERK3 (BAK1, AAK68074), AtSERK4 (NP_178999.2), AtSERK5 (NP_179000), *Coffea canephora*; CcSERK (Cc02_g21820, anotada como CcBAK1), CcSERK (Cc11_g17480), y *Coffea arabica*; CaSERK (C166).

El análisis filogenético demostró que *CcSERK1* se agrupó en un clado con *AtSERK1* y se encuentra alejado de las otras dos secuencias de SERK reportadas en el genoma. La secuencia Cc02_g21820 anotada como *CcBAK1* se agrupó formando un clado con *AtSERK2* y no con *AtSERK3* (*BAK1*), lo que concuerda con nuestra propuesta de que dicha secuencia en realidad es *CcSERK2*.

En cambio, la secuencia Cc11_g17480 se agrupa con *AtSERK3* y SERK de *C. arabica* (*CaSERK*: EST-C166, reportado por Silva *et al.*, 2014), por lo que es probable que esta secuencia corresponda al gen homólogo de SERK3 de *C. canephora* (ver figura 2.3).

2.3.2 Análisis de expresión de *CcSERK1* en diferentes tejidos

El análisis de qRT-PCR mostró que los transcritos de *CcSERK1* estaban presentes en los diferentes tejidos analizados provenientes de plantas *in vitro*, que incluyeron hojas, raíces, tallos, meristemo apical (SAM), botón floral en estado latente (BFL) y botón floral en estado de preantesis (BFP; Figura 2.4). Los transcritos de *CcSERK1* fueron mas abundantes en el meristemo apical (SAM) y BFP, mientras que, en los tejidos de tallo y raíz, mostraron niveles basales. En el caso de BFL y hoja, los niveles fueron casi imperceptibles.

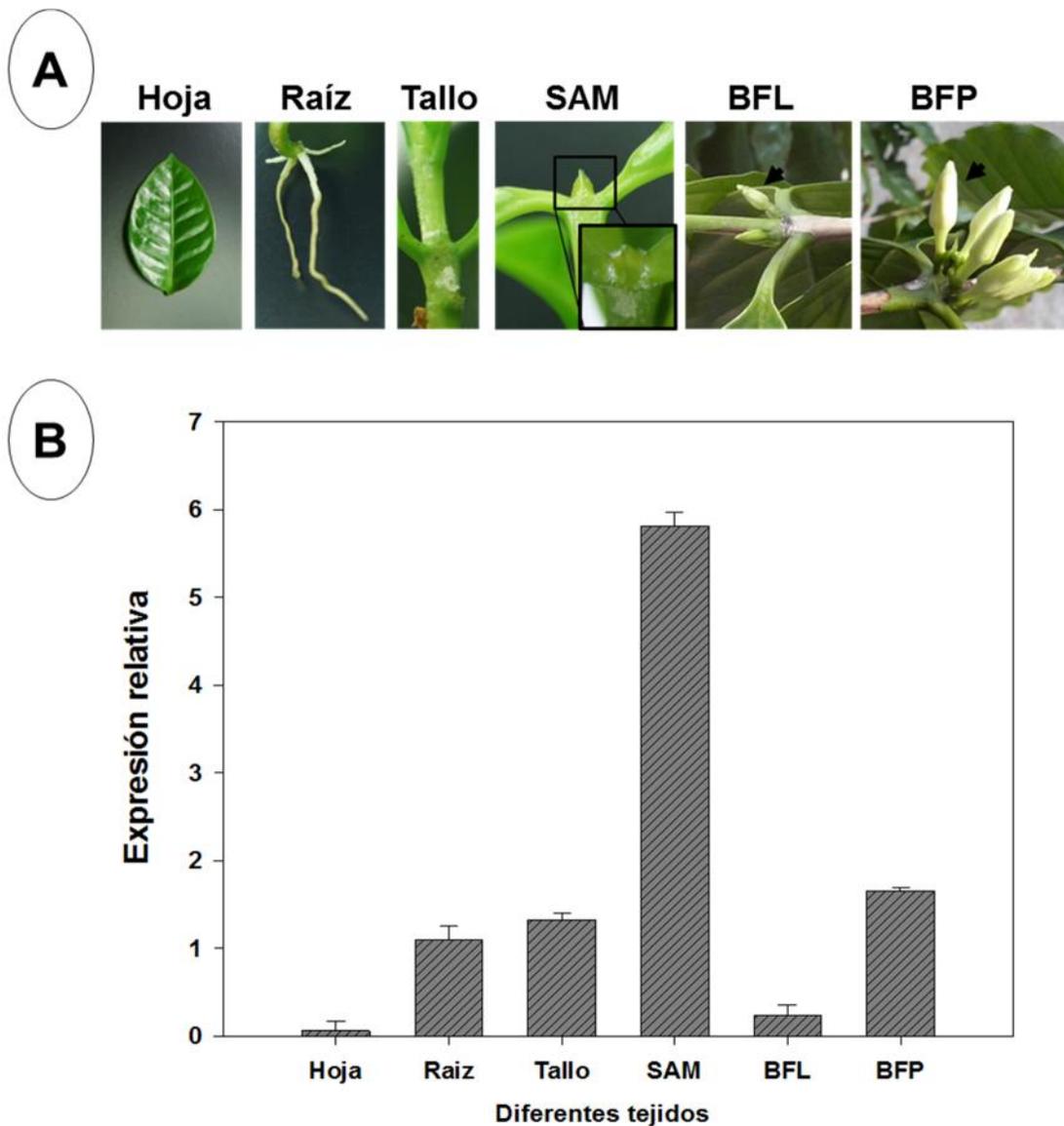


Figura 2.4 Patrón transcripcional de *CcSERK1* en diferentes órganos de la planta. A) Diferentes tejidos de *C. canephora*: hoja, raíz, tallo y SAM provienen de plántulas *in vitro* y BFL y BFP provienen de una planta *ex vitro*. B) Expresión relativa de *CcSERK1* por qRT-PCR, empleando cebadores específicos de *SERK1* y RNA total extraído de muestras de diferentes partes de las plántulas de ocho meses de edad, cultivadas *in vitro* en medio MS sin reguladores de crecimiento, y a partir de botones florales de plantas cultivadas *ex vitro*. El gen *EF-1* se utilizó como gen normalizador. Las barras sobre las columnas representan el error estándar de los resultados de tres experimentos independientes (n=3). SAM: Meristemo apical del tallo, BFL: Botón floral en estado latente, BFP: Botón floral en preantesis.

2.3.3 Análisis de expresión de *CcSERK1* durante la embriogénesis

Se ha reportado que el gen *AtSERK1* de *A. thaliana* se expresa durante las primeras etapas de la embriogénesis cigótica, en todas las células del embrión en desarrollo después de la fertilización y hasta la etapa de corazón (Hecht *et al.*, 2001). En *C. canephora* analizamos la expresión del gen homólogo en las primeras etapas del proceso y en los diferentes estadios de desarrollo del embrión cigótico.

El análisis de la expresión génica durante la EC se muestra en la Figura 2.5, en ella se observa que después del primer día post-antesis (dpa) la expresión de *CcSERK1* aumentó hasta 1.5 con respecto al día cero, para disminuir a niveles casi imperceptibles para el tercer dpa. En *A. thaliana* se ha observado una mayor expresión de *AtSERK1* en los pétalos florales (Hecht *et al.*, 2001), sin embargo, durante la colecta se observó que, para el tercer dpa, los pétalos ya se encontraban desecados y estaban desprendiéndose del órgano floral, quedando solo el pistilo; esto puede explicar la disminución en la expresión de *CcSERK1* en este punto.

A los siete dpa, la expresión de *CcSERK1* volvió a aumentar para, posteriormente, disminuir a niveles basales hacia los 12 dpa. Durante los diferentes estadios del desarrollo del embrión cigótico, los niveles de transcrito en el estadio globular y corazón mostraron una mayor expresión, mientras que en los estadios posteriores la expresión disminuyó. Estos resultados son muy similares a los observados en *A. thaliana* y *M. truncatula* (Nolan *et al.*, 2009, Hecht *et al.*, 2001).

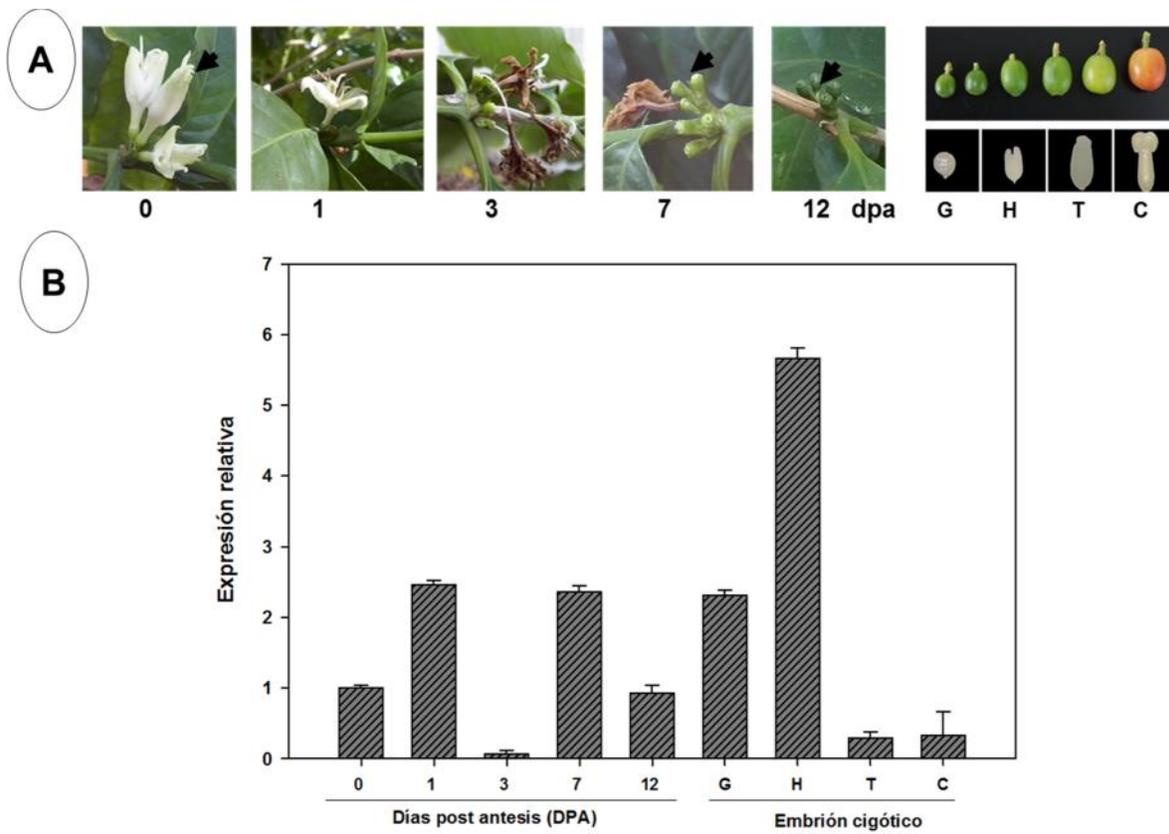


Figura 2.5 Análisis de expresión del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis cigótica de *C. canephora* L. Se muestran los datos obtenidos mediante RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de RNA total extraído a partir de muestras colectadas durante etapas tempranas de la embriogénesis cigótica y en los diferentes estadios del desarrollo embrionario de plantas de *coffea canephora* cultivadas *ex vitro*. A) Los diferentes tiempos colectados van de 0 a 12 dpa y diferentes estadios del desarrollo embrionario. B) Análisis de expresión del gen *CcSERK1*; la flor recién abierta fue tomada como tiempo cero y los niveles de expresión fueron normalizados al día 0. Las barras sobre las columnas representan el error estándar (n=3). Las puntas de flecha de color negro indican el tejido empleado para este análisis. G: globular, H: corazón, T: torpedo y C: cotiledonar.

2.3.4 Análisis de expresión del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis somática

Los niveles endógenos de transcritos del gen *CcSERK1* durante la ES de *C. canephora*, fueron analizados utilizando muestras de RNA total extraído de diferentes tiempos del proceso de ES (pretratamiento, inducción y desarrollo). Para el caso del pretratamiento se utilizaron hojas jóvenes para el análisis. Después de los 30 días de cultivo (DIC) de la etapa de inducción los embriones somáticos fueron separados del explante y clasificados por estadio de desarrollo embriogénico: globular (G), corazón (H), torpedo (T) y cotiledonar (C).

Los resultados mostraron niveles dinámicos del transcrito del gen *SERK1* durante todo el proceso analizado (Figura 2.6), presentando niveles significativamente altos en la etapa de pretratamiento, en los primeros seis días y al término de la etapa a los 14 DIC.

Durante la inducción se observaron tres puntos importantes de alta transcripción: i) En las primeras 12 horas de haberse iniciado la etapa de inducción del proceso embriogénico (0.5 días); ii) Un segundo pico de expresión entre los siete y 10 DIC del proceso; iii) Un tercer pico de expresión a los 20 DIC. Cuando se analizó el patrón transcripcional durante los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos, se encontró un pico de expresión en el estadio globular.

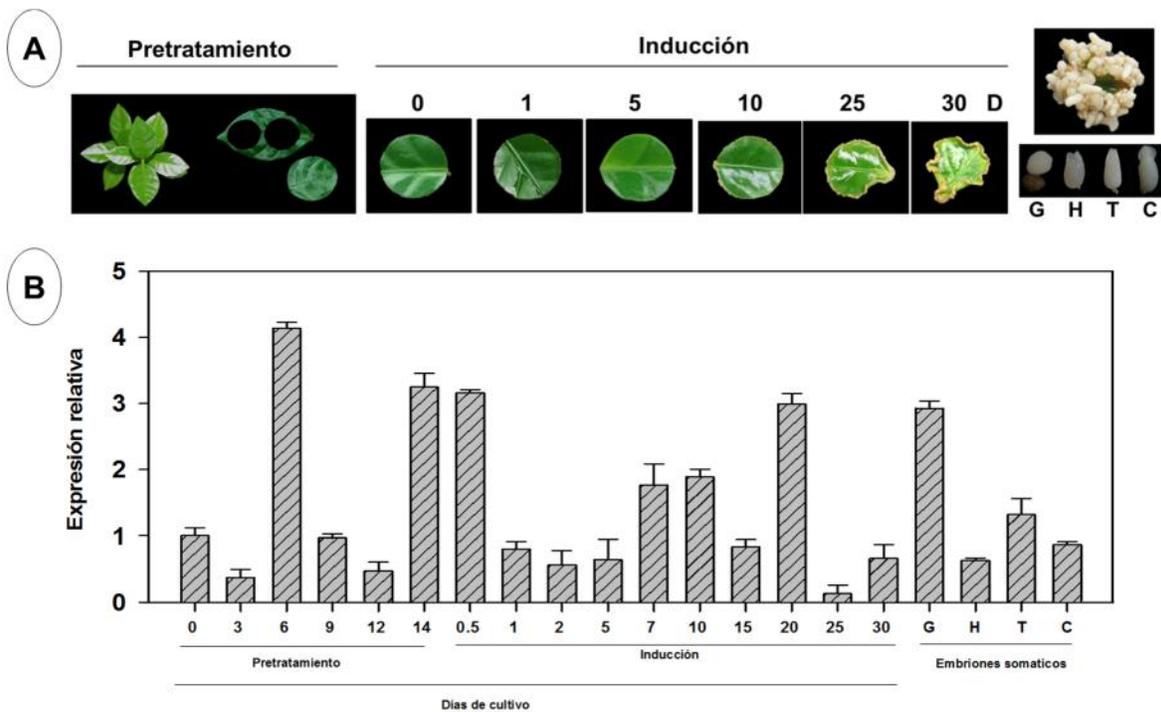


Figura 2.6 Expresión relativa del gen *CcSERK1* durante la embriogénesis somática de *C. canephora* L. Se muestra los niveles de expresión del gen *CcSERK1* medido por qRT-PCR, empleando cebadores específicos y RNA total extraído de explantes con diferentes días de cultivo del proceso de ES. A) Los diferentes tiempos colectados que van desde el pretratamiento, inducción y los diferentes estadios del desarrollo embrionario, G: globular, H: corazón, T: torpedo y C: cotiledonar. B) Análisis de expresión del gen *CcSERK1* durante todo el proceso de ES. El gen *EF-1* se utilizó como gen normalizador, con referencia al tiempo cero. Las barras sobre las columnas representan el error estándar de los resultados de tres experimentos independientes (n=3).

2.4 DISCUSIÓN

Puede confirmarse que la secuencia de cDNA aislada en nuestro laboratorio (nombrado *CcSERK1*) corresponde al homólogo de *SERK1* de *Coffea canephora*, pues tiene un 99 % de identidad (con 100 % de cobertura) con la secuencia nucleotídica anotada en el genoma de *Coffea canephora* (Cc10_g06160). Además, la proteína deducida codificada por el ORF de *CcSERK1* corresponde a una proteína nativa no mutada porque cuenta con todos los dominios característicos de un receptor RLK y dominio extracelular posee una región rica en prolina, conteniendo el motivo serina-prolina-prolina (SPP); este motivo es una firma característica distintiva de las proteínas SERK que las distingue de otras proteínas de la familia LRR-RLK (Hecht *et al.*, 2001).

Una búsqueda con herramientas bioinformáticas reveló que la familia de genes *SERK* en *C. canephora* está integrada por tres miembros codificados en las clonas Cc02_g21820 (anotado como *SERK3/BAK1*), Cc11_g17480 (con secuencia incompleta) y Cc10_g06160 (anotada como *SERK1*). Un análisis filogenético entre estas secuencias y los cinco miembros de genes *SERK* de *Arabidopsis*, agrupó a *CcSERK1* con *AtSERK1* y Cc02_g21820 se agrupó formando un clado con *AtSERK2*, por lo que es probable que esta secuencia en realidad sea *CcSERK2*. En cambio, la secuencia Cc11_g17480 se agrupa con *AtSERK3* y *SERK* de *C. arabica* (Silva *et al.*, 2014), por lo que es probable que esta secuencia corresponda realmente al homólogo de *SERK3* de *C. canephora*.

De esta manera, los resultados de este trabajo permiten proponer que el genoma de *C. canephora* contiene tres genes *SERK*, *CcSSERK1*, *CcSERK2* y *CcSERK3*. Es importante mencionar que el gen *CcSERK3* está incompleto (420 aminoácidos), por lo que puede haber dos posibilidades, que no se haya secuenciado por completo aún, o que este gen esté mutado. El ensamblaje completo del genoma de *C. canephora* permitirá conocer cuál de estas dos opciones es la correcta.

El análisis de expresión de *CcSERK1* en los diferentes tejidos de plantulas *in vitro*, mostró que en tallo y raíz la expresión relativa fue baja, mientras tanto en BFP y SAM fueron los tejidos con mayor transcripción, sin embargo, en hoja y BFL los niveles de transcritos de *CcSERK1* eran casi indetectables en comparación a los demás tejidos analizados.

La alta expresión en SAM coincide con los resultados obtenidos por Huang *et al.* (2014) y

Savona *et al.* (2012), quienes también encontraron que *SERK1* es altamente expresado en este tejido.

Durante la EC, los transcritos de *CcSERK1* mostraron un incremento en el primer día y otro a los siete dpa; el incremento a los siete dpa puede deberse a la fertilización, la cual ocurre durante este período después de la apertura de la flor (Leon, 2000). A los 12 dpa la expresión de *CcSERK1* disminuye.

Con relación a los estadios de desarrollo embrionario, el estadio de globular y corazón mostraron alta expresión, siendo el estadio corazón el que presentó una mayor transcripción, para los estadios siguientes la expresión fue muy reducida. Este resultado es muy similar a lo observado en *A. thaliana* y *M. truncatula*, especies en las que la alta expresión se observa en el estadio de corazón y posteriormente esta expresión ya no es observada (Nolan *et al.*, 2009, Hecht *et al.*, 2001).

Los picos de expresión del gen *CcSERK1* durante la ES sugieren que su transcripción puede estar asociada a los cambios endógenos de auxina durante el paso de pretratamiento, ya que la alta expresión en hoja a los seis DIC coincide con los cambios en los niveles de IBA y de NAA, mientras que a los 14 días coincide con los niveles altos de AIA (Ayil-Gutierrez *et al.*, 2013). Después de las 12 h del proceso de inducción, los niveles de transcrito del gen *CcSERK1* disminuyeron, manteniéndose hasta los cinco DIC, lo cual parece indicar que la 6-BA inhibe directamente la expresión de *CcSERK1* en los primeros cinco días. Este resultado coincide con lo reportado en maíz, para el que donde la expresión de *ZmSERK1* y *ZmSERK2* es inhibida por la acción directa de la citocinina (Zhang *et al.*, 2011), por otro lado, la expresión de *MtSERK1* no es inducida por BA, sin embargo, la alta expresión ocurre cuando se combina con la auxina (BA + NAA) incrementando cuatro veces a los siete días del proceso embriogénico (Nolan *et al.*, 2003). Adicionalmente, la disminución en la expresión de *CcSERK1* observada en el presente trabajo coincide con la disminución de los niveles endógenos de IAA libre y conjugados en presencia de 6-BA (Ayil-Gutierrez *et al.*, 2013) en el mismo modelo de estudio.

El incremento a los siete y 10 DIC coincide también con los cambios morfológicos en el

CAPÍTULO II

explante, cuando se observa engrosamiento y formación de nódulos en el borde del explante.

Por otra parte, ha sido reportado previamente que en este periodo se incrementan los niveles endógenos de IAA libre y conjugados (IAA-Alanina y IAA-Acido Glutámico; Ayil-Gutierrez *et al.*, 2013). La alta expresión de *CcSERK1* y la alta acumulación de auxina endógena en este período del proceso pueden ser cruciales para las células del explante, ya que pudieran estar siendo reprogramadas para expresar el potencial embriogénico.

A los 20 DIC del proceso embriogénico comienza la formación de masa proembriogénica y a partir de ella se forman las primeras estructuras embriogénicas, por lo tanto, la alta expresión del gen *SERK1* en este punto está directamente relacionada con la desdiferenciación celular de los embriones somáticos a partir de las masas proembriogénicas. El análisis de expresión génica en embriones en diferentes estadios reveló que el estadio globular presenta el mayor nivel de expresión que los estadios de corazón, torpedo y cotiledonar, aunque el estadio de torpedo mostró un ligero incremento. La alta expresión génica en el estadio globular en *C. canephora* coincide con los resultados obtenidos en *D. carota*, *D. glomerata* y *A. thaliana*, especies en las que el correspondiente homólogo de *SERK1* es altamente expresado en este estadio (Hecht *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1997).

Es interesante notar que hay una diferencia en la expresión de *CcSERK1* entre las hojas de las plantas pretratadas *in vitro* con RCV a los 14 días y las hojas de plántulas cultivadas en ausencia de RCV, donde la expresión casi no es detectada. Siendo este el tejido que se utiliza como explante para la ES y el hecho de que los niveles de expresión de *CcSERK1* en las plantas pretratadas fueran relativamente altos, sugiere que la adición de auxinas y citocininas de durante este periodo es decisivo tanto para modificar el balance hormonal endógeno (Ayil-Gutierrez *et al.*, 2013) como para inducir la alta expresión de *CcSERK1* (T0 de ES, Figura 2.6); ambos eventos parecen estar relacionados y deben conducir a las plantas pretratadas a alcanzar la competencia embriogénica.

CAPÍTULO III

REGULACIÓN EXÓGENA DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN *CcSERK1* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Coffea canephora* L.

Parte del contenido de este capítulo se publicó en la revista *Physiologia Plantarum*:

Pérez-Pascual Daniel^a, Jiménez-Guillen Doribet^a, Villanueva-Alonzo Hernán^b, Souza-Perera Ramón^a, Godoy-Hernández Gregorio^a and Zúñiga-Aguilar José Juan^{c,*}(2018). Ectopic expression of the *Coffea canephora* SERK1 homologue induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 163:530-551, DOI: 10.1111/ppl.12709.

^aCentro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Mérida, Yucatán, México.

^bCentro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi, Mérida, Yucatán, México.

^cInstituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco, México.

* Corresponding author

INTRODUCCIÓN

La transformación genética se ha convertido en una poderosa herramienta para la genómica funcional, ya que es la forma más confiable para evaluar la función y expresión de genes mediante la generación de mutantes con ganancia o pérdida de función (Curtis *et al.*, 2003). Tanto en la investigación básica sobre la biología de las plantas, como en las aplicaciones biotecnológicas, resulta útil el contar con herramientas para controlar la expresión de genes. En comparación los promotores constitutivos, los promotores inducibles ofrecen ventajas para una variedad de aplicaciones (Zuo y Chua, 2000; Gatz y Lenk, 1998; Gatz, 1997). Bajo el control de un sistema inducible, un transgen puede ser expresado en una etapa de desarrollo y durante un tiempo específico de interés. Esto permite la generación de plantas genéticamente modificadas que llevan genes cuya expresión constitutiva podría ser perjudicial o incluso letal (Zuo y Chua, 2000).

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

Por ello, en el presente trabajo se utilizó un sistema de expresión génica inducible por dexametasona, con la finalidad de controlar exógenamente la expresión de *CcSERK1* (sobreexpresión y represión) en una etapa del protocolo de ES donde exista una mayor posibilidad, en términos fisiológicos, de que todos los componentes de las cascadas de señalización se encuentren presentes. Lo anterior permitió generar información para determinar si el gen *CcSERK1* es fundamental para el establecimiento o desarrollo de la ES.

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 Material biológico

Se emplearon plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *C. canephora*. El proceso de inducción de la ES se realizó de acuerdo con lo reportado por Quiroz-Figueroa *et al.*, (2006).

3.2.2 Metodología

3.2.2.1 Evaluación del efecto de la Dexametasona durante el proceso de ES

Se evaluó el efecto de la Dexametasona (DEX; Sigma-Aldrich), durante la ES de *C. canephora*. La solución madre de DEX fue preparada en DMSO, a una concentración de 100 mM. Se evaluó mediante los siguientes tratamientos.

Tabla 1. Tratamientos para la evaluación del efecto de la dexametasona.

TRATAMIENTOS		
BA (μM)	DEX (μM)	DMSO
5	0	-
5	0	+
5	0.3	+
5	30*	+
5	50	+

*La concentración de 30 μM ha sido reportada como óptima para activar el sistema inducible (Sanchez y Chua, 2001).

3.2.2.2 Extracción de RNA total de explantes foliares de *C. canephora L*

La extracción del RNA total fue a partir de 100 mg tejido y se utilizó el reactivo TRIzol (Invitrogen), como se describe en el anexo I.I.

3.2.2.3 Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó por método CTAB (Doyle y Doyle, 1990), con pequeñas modificaciones, el protocolo se describe en el Anexo I.II.

3.2.2.4 Generación de las construcciones génicas de *CcSERK1*

El cDNA completo y el fragmento en orientación en antisentido de *CcSERK1* se subclonaron en el vector de expresión pTA211 (Aoyama y Chua, 1997), mediante la amplificación por PCR con cebadores específicos con sitio de corte; para el primero se utilizó la enzima de restricción XhoI y para la segunda construcción se utilizó la combinación ApaI/XhoI (ver secuencias en anexo I. VII). El vector binario pTA211 contiene un promotor inducible por DEX, lo cual permite regular de forma controlada la expresión del transgen. El promotor contiene el dominio completo de dos componentes de unión a glucocorticoides Gal4-VP16 (GVG; Aoyama y Chua, 1997) bajo el promotor G10-90 (Ishige *et al.*, 1999) y el terminador de la subunidad pequeña de la Ribulosa 1,5-bifosfato Carboxilasa-Oxigenasa rbc-E9 de *Pisum sativum*. Como un sitio de unión para GVG, un fragmento de DNA que contiene seis copias de GAL4 UAS, corriente abajo un sitio múltiple de clonado (MCS) y la secuencia terminadora de rbcS-3A.

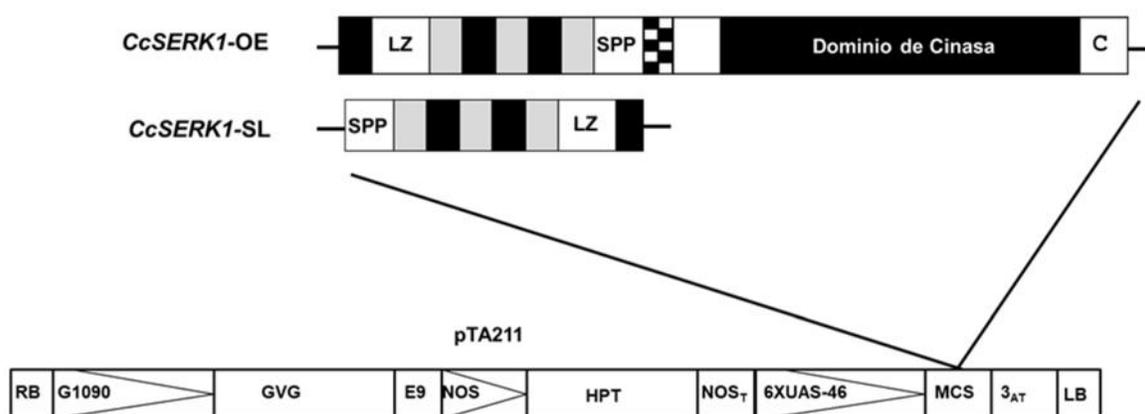


Figura 3.1 Representación esquemática de las construcciones genéticas de *CcSERK1* en el vector pTA211. *CcSERK1-OE* representa el cDNA de longitud completa de *SERK1*, *CcSERK1-SL* representa un fragmento de 696 pb de *CcSERK* en orientación antisentido. La estructura que compone la construcción genética se describe en el texto.

3.2.2.5 Transformación de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

La transformación de la cepa de *A. tumefaciens* con las construcciones testigo y con *CcSERK1-OE* y *CcSERK1-SL* se realizó por el método de congelación-descongelación (Jyothishwaran, *et al.*, 2007). El método consiste en adicionar 1 µg del plásmido de interés a 100 µL de células competentes e incubar en hielo por 20 min; introducir en N₂ líquido por 5 min y descongelar a 37 °C; adicionar 900 µL de medio YEB (extracto de carne 5 g·L⁻¹, extracto de levadura 1 g·L⁻¹, peptona 5 g·L⁻¹, sulfato de magnesio 2mM, pH 7.2). Incubar a 28 °C y en agitación orbital a 200 rpm por tres horas. Plaquear una alícuota de este cultivo en medio YEB sólido con los antibióticos adecuados e incubar en oscuridad a 28 °C durante 2 días. Para verificar los transformantes se realizó selección con antibiótico y por PCR empleando una asada de las colonias como fuente de DNA.

3.2.2.6 Transformación genética de tejido de hoja de *C. canephora* L

La transformación genética de los explantes de café fue realizada mediante *A. tumefaciens* por el método de infiltración al vacío. Los explantes de hojas pre-acondicionadas fueron transferidos al cultivo conteniendo la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* transformada con las construcciones génicas y sometidos a infiltración al vacío (400 mm de Hg) durante 15 min. Los explantes agroinfiltrados fueron co-cultivados en medio MS sólido sin antibióticos, en oscuridad a 28 °C durante 48 h. Posteriormente, las bacterias fueron eliminadas del explante mediante lavados con cefotaxima/timentina, los lavados se realizaron cada 12 horas (3-4 lavados). Después del último lavado, los explantes transformados fueron colocados en medio de inducción de ES (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

3.2.2.7 Análisis molecular de la expresión del transgen

El análisis de la inserción del transgen en el genoma de café se realizó mediante PCR con cebadores específicos para *CcSERK1* y para el gen que codifica a la enzima higromicina fosfotransferasa (*HPTII*; ver las secuencias en Anexo VII), a partir de DNA genómico aislado de los tejidos transformados.

La verificación de la expresión del transgen se realizó mediante ensayo de RT-PCR, a partir de RNA total aislado de tejidos testigo y transformado. Para ambos casos se analizó la presencia del gen *VirE2* de *A. tumefaciens*, para descartar contaminación por dichas bacterias. Los fragmentos amplificados fueron fraccionados por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñidos con 1 µg. mL⁻¹ de bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV.

3.2.2.8 Análisis de la cinética de activación y de represión del gen *CcSERK1*

La cinética de activación y represión del gen *CcSERK1* inducida por Dex en tejido transformados se siguió mediante ensayos de RT-PCR punto final utilizando “SuperScrip One-Step RT-PCR” (Invitrogen), a partir de RNA total aislado de tejido no y transformado, utilizando el Trizol[®] y los cebadores específicos de *CcSERK1* y *-Actina* (Anexo I.VII). Las reacciones fueron optimizadas para realizar 27 ciclos en el termociclador.

3.3. RESULTADOS

3.3.1 Efecto de la Dexametasona en la ES de *C. canephora* L

La evaluación del efecto de la adición de la dexametasona durante la ES se realizó con la finalidad de descartar cualquier efecto intrínseco de este compuesto sobre la formación de los embriones somáticos. Para realizar esta actividad, primero se identificó la etapa del proceso embrionario, en la cual se realizaría la adición de la hormona al medio de inducción con la finalidad de encontrar un punto donde *SERK1* se exprese normalmente y asegurar que en ese espacio de tiempo existan en la célula los componentes extra e intracelulares participantes de la vía de transducción de señales, ofreciendo la mayor probabilidad de medir la expresión de gen(es) modulados naturalmente tras la activación de la cinasa *SERK1*. Para ello, se tomaron en cuenta tres aspectos muy importantes (1) el entorno fisiológico, (2) la ontogenia del proceso y (3) los patrones de expresión del gen *CcSERK1*, analizados en el capítulo II.

Con base a lo anterior, se descartó adicionar DEX en las primeras horas de ES o a en tiempos muy tardíos, es decir, cuando ya hay formación de estructuras embriogénicas. La expresión de *CcSERK1* debe estar estrechamente relacionada con la capacidad de las células de los explantes para expresar su naturaleza totipotencial, capacidad que se debe establecer antes de la formación de las estructuras embriogénicas. En ese sentido, la etapa entre los siete y 10 DIC con un pico alto de expresión de *CcSERK1* parece ser crucial y durante el cual, las células pudieran estar siendo reprogramadas para expresar el potencial embriogénico: Es pues de esperarse que todos los componentes celulares asociados con la función de *SERK1* se encuentren activos en este punto del proceso. De esta manera, se determinó que el día siete, resultó el momento conveniente para llevar a cabo la evaluación del efecto de DEX y, por ende, la inducción exógena de *CcSERK1*.

Se realizaron dos ensayos por separado adicionando DEX a los siete días de haber iniciado el proceso de inducción de ES. La primera evaluación consistió en la adición de DEX, dejándose en el medio de cultivo durante todo el curso temporal y la segunda consistió en la adición de DEX por un periodo de tiempo de 24 h y después fue retirada del medio de cultivo (Aoyama y Chua, 1997; Sanchez y Chua, 2001; Sanchez *et al.*, 2004).

Para el primer ensayo se muestra el efecto de el estímulo mantenido de DEX en los explantes foliares de café en la Figura 3.2. Como puede observarse, hasta el día 30 no se detectó algún efecto para las tres concentraciones evaluadas y en todos los explantes se observó la formación de masa proembriogénica. Pero para el día 50 si se observó un efecto inhibitorio en el proceso embriogénico por la adición de DEX. Para la concentración mas baja de DEX (0.3 μM) se observó una disminución en la formación de embriones somáticos y un desarrollo tardío de los embriones. Con las concentraciones de 30 y 50 μM , el efecto fue perjudicial, los explantes mostraron síntomas de necrosis y no alcanzaron la ES. Este resultado indica que mantener DEX por un tiempo prolongado en el medio de ES causa un efecto deletéreo en la formación de embriones somáticos.

El resultado de la adición de DEX por pulsos de 24 h (efecto dosis-tiempo de DEX sobre la respuesta embriogénica) se muestra en la Figura 3.3. Durante el curso temporal no se observó ningún efecto visible sobre la formación y el desarrollo embrionario, la cuantificación de embriones somáticos formados por explantes de cada tratamiento corroboró que la aplicación de DEX por pulsos de 24 h no afecta de manera significativa el proceso de ES (Figura 3.3A-B).

Con base en los datos anteriores, se encontró que la activación del sistema inducible pTA211::*CcSERK1* en explantes transgénicos se debe realizar adicionando DEX a los seis días por pulsos de 24 h, ya que esto no modifica la respuesta del control embriogénico.

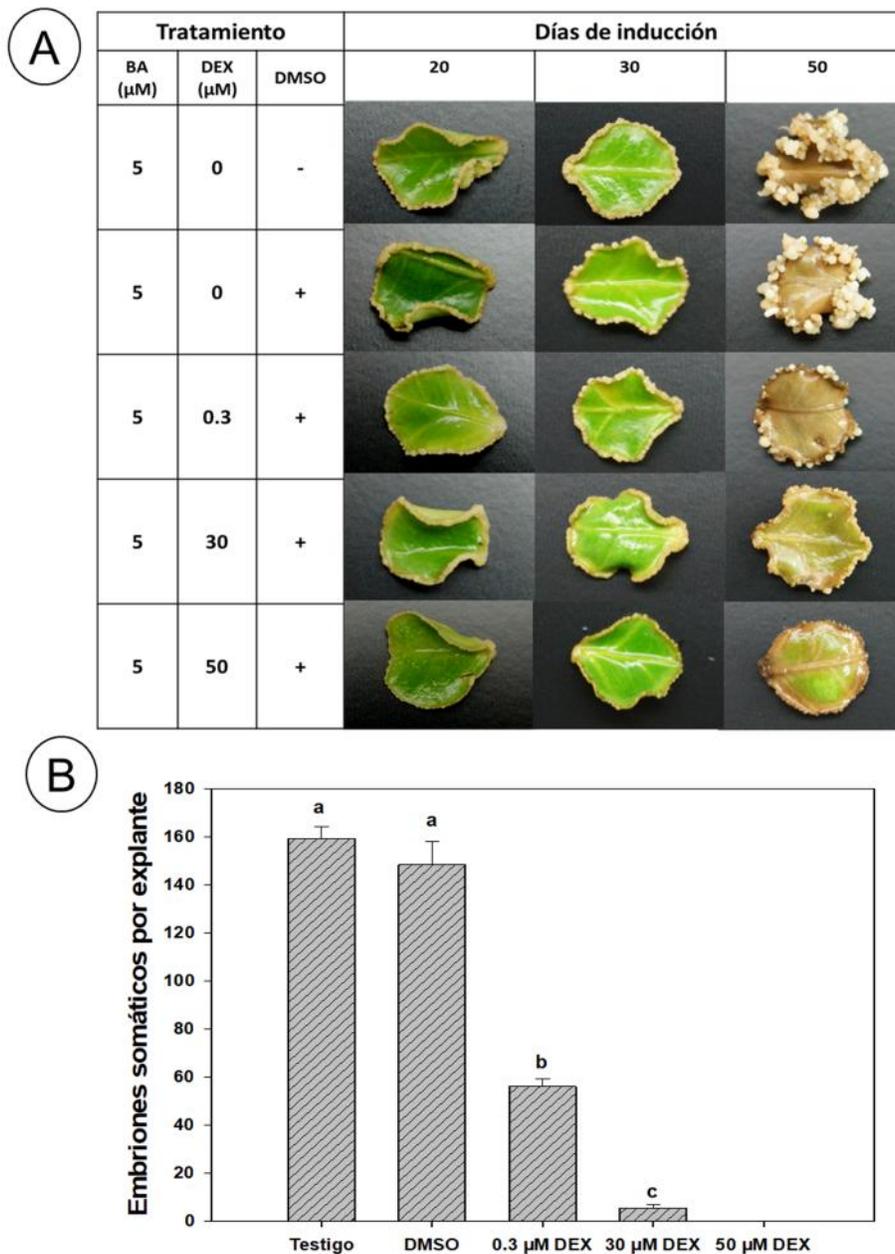


Figura 3.2 Efecto de la adición de Dexametasona en la embriogénesis somática de *C. canephora* L. A) Curso temporal de explantes foliares de *C. canephora* sometidos a inducción de ES con y sin la presencia de DEX. B) Cuantificación de la respuesta embriogénica por explantes. Las concentraciones fueron 0.3, 30 y 50 μM dejándose en el medio de cultivo durante todo el curso temporal. La adición de DEX se realizó a los seis días. Los tratamientos sin DEX y DMSO son los testigos. Las barras sobre las columnas representan el error estándar (n=3). Las letras en las barras indican la diferencia significativa de acuerdo con la prueba Tukey al 95% de confianza.

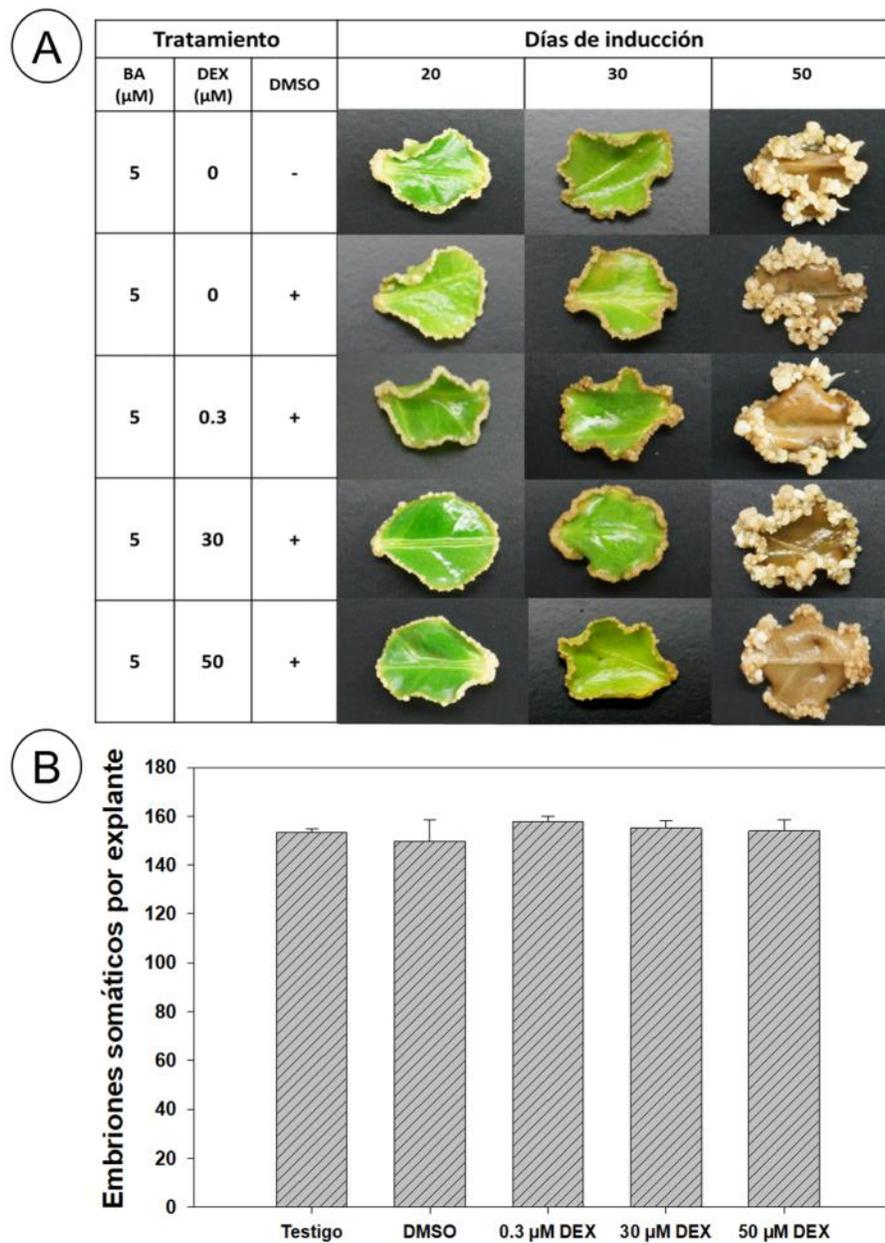


Figura 3.3 Efecto de la adición de Dexametasona en un pulso de 24 horas sobre la embriogénesis somática de *C. canephora* L. A) Curso temporal de explantes foliares de *C. canephora* sometidos a inducción de ES con y sin la presencia de DEX. B) Cuantificación de la respuesta embriogénica por explantes. Las concentraciones fueron 0.3, 30 y 50 μM , a las 24 h el inductor fue retirado del medio y los explantes fueron colocados en medio fresco. La adición de DEX se realizó a los seis días. Los tratamientos sin DEX y DMSO son los testigos. Las barras sobre las columnas representan el error estándar ($n=3$).

3.3.2 Generación de las construcciones génicas de *CcSERK1*

Se realizó la generación de dos construcciones génicas de *CcSERK1*, una para regular su sobreexpresión (*CcSERK1*-OE) y la segunda para su silenciamiento génico (*CcSERK1*-SL), se realizó mediante la subclonación del cDNA al vector binario pTA211, verificando la identidad del plásmido receptor, el cual fue donado por el Dr. Nam-Hai Chua (Universidad Rockefeller). En la Figura del Anexo IV se puede visualizar el mapa del plásmido pTA211. Para asegurar la identidad del plásmido pTA211 purificado mediante lisis alcalina, se realizó un análisis de patrones de restricción utilizando sitios localizados en la secuencia del plásmido. En la Figura del Anexo IV, carriles 2 y 3, se muestra los plásmidos digeridos con las enzimas XhoI y BstEII, respectivamente; el tamaño corresponde al esperado de 11,159 pb, mientras que la doble digestión con las dos enzimas XhoI/BstEII produjo dos bandas, una banda superior con un tamaño de 9,680 pb y una banda inferior de 1,479 pb (carriles 4-8). Estos patrones de restricción son concordantes con la identidad e integridad del plásmido pTA211.

Para la subclonación del cDNA completo de *SERK1* (de 2,511 pb) y del fragmento de 696 pb en orientación antisentido, se procedió a amplificar por PCR los segmentos de interés que se encontraban clonados en el vector pGEM-T Easy (*CcSERK1*) empleando cebadores específicos conteniendo sitios de corte para la enzima XhoI/XhoI y para XhoI/ApaI, respectivamente. Una vez amplificado el segmento por PCR, tanto el producto obtenido como el vector pTA211 se digirieron con las enzimas XhoI y ApaI.

Después que se fraccionaron por electroforesis en gel de agarosa, los fragmentos se purificaron y el inserto se ligó al vector mediante el uso de la T4 DNA Ligase (Promega), utilizando una relación vector:inserto 1:4. En la Figura 3.4 B se puede observar que el tamaño liberado con la enzima XhoI a partir del DNA plasmídico de clonas recombinantes corresponde al fragmento clonado de *CcSERK1* de 2,511 pb.

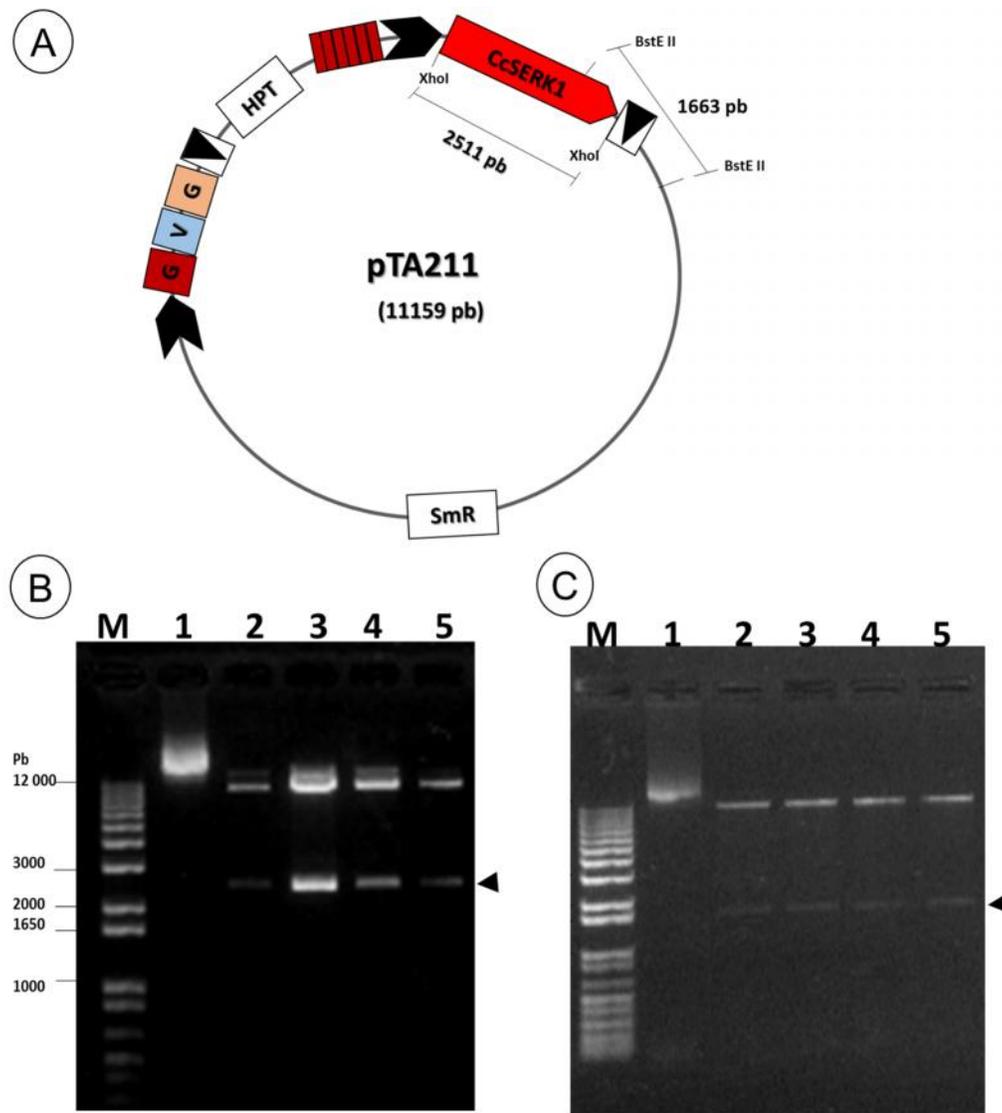


Figura 3.4 Verificación por restricción la inserción y la orientación del cDNA del gen *CcSERK1* en el vector pTA211. Una alícuota de los productos obtenidos de la digestión de XhoI y BstEII fue separada por electroforesis en un gel nativo de agarosa y teñidas con $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) Esquema de la verificación de la inserción y orientación del inserto *CcSERK1* en pTA211; con la digestión enzimática de BstEII se observaron dos bandas esperadas que son de 1663 pb y 12007 pb. B) Productos de las reacciones enzimáticas con la enzima XhoI. C) Verificación de la orientación del inserto *CcSERK1* en pTA211 mediante la digestión enzimática de BstEII, los tamaños esperados son de 1,663 pb y 12,007 pb. Carril 1: plásmido pTA211-*CcSERK1* sin digerir. Carriles 2-5: plásmidos pTA211-*CcSERK1* digerido con las enzimas correspondientes. M: Escalera de DNA de 1 kb.

CAPÍTULO II

Debido a que la subclonación hacia el vector pTA211 de *CcSERK1* de longitud completa se realizó mediante la digestión con una sola enzima de restricción (*Xho*I), el fragmento liberado del plásmido donador se pudo haber insertado en el vector receptor en dirección sentido o en antisentido. Por tal motivo, se procedió a la verificación de la orientación del inserto clonado en el plásmido pTA211. La determinación de la orientación con la que el amplicón *CcSERK1* se insertó en el vector receptor se realizó analizando los mapas de digestión de plásmidos aislados de diferentes colonias recombinantes. La construcción en el sentido correcto debe generar un mapa de restricción con la enzima *Bst*EII con dos fragmentos de 1,663 y de 12,007 pb, la corroboración mediante la restricción indicó que cuatro clonas presentaban el inserto en sentido, tal como se muestra en la figura 3.4C.

De igual forma, se analizó la clonación del fragmento de *CcSERK1* de 696 pb en orientación antisentido. En la Figura 3.5B se muestra el patrón de restricción obtenido mediante una doble digestión utilizando las enzimas *Xho*I/*Ap*I a partir de DNA plásmidico aislado de posibles clonas positivas, la liberación del inserto del tamaño esperado corroboró la subclonación en el vector pTA211 (Figura 3.5C).

Con estas construcciones se procedió a la transformación de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens*, mediante el método de congelación-descongelación. La corroboración de la transformación de la cepa LBA4404 de *A. tumefaciens* con los correspondientes plásmidos de interés se realizó mediante la amplificación por PCR con cebadores específicos.

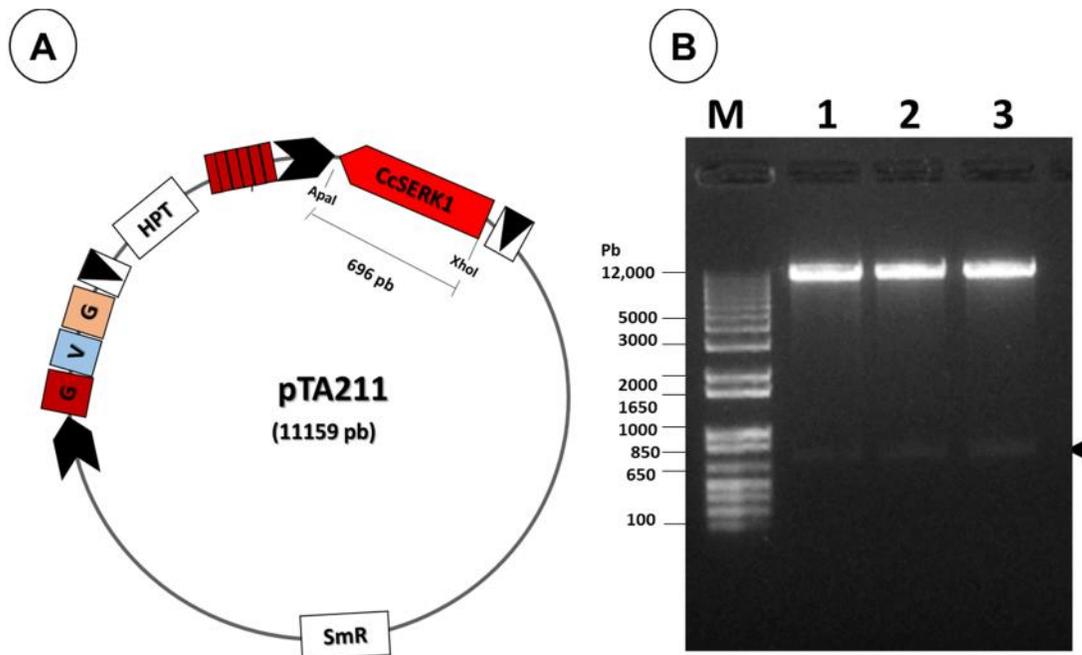


Figura 3.5 Verificación por restricción la inserción del fragmento de *CcSERK1* en orientación antisentido en el vector pTA211. Alícuotas de los productos de digestión con la enzima *Apal* y *XhoI* fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa y teñidas con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) Esquema de la verificación de la inserción y orientación del inserto *CcSERK1* en pTA211. B) Corroboración de la inserción del fragmento de *CcSERK1* de 696 pb mediante la digestión del DNA plasmídico. Carriles 1-3: Plásmidos *CcSERK1*-SL digeridos con las enzimas *Apal* y *XhoI*. M: Escalera de DNA de 1 kb.

En la figura del Anexo V A, B y C se pueden observar los diferentes productos obtenidos, *CcSERK1*-OE de 2,511 pb (Anexo VA), 696 pb para *CcSERK1*-SL (Anexo VB) y 670 pb para transformación con el vector pTA211 vacío (Figura del Anexo VC) para el cual se utilizó cebadores específicos de higromicina (*HPTII*).

3.3.3 Análisis de la cinética de activación y de represión del gen *CcSERK1*

Con las construcciones génicas *CcSERK1*-OE, *CcSERK1*-SL y pTA211 vacío se realizó la transformación genética de los explantes embriogénicos de *C. canephora*. Se verificó la inserción del T-DNA en el genoma de los explantes transformados, mediante la amplificación por PCR a partir de DNA genómico. En la figura 3.6 se puede observar la generación de un amplicón de 670 pb, correspondiente a un fragmento del gen *HPTII*, para las tres construcciones (carriles 5, 6 y 7). La ausencia de la detección del gen *VirE2* descartó la presencia de contaminación por *A. tumefaciens* en los tejidos evaluados como se muestra en la figura 3.6 (panel inferior). Con este análisis realizado en explantes transformados, seis días después de la inducción embriogénica, se corroboró que la transformación de los explantes de *C. canephora* fue exitosa.

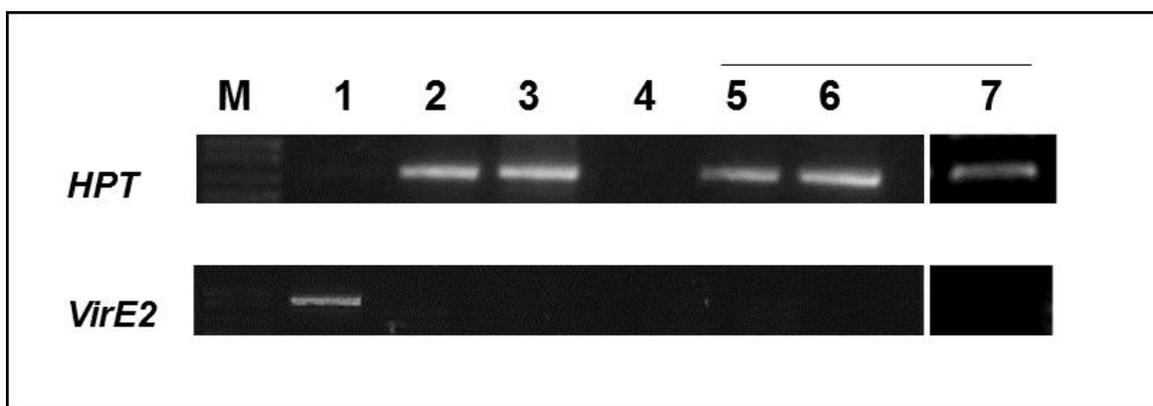


Figura 3.6 Análisis molecular de tejido transformado. Amplificación por PCR en tejidos testigo y transformados. Los productos de PCR obtenidos con cebadores específicos de los genes de higromicina (*HPTII*) y *VirE2*, fueron fraccionados por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril 1: PCR a partir de DNA genómico extraído de *A. tumefaciens*, Carril 2: PCR a partir de DNA plásmidico de pTA211; Carril 3: DNA plásmidico de *CcSERK1*-OE; Carril 4: PCR a partir de DNA genómico extraído de tejido sin transformar; Carril 5: DNA genómico extraído de tejido transformado con pTA211; Carril 6: PCR a partir de DNA genómico extraído de tejido transformado con *CcSERK1*-OE; Carril 7: PCR a partir de DNA genómico extraído de tejido transformado con *CcSERK1*-SL. En la parte superior de la figura se muestra la detección por PCR de *VIRE2* en las diferentes muestras analizadas.

Para determinar si el sistema inducible es activado exógenamente en los tejidos transformados, se midió la cinética de inducción del transcrito de *CcSERK1* después de la adición de DEX (30 μ M), mediante RT-PCR punto final con 27 ciclos, utilizando 500 ng de cada muestra de RNA total extraído de tejidos testigo y tejidos transformados (Figura 3.7 A, B, C).

Los resultados indican que el cDNA de *CcSERK1* es inducido significativamente en los tejidos transformados (*CcSERK1*-OE) en presencia del inductor (DEX) (panel B). La acumulación de transcritos inicia a partir de las seis h de inducción, teniendo un máximo a las 24 h (panel B, carriles 1 a 4). El análisis de la supresión de *SERK1* inducida por DEX mostró que a partir de las 12 h la expresión disminuye y a las 24 h ya no es detectable (panel C, carriles 1 a 4). Para el caso de tejido testigo transformado con el vector pTA211 vacío, la expresión de *CcSERK1* se mantiene en niveles basales en las primeras 6 horas y luego ya no es detectada (panel A, carriles 1 a 4).

Los resultados descritos en el párrafo anterior, nos indican que el gen endógeno de *SERK1* no es inducido por DEX y, además, indican que el sistema de inducción exógena de *CcSERK1* en los tejidos transformados de *C. canephora* si funciona, es decir, se validó el establecimiento del modelo de trabajo y nos permitió proseguir con el protocolo experimental.

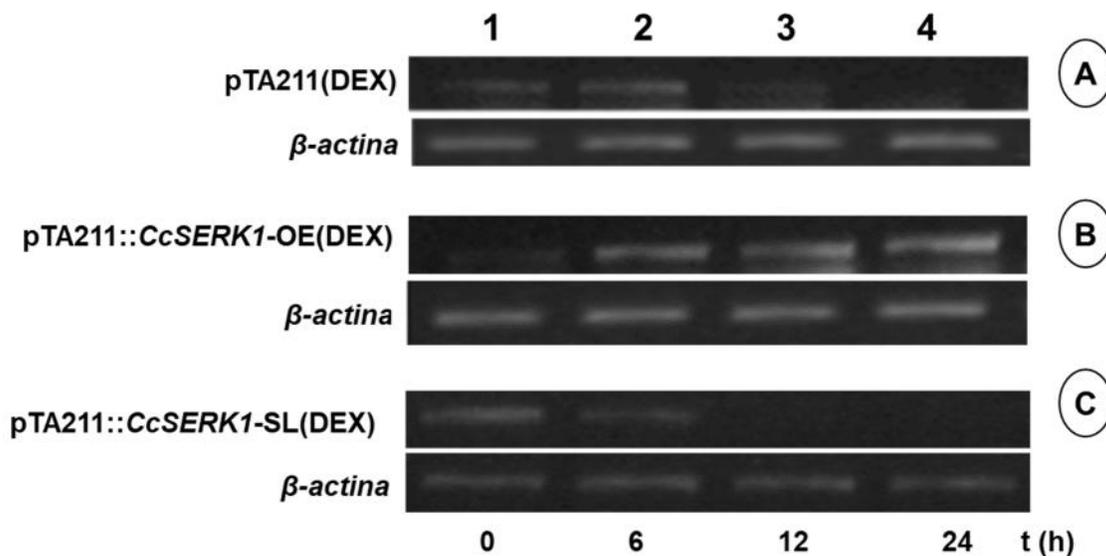


Figura 3.7 Análisis de la cinética de inducción y represión exógena del transcrito de *CcSERK1*. Amplificación por RT-PCR con cebadores específicos del gen *CcSERK1* en tejido transformado en presencia del inductor DEX. Los productos obtenidos fueron fraccionados por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) RT-PCR de muestras de tejido transformado con el vector vacío pTA211. B) RT-PCR de muestras de tejido transformado con *CcSERK1*-OE. C) RT-PCR de muestras de tejido transformado con *CcSERK1*-SL. Carril 1: 0 h, Carril 2: 6 h, carril 3: 12 h, carril de los explantes transformados con las construcciones de *CcSERK1* de forma inducible, los cambios 4: 24 h. Para el análisis se usó β -actina como gen de referencia.

3.3.4 Análisis del fenotipo causado por la manipulación exógena de *CcSERK1*

Se evaluó el fenotipo se evaluaron a los 50 días de cultivo. Para el caso de la sobreexpresión, se encontró que *CcSERK1* incrementó la respuesta embriogénica, con un aumento de casi el doble en el número de embriones formados por explantes.

Además del incremento en el número de embriones, el hallazgo más importante fue la formación de embriones somáticos en la parte intermedia del explante foliar, lugar donde se encuentra localizado la vena central de la lámina foliar. La formación de embriones en esa zona ocurrió durante la inducción exógena de *CcSERK1* sin que se le realizara una herida o daño mecánico (ver Figura 3.8A, panel c), como normalmente ocurre. Este fenotipo no se presenta en los explantes silvestres o transformados con el vector vacío. El fenotipo observado es muy similar al obtenido utilizando una construcción constitutiva 35S::*CcSERK1*-OE, como se muestra en la Figura 3.9A panel c.

La proliferación en la vena media del explante solo se observó bajo la sobreexpresión de *CcSERK1* en el explante; esto fue confirmado mediante el análisis de RT-PCR y qRT-PCR, donde los explantes mostraron una alta expresión de *CcSERK1* de tres veces más (Figura 3.9B, panel c y Figura 4.3). En la vena media del explante se encuentra el tejido vascular y para muchas especies de plantas incluyendo *C. canephora* (Figura 3.9B, panel b), *SERK1* presenta una alta expresión; por otra parte, está documentado que el origen de las células competentes está en tejido vascular (Guzzo *et al.*, 1994), o se originan cerca de los haces vasculares de explantes de hoja (Somleva *et al.*, 2003).

Dado que no hubo una herida para la respuesta embriogénica, es razonable suponer que la sobre-expresión de *CcSERK1* puede hacer innecesario el requisito de la herida para la formación de embriones somáticos en la vena central.

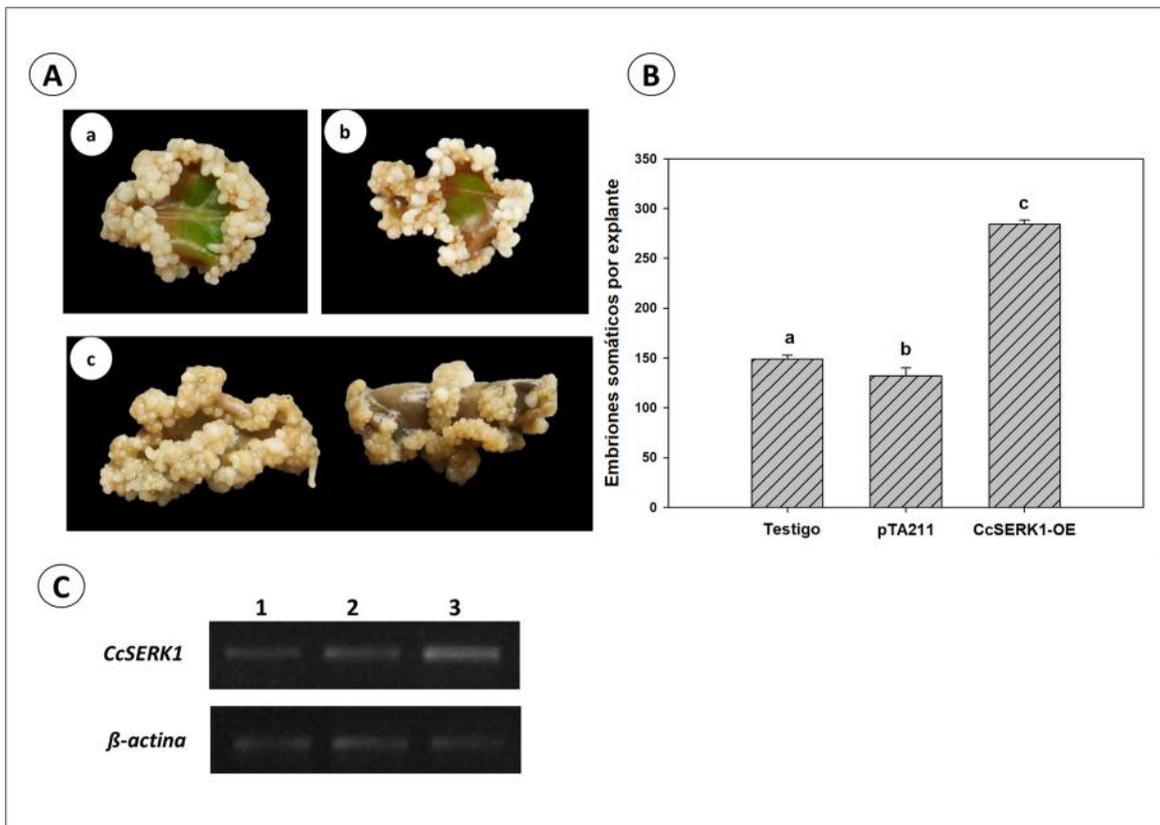


Figura 3.8 Efecto de la sobreexpresión exógena del gen *CcSERK1* en el desarrollo de la embriogénesis somática de *Coffea canephora* L. A) Respuesta embriogénica de la sobreexpresión inducible de *CcSERK1* en los explantes transgénicos de *C. canephora*, (a) Explantes no transformados “testigo”; (b) Explantes transformados con el vector vacío pTA211; (c) Explantes transformados con *CcSERK1*-OE a los 50 DIC, B) Cuantificación de la respuesta embriogénica por explantes inducida por la sobreexpresión de *SERK1*, C). Análisis de expresión de *CcSERK1* por RT-PCR utilizando RNA total, provenientes de tejido silvestre (carril 1), transformado con el vector vacío (carril 2) y transformado con *CcSERK1*-OE (Carril 3) a los 50 DIC. Las barras sobre las columnas representan el error estándar (n=3). Las diferentes letras en las barras indican la diferencia significativa de acuerdo con la prueba Tukey, al 95% de confianza.

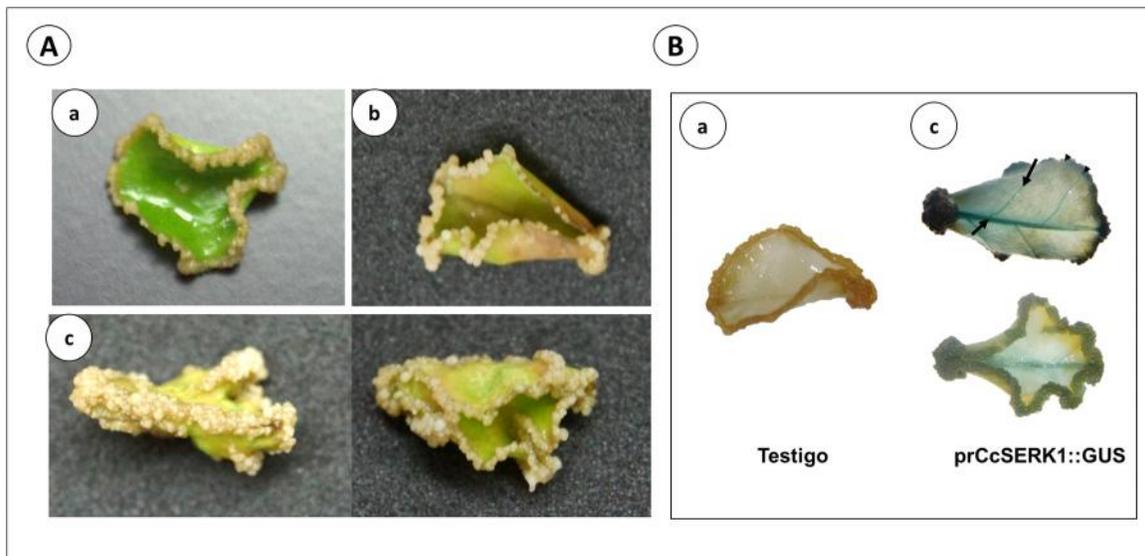


Figura 3.9 Análisis de la sobreexpresión del gen *CcSERK1* en tejido embriogénico de *Coffea canephora* L. A) Respuesta embriogénica de la sobreexpresión constitutiva de *CcSERK1* en los explantes transgénicos de *C. canephora*, (a) Explantes no transformados “testigo”; (b) Explantes transformados con el vector vacío pCAMex (35S); (c) Explantes transformados con 35S::*CcSERK1*-OE a los 35 DIC, B) Análisis de expresión del gen *CcSERK1* a los 35 DIC, (a) explante testigo, (b) explante transformado con pCcSERK1::GUS. Las flechas señalan la expresión de GUS dirigida por el promotor de SERK1 en las venas primarias y secundarias del explante (La imagen B, fue tomada con la autorización de Jimenez-Guillen, 2018).

Por otra parte, el silenciamiento de *SERK1* provocó una reducción casi total en la respuesta embriogénica en los explantes transformados (Figura 3.10). Es interesante observar que las pocas estructuras que se logran formar a partir de estos tejidos se convierten en radícula después de 60 días. Es probable que el silenciamiento de *CcSERK1* cause una desregulación del programa embriogénico hacia una vía que involucre la formación de la radícula. Estos resultados indican que la expresión del gen *CcSERK1* está directamente vinculada al proceso de ES en *C. canephora* y que la señalización mediada por *CcSERK1* es indispensable para expresar el potencial embriogénico en los explantes.

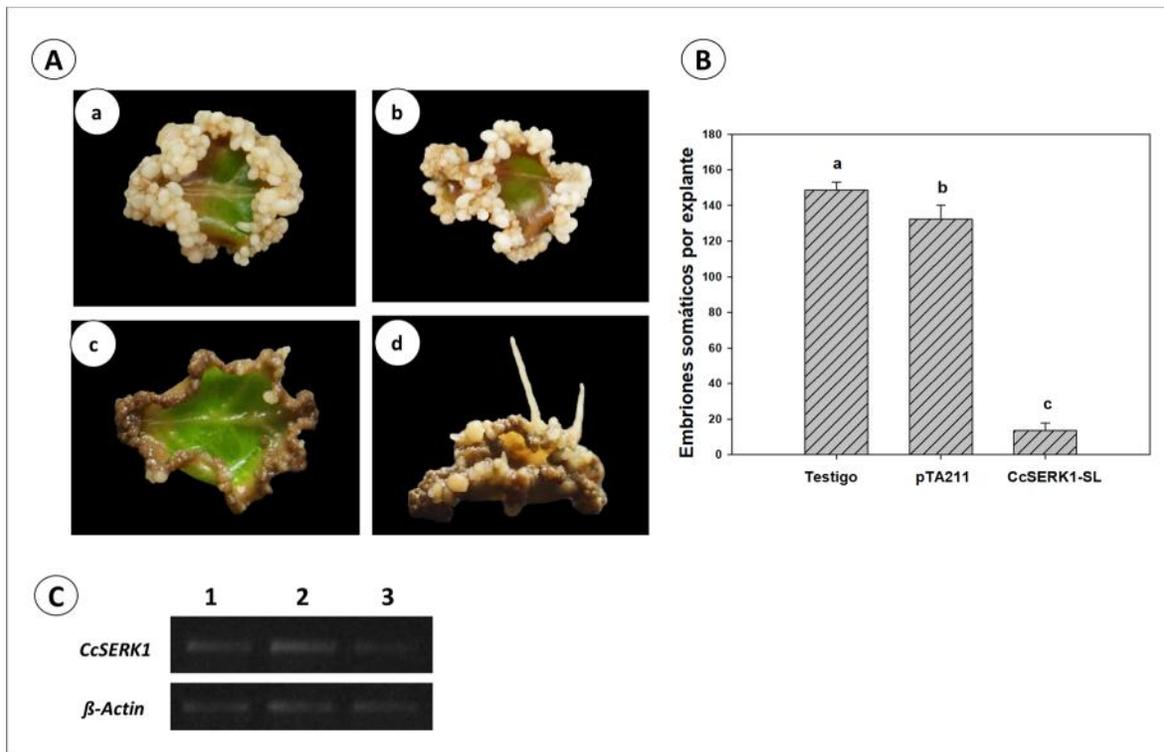


Figura 3.10 Efecto del silenciamiento exógeno del gen *CcSERK1* en el desarrollo de la embriogénesis somática de *Coffea canephora* L. A) Respuesta embriogénica de la supresión inducible de *CcSERK1* en los explantes transgenicos de *C. canephora*. (a) Explantes no transformados “testigo”; (b) Explantes transformados con el vector vacío pTA211; (c) Explantes transformados con *CcSERK1-SL* a los 50 DIC, B) Cuantificación de la respuesta embriogénica por explantes inducida por la supresión de SERK1, C). Análisis de expresión de *SERK1* por RT-PCR utilizando RNA total, proveniente de tejido silvestre (carril 1), transformado con el vector vacío (carril 2) y transformado con *CcSERK1-SL* (Carril 3) a los 50 DIC. Las barras sobre las columnas representan el error estándar (n=3). Las diferentes letras en las barras indican la diferencia significativa de acuerdo con la prueba Tukey, al 95% de confianza.

3.4 DISCUSIÓN

Dado que la activación exógena del promotor inducible por glucocorticoides, que se empleó para regular la expresión de *SERK1*, es mediante la adición de DEX, fue importante evaluar si este inductor tiene algún efecto negativo en el proceso de ES. Para tal análisis, se determinó que a los siete DIC fue el momento adecuado para aplicar DEX e inducir la activación exógena de *CcSERK1*. Con lo anterior se buscó establecer un modelo en donde se incremente o se inhiba la transcripción de *SERK1* en una etapa del proceso en donde normalmente este se exprese.

El primer ensayo del análisis del efecto de la adición de la dexametasona sobre la ES tuvo un efecto negativo en la respuesta embriogénica y fue dependiente de la concentración, el efecto fue visible en los explantes después de los 30 DIC. La concentración mas baja mostró un reducción muy marcada en la respuesta embriogénica; sin embargo, si hubo la formación de embriones somáticos. Con las concentraciones de 30 μM y 50 μM no hubo respuesta embriogénica y a pesar de que se si forma la masa proembriogénica, la rediferenciación de estructuras embriogénicas no se lleva acabo. Los explantes cambian de un color de verde a un color café-oscuro y se necrosan hacia los 50 DIC. Hasta el momento no existe evidencias que expliquen el efecto negativo o la posible vía afectada por DEX en plantas.

Analizando el segundo ensayo el cual consistió en añadir DEX en el medio de cultivo y retirarlo después de 24 h. El resultado mostró dicho tratamiento no afecta la formación de embriones somáticos, el desarrollo es normal, no hay cambios visibles en la morfología y estos se convirtieron a plántulas sin que se observara alguna alteración en su desarrollo. Por lo tanto, la activación exógena de *CcSERK1* se realizó mediante la adición de DEX por un pulso de 24 h aplicado a los siete DIC.

Por otra parte, con las contrucciones génicas de *CcSERK1* utilizando el vector inducible

pTA211, se transformó tejido de *C. canephora* mediante *A. tumefaciens*, confirmando la transformación mediante PCR, también se verificó la activación y la represión exógena del transcrito de *CcSERK1*. Para el primer caso, el resultado indicó que a partir de las seis h ya había activación; sin embargo, el mayor aumento se mostró entre las 12 y las 24 h, para el segundo caso, la represión se presentó para las 12 y 24 h. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Guo *et al.* (2014), Sanchez *et al.* (2004) y Sanchez y Chua (2001) utilizando 24 h para su análisis.

El análisis del fenotipo de la sobreexpresión dio como resultado un incremento en la respuesta embriogénica, se observó que había formación de embriones somáticos en la vena principal del explante. Este fenotipo solo se presentó en explantes que sobreexpresaron a *CcSERK1*; por lo tanto, es probable que su inducción exógena mediada por DEX hubiera contribuido a la manifestación del potencial embriogénico en esa zona. Lo anterior pudiera explicar que no haya formación de embriones en venas secundarias o terciarias en ausencia de herida. Hay que mencionar que en la vena media se encuentra tejido vascular y se ha reportado que *SERK1* se expresa en las células pluripotentes del procambium vascular (Savona *et al.*, 2012; Nolan *et al.*, 2009; Hecht *et al.*, 2001). Sin embargo, no conocemos la ontogenia de los embriones somáticos en la vena media por lo que sería interesante realizar tal análisis en estudios posteriores. Por otro lado, el silenciamiento de *CcSERK1* provocó una disminución casi total en la formación de embriones somáticos. De manera interesante, los pocos embriones formados no se desarrollan y en su lugar se convierten a radícula. Este resultado indica que la presencia de *CcSERK1* en las células de los explantes de *C. canephora* resultó importante para regular la entrada a ES y el desarrollo embrionario.

CAPÍTULO IV**EFFECTO DE LA REGULACIÓN EXÓGENA DE LA EXPRESIÓN DE *CcSERK1*, EN LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES HOMEÓTICOS Y DEL METABOLISMO DE AUXINAS DURANTE LA ES DE *Coffea canephora* L.**

Parte del contenido de este capítulo se publicó en la revista *Physiologia Plantarum*:

Pérez-Pascual Daniel^a, Jiménez-Guillen Doribet^a, Villanueva-Alonzo Hernán^b, Souza-Perera Ramón^a, Godoy-Hernández Gregorio^a and Zúñiga-Aguilar José Juan^{c,*}(2018). Ectopic expression of the *Coffea canephora* SERK1 homologue induced differential transcription of genes involved in auxin metabolism and in the developmental control of embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 163:530-551, DOI: 10.1111/pp1.12709.

^aCentro de Investigación Científica de Yucatán, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Mérida, Yucatán, México.

^bCentro de Investigaciones Regionales, Dr. Hideyo Noguchi, Mérida, Yucatán, México.

^cInstituto Tecnológico Superior de los Ríos, Balancán, Tabasco, México.

* Corresponding author

4.1 INTRODUCCIÓN

Los RLKs juegan un papel importante en la percepción extracelular de ligandos y la activación de la vía corriente abajo, a través de la transfosforilación de los dominios intracelulares de cinasa de serina/treonina (Osakabe *et al.*, 2013). SERK1 pertenece a una pequeña familia de LRR-RLK del tipo II en *Arabidopsis*, su expresión está asociada con el establecimiento de la ES, al parecer su activación tiene un papel en el disparo del proceso de diferenciación celular. Estudios indican que SERK1 es un co-receptor el cual no une ligando, sin embargo, su asociación con receptores de unión a ligando como EMS1/EXS, BRI1, HAE/HSL2 es indispensable para regular la actividad transcripcional (Meng *et al.*, 2016; Gou *et al.*, 2012; Jia *et al.*, 2008). Se desconoce si este mecanismo es similar en el proceso de ES. La activación *in vivo* de muchos receptores con actividad de cinasa en plantas es muy similar al mecanismo de acción de muchos receptores tipo cinasa de tirosina de animales y que consiste en: (i) la unión del ligando ocasiona la homo o hetero-oligomerización del receptor, permitiendo la trans-fosforilación del dominio de cinasa intracelular; (ii) la transfosforilación en el dominio intracelular del receptor y activación de los sitios catalíticos; (iii) se permite al complejo receptor:coreceptor(es) fosforilar los sustratos endógenos corriente abajo en la vía de transducción de señales específica y (iv) lo anterior conduce en última instancia a las alteraciones en la expresión génica (Clouse, 2011).

En las células con competencia embriónica es de gran importancia identificar los componentes de la vía de señalización de SERK1 y los blancos corriente abajo, para determinar que genes están involucrados en esta vía. Una aproximación genética que permite estudiar mecanismos de regulación o la implicación fisiológica de un gen de interés, ha sido mediante la sobreexpresión o la supresión ya sea de forma constitutiva o inducible, el cual puede causar un fenotipo específico y/o permite el análisis de expresión génica diferencial utilizando un enfoque comparativo. Como ejemplo de lo anterior se puede mencionar la identificación de genes regulados por *BBM* (Passarinho *et al.*, 2008), por *LEC2* (Guo *et al.*, 2013), por *AGL15* (Zheng y Perry, 2014) y por *GNOM* (Gou *et al.*, 2014). La sobreexpresión inducible de SERK3/BAK1 (*XVE-BAK1*) dio como resultado la inducción de genes marcadores de defensa (Kiss-Papp, 2014).

En este trabajo se analizó la transcripción de genes vinculados con la ES, como respuesta

a la sobreexpresión o supresión del gen *CcSERK1*, con la finalidad de aportar información que contribuya a entender cómo *SERK1* regula o promueve la ES.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material biológico

Se utilizó material vegetal colectado y almacenado a -80 °C, de los tratamientos problema y testigo, generados como se describe en el Capítulo III.

4.2.2 Metodología

4.2.2.1 Selección de genes candidato reguladores de la ES

Para la selección de genes reguladores de la ES, cuyos niveles de expresión como respuesta a la sobreexpresión y represión del gen *CcSERK1* durante la ES, se revisó en la literatura genes relacionados con *SERK1* y genes reguladores identificados en la ES, en especies utilizadas como modelo. Después de seleccionar los genes, se realizó la búsqueda de las correspondientes secuencias de nucleótidos y de aminoácidos en la base de dato de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Como las secuencias, se realizó una comparación de secuencias tipo BLASTx en el genoma de *Coffea canephora* (<http://coffee-genome.org/>), con el objetivo de identificar la secuencia de los genes de interés.

4.2.2.2 Diseño de cebadores específicos

Los cebadores se diseñaron respetando los parámetros descritos para el uso del equipo de Rotor-Gene Q 5-Plex (Qiagen), utilizando la herramienta para el diseño de cebadores específicos para PCR en tiempo real “RealTime qPCR Assay Entry” de IDT Integrated DNA Technologies (www.idtdna.com/scitools/Applications/RealTimePCR/). Las secuencias de los cebadores específicos se muestran en la tabla A3 del Anexo I.VII.

4.2.2.3 Extracción y purificación de RNA total

La extracción y purificación del RNA total de las muestras seleccionadas se realizó con el sistema RNeasy Plant mini Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La integridad del RNA total fue verificada mediante el fraccionamiento de las muestras en una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% y la cuantificación de las muestras se realizó en el espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo scientific).

4.2.2.4 Análisis de expresión por qRT-PCR

La eliminación del DNA genómico y la síntesis del cDNA se realizó de acuerdo con el protocolo del sistema Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit, with dsDNase (Thermo Scientific), empleando las mismas condiciones descritas en el Capítulo II. Todas las reacciones se llevaron a cabo por triplicado en el termociclador Rotor-Gene Q 5-Plex (Qiagen) utilizando QuantiNova™ SYBR Green PCR kit (Qiagen). El gen *EF-1* se utilizó como control interno y los datos fueron analizados para cuantificar la expresión, de acuerdo con el método 2^{-CT} (Livak y Schmittgen, 2001).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Selección de genes candidatos

La selección de los genes reguladores de la ES se basó en varias estrategias, se revisaron los reportes de genes relacionados con el gen *SERK1* o con la ES en diferentes modelos. El primero en la lista fue *AGL15*, el cual se identificó como componente de un complejo de proteínas asociadas con *SERK1* (Karlova *et al.*, 2006). Otros reguladores que han sido clave, en la regulación positiva durante la iniciación de la ES han sido *LEC1* (Lotan *et al.*, 1998; Gaj *et al.*, 2005), *LEC2* (Stone *et al.*, 2001; 2008; Wójcikowska *et al.*, 2013), *BBM* (Srinivasan *et al.*, 2007), *WUS* (Laux *et al.*, 1996, Zuo *et al.*, 2002), *EMK* (Tsuwamoto *et al.*, 2010) y *ABI3* (Stone *et al.*, 2001).

Un análisis utilizando el programa STRING 10.0 (Figura 4.1), el cual permite predecir las asociaciones de interacción proteína-proteína, dio como resultado el gráfico que se muestra en la Figura 4.1. El programa predijo que *SERK1* puede interactuar con los productos de los genes *AGL15*, *BBM*, *LEC1*, *LEC2*, *WUS*, *PKL*. También, se analizaron los reportes de genes implicados en la ES de *Coffea*, en los que se encontró a los genes reguladores *LEC*, *BBM* y *WOX4* (Nic-Can *et al.*, 2013), a genes implicados en la biosíntesis de auxina *YUC1*, *YUC3*, *TAA1* (Ayil-Gutierrez *et al.*, 2013), a *WUS* (su sobreexpresión causa morfogénesis ectópica en *C. canephora*; Arroyo-Herrera *et al.*, 2008), y a *BBM* (el análisis de expresión de *SERK* y *BBM* en la ES indirecta de *C. arabica*; Torres *et al.*, 2015).

Teniendo en cuenta los datos anteriores, se buscaron las secuencias de cada uno de estos genes en el genoma de *C. canephora* para el diseño de cebadores específicos, encontrando las secuencias de *AGL15*, *BBM*, *WUS*, *EMK*, *PKL*, *ABI3*. Se identificó un fragmento de la secuencia de *LEC1* y no se pudo identificar un ortólogo de *LEC2*; sin embargo, se identificó una secuencia completa anotada como *L1L*, que se incluyó para el análisis.

Por otro lado, tomando en cuenta lo reportado en la ES de *C. canephora* y de *Arabidopsis*, se incluyeron también los genes *WOX4*, *TAA1*, *YUC1*, *YUC4*, *YUC10*, *TIR1* y los genes *PIN1*, *PIN4*, *PIN7*, que codifican transportadores de auxinas.

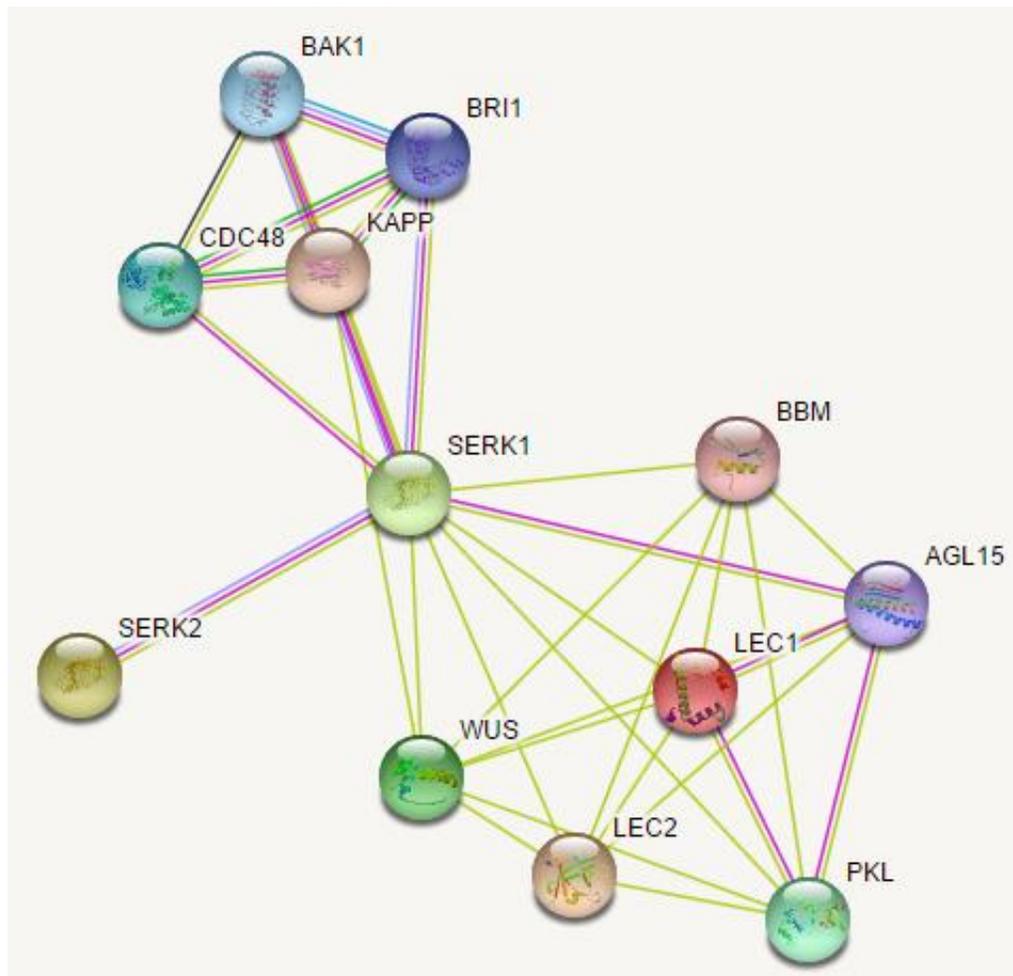


Figura 4.1 Diagrama de la predicción de asociaciones de SERK1 con otras proteínas. Las asociaciones incluyen interacciones tanto directas como indirectas mediante la representación gráfica. El color de las líneas indica como fue determinada la interacción: morada por experimentos, verde por neighborhood, verde-lima basada en la literatura científica, azul por co-ocurrencia, negra por experimento de coexpresión, rojo por fusión. Se utilizó el programa STRING 10.0, con datos obtenidos de *A. thaliana*.

4.3.2 Análisis de expresión de genes candidatos

Para el análisis de expresión de los genes seleccionados, se realizó la extracción del RNA total de tejido no transformado, de tejidos sometidos al proceso de ES en presencia o en ausencia de DEX por 24 h (figura 4.2A carril 1 y 2), así como de tejido transformado con el vector vacío mas DEX (carril 3), con la construcción *CcSERK1-OE* mas DEX (carril 4) y

por ultimo con la construcción *CcSERK1-SL* (carril 5), se sintetizó cDNA utilizando 600 ng de RNA total para el análisis de qRT-PCR (ver Figura 4.2 A y B).

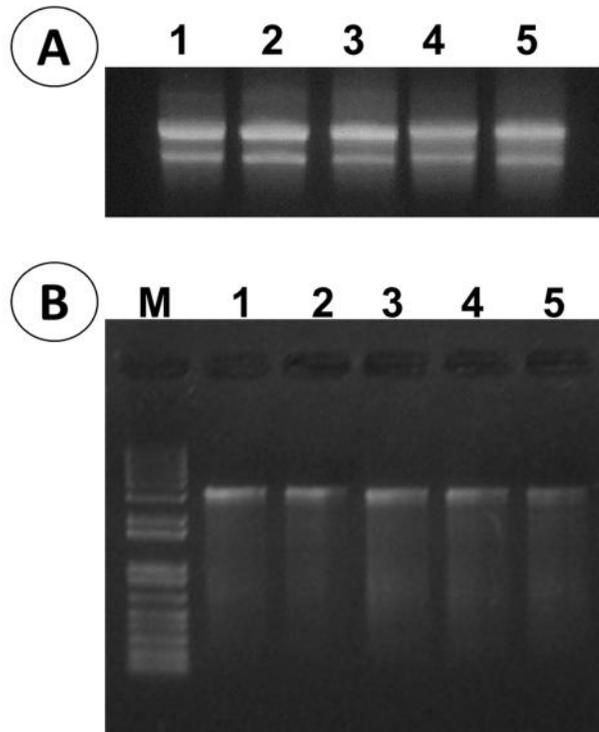


Figura. 4.2 Análisis de la integridad del RNA total y síntesis de cDNA. Alícuotas de 2.5 μL de cada muestra de RNA total y cDNA de primera cadena fueron fraccionadas por electroforesis nativa en gel de agarosa al 1.5% y teñidas con 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) Muestras de RNA total extraídas de explantes de silvestres y transformados de *Coffea canephora*, B) Síntesis de cDNA de primera cadena a partir de muestras de RNA total. M: escalera de DNA de 1 kb, Carril 1: ES testigo, Carril 2: ES +Dex, Carril 3: pTA211 +Dex, Carril 4: *CcSERK1-OE* +Dex, Carril 5: *CcSERK1-SL* +Dex.

Se analizó la activación y represión del transcrito de *CcSERK1* en las muestras de cDNA sintetizado con la finalidad de cuantificar los niveles de transcritos inducidos por efecto de la Dex. En la figura 4.3 se observa que la condición de sobreexpresión indujo 3 veces más la expresión de *SERK1* comparada con los testigos, mientras que la supresión condujo a una reducción casi total en los niveles de transcritos, con estos resultados se corroboró que efectivamente hay cambios muy evidentes y contrastantes en ambas condiciones que indican que la activación y represión de *CcSERK1* fue exitosa.

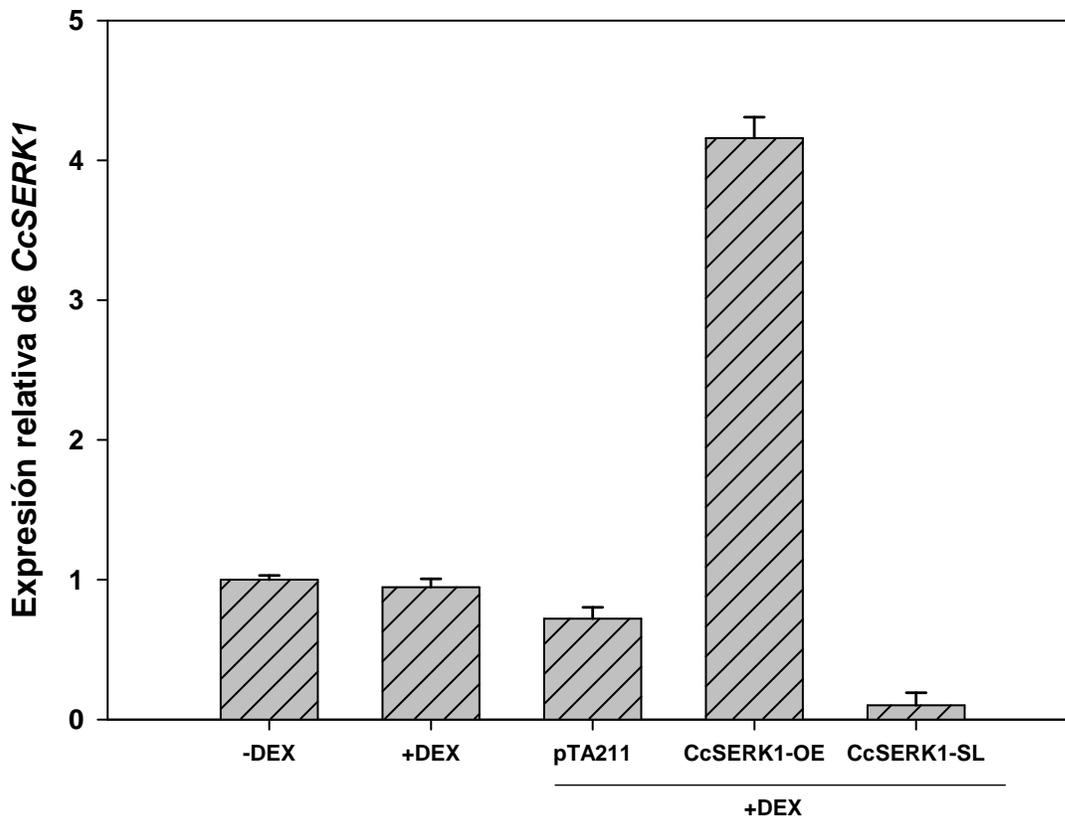


Figura 4.3 Cuantificación por qRT-PCR de la expresión del gen *CcSERK1*. Expresión relativa de *CcSERK1* en muestras de las diferentes condiciones a los siete días de ES. El análisis se realizó por triplicado. En todas las reacciones se utilizó el gen *EF-1* como normalización, con referencia a los tratamientos testigos (tejido silvestre sin DEX). Las barras sobre las columnas representan el error estándar (n=3).

En primera instancia se analizó la transcripción de genes que codifican factores de transcripción potencialmente relacionados con la ES como son *AGL15*, *LEC1*, *L1L*, *BBM*, *WUS*, *WOX4*, *ABI3*, *EMK*, y *PKL*.

Los genes que modificaron su expresión bajo la condición de sobreexpresión y represión fueron *AGL15*, *LEC1*, *L1L*, *WUS*, *BBM*, *PKL*, *EMK* (ver Figura 4.4), siendo *BBM* el gen

mas expresado en *SERK1*-OE. De manera interesante, los genes *LEC1* y *L1L* mostraron una disminución en su nivel de expresión en la condición de sobreexpresión, mientras tanto en la condición de represión el mas expresado fue *LEC1* en comparación de *L1L*, esta disminución puede estar directamente vinculada a la expresión de *PKL*, ya que este regula de manera negativa a la expresión de los genes *LEC* (Dean Rider *et al.*, 2003).

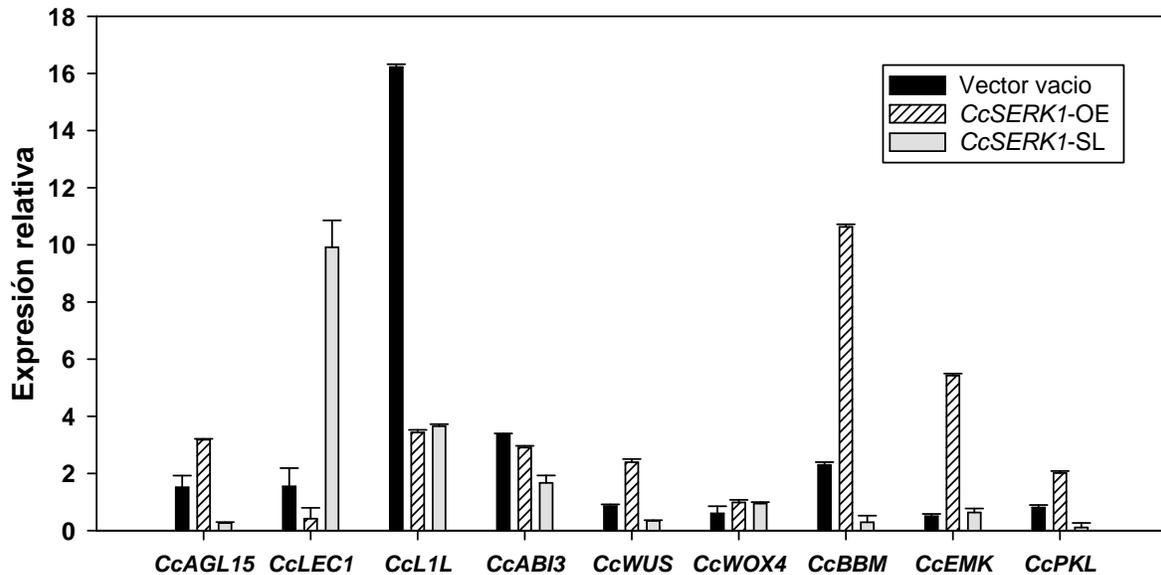


Figura 4.4 Efecto de la inducción exógena del gen *CcSERK1* en la transcripción de genes homéoticos durante la ES de *Coffea canephora* L. El análisis se realizó en muestras de RNA total de tejido transformado genéticamente a los siete días de haber iniciado el proceso de ES, con el vector vacío (pTA211), *CcSERK1*-OE, *CcSERK1*-SL en presencia de DEX por 24 h. El análisis se realizó por triplicado. En todas las reacciones se utilizó el gen *EF-1* como normalización, con referencia a los tratamientos testigos (tejido silvestre sin y con DEX). Las barras sobre las columnas representan el error estándar (n=3).

La transcripción del *WOX4* no se vio modificada de forma significativa, mientras que *ABI3* mostró un ligero descenso en la expresión en las dos condiciones analizadas, por lo que es probable que *SERK1* no tenga un efecto directo sobre la expresión de *WOX4*

Se ha sugerido que, para que en *C. canephora* ocurra la transición de un estado vegetativo a un estado embriogénico, es decisivo un cambio en el balance hormonal

endógeno de IAA (Ayil-Gutierrez et al., 2013). Por ello, en este trabajo se determinó si *CcSERK1* modifica la expresión de genes relacionados con la biosíntesis, la percepción y el transporte de auxinas.

Los resultados mostraron que los genes relacionados con la biosíntesis de IAA, como *TAA1*, *YUC1*, *YUC4*, fueron modificados en ambas condiciones, siendo *YUC4* el que mostró un aumento de casi 20 veces comparado con el testigo (el vector vacío) y 10 veces más comparada con los demás genes analizados, para el caso de *YUC10* solo mostró un ligero incremento en la condición de supresión (Ver Figura 4.5).

Por otro lado, los genes, que codifican transportadores de auxinas como *PIN1* y *PIN4*, fueron inducidos cerca de cuatro veces, mientras que *PIN1* fue inducido casi el doble, mientras que en la condición de supresión estos disminuyeron a niveles muy bajos. La expresión del receptor de auxinas *TIR1* mostró un ligero aumento y fue casi indetectable en la *SERK1*-Sup. Los resultados obtenidos indican que *SERK1* modifica positivamente la expresión de los genes que codifican a factores de transcripción íntimamente ligados a la ES, de igual manera puede regular la biosíntesis y la distribución de auxina, así como la degradación de los represores transcripcionales *Aux/IAA* vía proteasoma 26S a través de *TIR1*.

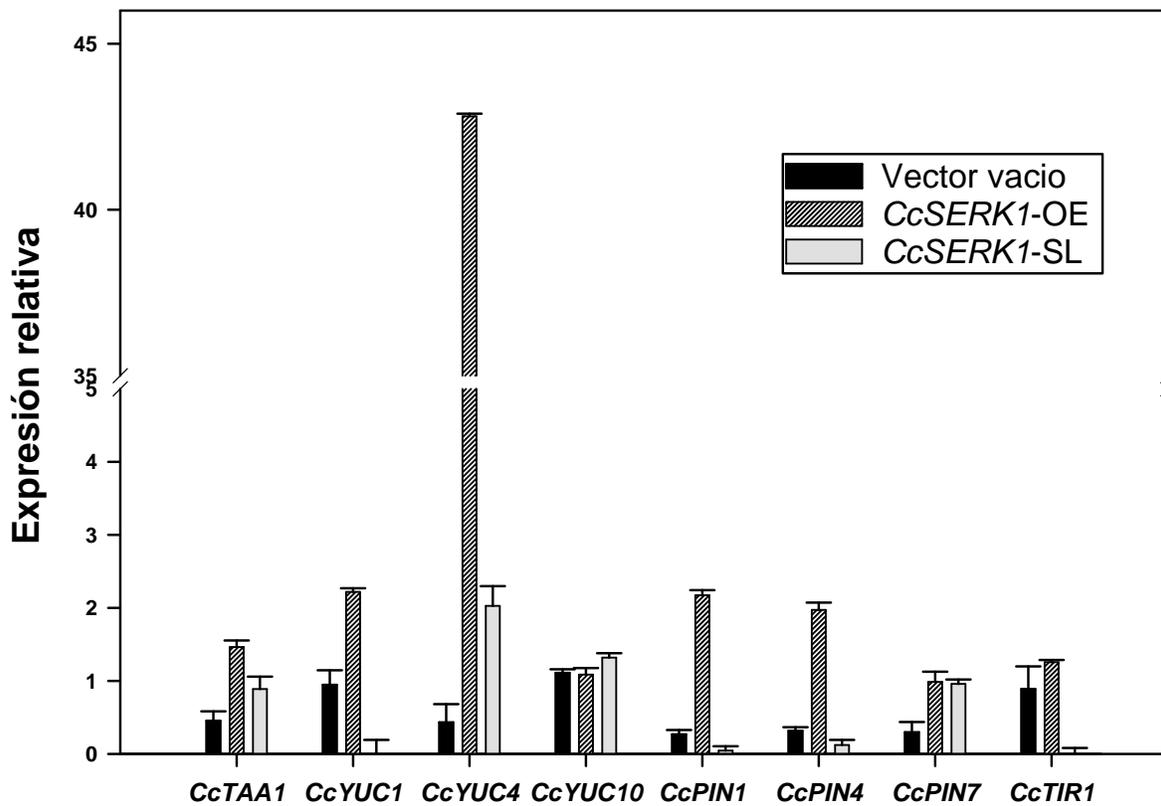


Figura 4.5 Efecto de la inducción exógena del gen *CcSERK1* en la transcripción de genes implicados en la biosíntesis y el transporte de auxina. El análisis se realizó en muestras de RNA total de tejido transformado genéticamente a los siete días de ES, con el vector vacío, *CcSERK1*-OE y *CcSERK1*-SL en presencia de DEX por 24 h. El análisis se realizó por triplicado. En todas las reacciones se utilizó el gen *EF-1* como normalización, con referencia a los tratamientos testigos (tejido silvestre sin y con DEX). Las barras sobre las columnas representan el error estándar (n=3).

4.4 DISCUSIÓN

Está documentado que la sobreexpresión de los correspondientes homólogos de *SERK1* en tejidos de *A. thaliana* y de *O. sativa* incrementa su potencial embriogénico. No obstante, los resultados del presente proyecto constituyen la única evidencia experimental cuantitativa del incremento en el número de embriones como resultado directo de la expresión de *CcSERK1*. El análisis de expresión del transcrito (por hibridación *in situ* y el uso de su promotor nativo fusionado a un gen reportero como gus) y la localización de la proteína utilizando etiquetas fluorescentes indican que *SERK1* se sintetiza y se localiza en en células con potencial embriogénico (Salaj *et al.*, 2008; Hecht *et al.*, 2001; Somleva *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 1997) o pluripotentes (Savona *et al.*, 2011, Kwaaitaal, 2007). La proteína *SERK1*, al igual que otros miembro de la subfamilia de LRR-RLKs, se localizan en la membrana plasmática (Shah *et al.*, 2001). La unión del ligando por parte del receptor desencadena una vía transducción de señales específica, la cual conduce a la alteración de la actividad transcripcional (Clouse, 2011).

En este trabajo se seleccionaron genes cuya sobreexpresión ectópica conduce al establecimiento de la ES (Tsuwamoto *et al.*, 2010; Zuo *et al.*, 2002; Boutilier *et al.*, 2002; Lotan *et al.*, 1998). De estos genes seleccionados (*AGL5*, *LEC1*, *WUS*, *BBM*, *EMK*), solo para *AGL15* existe evidencia experimental de su asociación física con *SERK1*, específicamente en la señalización por BR (Karlova *et al.*, 2006). De los demás genes, no existen reportes que demuestren que estén relacionados con *SERK1*.

El resultado del presente trabajo mostró que los genes cuya expresión resultó modificada en condiciones de sobreexpresión o silenciamiento de *CcSERK1* fueron *AGL15*, *LEC1*, *WUS*, *BBM* y *EMK*. Estos genes codifican factores transcripcionales que inducen la ES cuando son expresado ectópicamente (Tsuwamoto *et al.*, 2010; Thakare *et al.*, 2008; Gaj *et al.*, 2005; Harding *et al.*, 2003; Zuo *et al.*, 2002; Boutilier *et al.*, 2002). *BBM* y *EMK* fueron fuertemente expresados/reprimidos, *BBM* con la mayor transcripción inclusive 2 veces mas que *EMK*, e incluso fue mucho mayor a la que presentaron los genes *AGL15*, *WUS*, *PKL* (Figura 4.4).

CAPÍTULO II

Tanto *EMK*, también llamado *AIL5/PLT5*, como *BBM* pertenecen a la familia de factores de transcripción de la familia *APETALA2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF)*. Dado que *BBM* mostró una modulación muy marcada en este análisis, todo parece indicar que este gen puede ser uno de los blancos moleculares directos de *SERK1*. Es importante mencionar que en *Brassica napus*, *BBM* se identificó como un marcador molecular de la ES.

Análisis genéticos han demostrado que los genes *AINTEGUMENTA-LIKE (AIL)* funcionan corriente arriba y corriente abajo de la cascada de señalización de auxinas (Horstman *et al.*, 2014). *EMK (AIL5)* puede regular transcripcionalmente la biosíntesis a través de *YUC4* (Pinon *et al.*, 2013). *BBM* también se une y activa la expresión de genes de la biosíntesis de auxinas *TAA1*, *YUC3* y *YUC4* y los genes relacionados con el transporte de auxina *PIN1* y *PIN4* (Heidmann *et al.*, 2015). La expresión ectópica de *BBM* incrementa la ES y otras respuestas morfogénicas en un medio de cultivo carente de reguladores del crecimiento (Boutilier *et al.*, 2002, El Ouakfaoui *et al.*, 2010). Además, la sobreexpresión de *BBM* da lugar a la inducción de la ES indirecta en *Nicotiana tabacum* en presencia de citocininas (Srinivasan *et al.*, 2007), en *Populus tomentosa* (Deng *et al.*, 2009), en *Teobroma cacao* (Flores *et al.*, 2015) e inclusive en especies consideradas como recalcitrante a la ES como *Capsicum annuum* mediante un sistema inducible controlado por DEX (Heidmann *et al.*, 2011). En un análisis de microarreglos se demostró que *BBM* regula un grupode genes involucrados en proliferación y crecimiento celular (Passarinho *et al.*, 2008); en suspensiones celulares embriogénicas de *C. arabica*, *SERK1* se expresa con un patrón muy similar a *BBM*, sugiriendo una relación entre ambos (Torres *et al.*, 2015). De igual manera, se observó un patrón similar entre *BBM* y *SERK1* durante el desarrollo de la embriogénesis cigótica y somática en *Larix decidua* Mil, mientras que *LEC1* mostró un comportamiento contrario (Rupps *et al.*, 2016). Para el caso de *EMK*, este gen se expresa en embriones en etapas tempranas y tardías, y tiene un papel redundante en el mantenimiento la identidad de la célula embriogénica; además, su expresión ectópica promueve la iniciación de embriones somáticos a partir de los cotiledones (Tsuwamoto *et al.*, 2010).

La modulación exógena de *CcSERK1* también modificó sustancialmente los niveles de

expresión de *LEC1* y *L1L*, ambos disminuyeron en la condición de sobreexpresión, pero fue *LEC1* quien mostró una alta expresión en la condición de supresión. Para el caso de *L1L*, este presentó un ligero incremento en su expresión, sin embargo, este nivel no fue suficiente para recuperar el nivel de expresión mostrado en los explantes transformados con el vector vacío. Estos resultados parecen indicar que *CcLEC1* está más vinculado con *CcPKL*, puesto que la expresión de *CcPKL* se vio modificada en ambas condiciones (sobreexpresión/represión). Las evidencias indican que *PKL* puede regular de forma negativa la expresión de los genes *LEC* (*LEC1*, *LEC2*, *FUSC3*) (Dean Rider et al., 2003; Ogas et al., 1999), mediante la modificación de las histonas. En el modelo de ES de *C. canephora* ya se ha reportado que *LEC1* puede ser regulado epigenéticamente a través de la modificación en la histona H3K27me3 (Nic-Can et al., 2013), eso explicaría por qué la expresión tanto *CcLEC1* como *CcL1L* disminuyera en la fase temprana de la ES, cuando *SERK1* tiene la mayor actividad. No obstante, el hecho que *CcL1L* haya mostrado un comportamiento en su expresión menos evidente en *CcSERK1-SL* parece debilitar la hipótesis de su papel regulador de *CcLec1*. La explicación al resultado anterior puede ser, que *Lec1* además de estar regulado por *PKL*, también puede estar regulado por *VAL1/2*, el cual codifica para una proteína con dominio B3 e incluye un tipo hemoedominio y dominios CW asociados con factores de cromatina a través de los cuales regula a los genes *LEC2*, *FUSC3* y *ABI3* (Suzuki et al., 2007). Estos antecedentes podrían explicar también el comportamiento de *CcABI3* en este análisis. Por otra parte se sabe que tanto *LEC1* como *L1L* tienen un importante papel en la maduración de los embriones y en la definición de la identidad de las células del suspensor (Meinke et al., 1994; West et al., 1994; Meinke 1992), así que es probable que no sean requeridos al inicio del establecimiento de la ES, sino que su función esté más relacionado con el posterior desarrollo embrionario.

Por otra parte, *SERK1* puede regular la expresión de genes vinculados con la biosíntesis

CAPÍTULO II

de auxinas derivada de la vía dependiente de triptófano. *SERK1* modificó la expresión del gen *TAA1*, que codifica una enzima clave que cataliza la conversión de triptófano a ácido indol-3-pirúvico (IPyA) y AAI, a través de la actividad de los genes *YUC*. Los resultados muestran que los genes *CcYUC1* y *CcYUC4* fueron inducidos en la condición de *SERK1*-OE, siendo *YUC4* el más sobresaliente.

En la ES de *Arabidopsis*, *AtYUC4* se expresa en las primeras seis horas teniendo un máximo a las 24 h después de ser retirado el 2,4-D del medio, teniendo un comportamiento muy similar a *YUC1* (Bai *et al.*, 2013). En la ES de *C. canephora*, la alta expresión de *YUC1* fue observada a los 14 días del pretratamiento y de manera dinámica en los primeros días de inducción (Ayil-Gutierrez *et al.*, 2013). La expresión del receptor *CcTIR1* en este análisis puede estar vinculada al aumento en la concentración de auxinas, provocando que estas se unan a los receptores TIR1-AFBs (Auxin-related F-box proteins), activando la expresión génica como consecuencia de la degradación de los represores transcripcionales *Aux/IAA* (Dharmasiri *et al.*, 2005a; 2005b; Kepinski y Leyser, 2005). Para el caso de *CcYUC10*, su expresión se modificó sustancialmente solamente en la condición de supresión, incrementando su expresión. Este cambio puede estar vinculado a la alta expresión de *CcLEC1*, ya que la evidencia indica que *LEC1* regula la expresión de *YUC10*, dando como resultado la formación de raíz, un fenotipo producido por altos niveles de auxinas (Junker *et al.*, 2012).

En el presente modelo, la respuesta embriogénica dependió del tratamiento previo de las hojas con NAA y KIN, de la adición de 6-BA y de la generación de una herida en el explante durante la etapa de inducción. En este modelo se ha demostrado de manera consistente y reproducible que los embriones se originan a partir de células del mesófilo, pero no en la vena central del explante foliar (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002). En este trabajo se evidenció que la zona de la vena media sí puede ser un sitio de generación de ES ya que cuando se sobre-expresó *CcSERK1*, también ahí se originaron embriones somáticos sin que hubiese realizado ninguna herida. En esta zona existe una alta expresión de *SERK1* (Figura 3.9B, panel b).

También, se ha documentado que genes que codifican factores de transcripción del tipo

IAL/PLT, de enzimas responsables de la biosíntesis y de transportadores de auxinas presentan una fuerte actividad allí, además que en esa zona se encuentra el procambium y se ha reportado que *SERK1* se expresa en las células del procambium vascular (Rocha *et al.*, 2015; Savona *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011; Nolan *et al.*, 2009; Hech *et al.*, 2001). Células del procambium vascular pueden adquirir la capacidad de totipotencialidad y posteriormente conducir a la ES mediante la adición de reguladores de crecimiento vegetal (Kwaaitaal y de Vries, 2007).

Por otra parte, la supresión de *SERK1* causó una reducción de la capacidad embriogénica casi en su totalidad, mientras que las estructuras que se lograron formar se convirtieron en radícula. De acuerdo con los resultados del análisis de expresión génica se puede pensar en dos explicaciones para este fenómeno) La primera explicación es que el fenotipo radicular puede deberse a la supresión de *CcLEC1* en condiciones de *CcSERK1-OE* y a su inducción de hasta cuatro veces más en *CcSERK1-SL*. Se ha observado que la expresión ectópica de *LEC1* en *Arabidopsis* induce un rango de fenotipos entre los cuales se destaca la producción de raíces (Lotan *et al.*, 1998), mientras que en tabaco causa anomalías en plántulas transgénicas, las cuales adquieren una forma de colmillo de marfil sin la formación de cotiledones (Gou *et al.*, 2013). Además, se puede formar raíces que acumulan auxina principalmente en la zona de elongación en la unión raíz-hipocótilo (Junker *et al.*, 2012). El gen *LEC1* de *Kalanchoë daigremontiana* codifica una proteína tipo *LEC1* que tiene un único dominio B, con once únicos aminoácidos y presenta un codón de término prematuro, generando una proteína no funcional en *Arabidopsis*. La pérdida funcional de *LEC1* promueve la formación de embriones somáticos en los márgenes de las hojas y de esta manera la propagación vegetativa de *K. daigremontiana* (Garcês *et al.*, 2014). ii) La segunda explicación es que el fenotipo puede deberse a la casi nula expresión de los genes *CcYUIC1*, *CcYUC4*, *CcPIN1*, *CcPIN4* y *CcTIR1*, debido a que se ha reportado que la mutante cuádruple *yu1yuc4yuc10yuc11* puede tener efectos negativos en la ES y a su vez conducir a la formación de raíz (Bai *et al.*, 2013).

CAPÍTULO II

De igual manera, sucede con la mutante *pin1*, que no puede inducir embriones somáticos primarios en el explante, pero si formar radícula, mientras que la mutante de *tir1* da como resultado severas anormalidades en los embriones somáticos (Su *et al.*, 2009).

En estudios recientes de genética, bioquímica y cristalografía se demostró que SERK1, 2 y 3 funcionan como correceptores de PXY (*PHLOEM INTERCALATED WITH XYLEM*) para unir el péptido CLE41/TDIF (*TRACHEARY ELEMENTS DIFFERENTIATION INHIBITORY FACTOR*). Esta unión regula la proliferación celular del procambium conferiendo a las plantas la actividad de diferenciación continua (Zhang *et al.*, 2016a, Zhang *et al.*, 2006b). Con base en lo anterior, PXY puede ser un candidato para formar parte del complejo de proteínas que regula la diferenciación celular en la adquisición de la ES en *Coffea canephora*.

Hasta el momento, no hay ningún reporte en la literatura científica que indique que SERK1 module la expresión de genes de la biosíntesis de auxina en la ES, probablemente porque debido al papel de las auxinas en el establecimiento de la ES, su relación con SERK1 parecería obvia. Actualmente, solo se ha sugerido que *SERK1*, junto con *SERK3* y *SERK4* pudieran modular la expresión de genes del transporte de auxinas en el control del desarrollo de la raíz, a través de la vía independiente de BR (Du *et al.*, 2012).

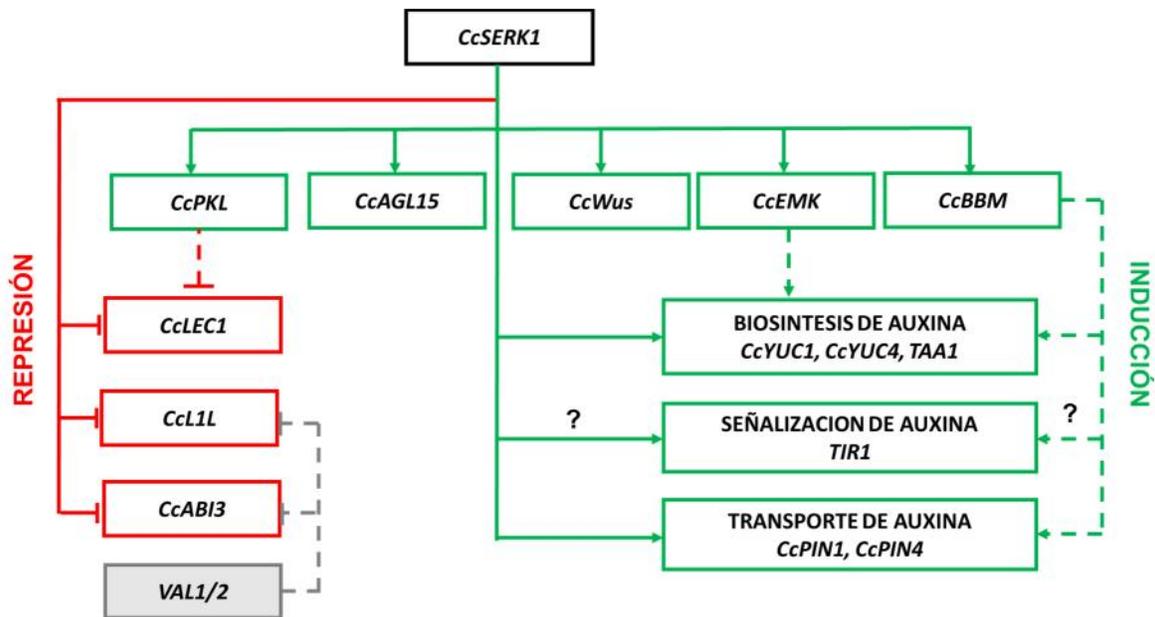


Figura 4.6 Representación gráfica de los resultados obtenidos en este estudio. La sobreexpresión de *CcSERK1* puede activar la vía de transducción de señales que en última instancia puede modular positivamente la expresión de genes como *CcAGL15*, *CcWUS*, *CcLEC1*, *CcEMK*, *CcBBM*, *CcTAA1*, *CcYUC1*, *CcYUC4*, *CcPIN1*, *CcPIN7* y *CcTIR1*.

En conclusión, se encontró expresión diferencial de genes relacionados con la iniciación de la ES en la condición de sobreexpresión/represión de *SERK1*, estos pueden ser blancos directos y pueden ser candidatos para regular el inicio de la ES. En condición normal, *SERK1* presenta un patrón de expresión dinámico, con picos altos y bajos durante todo el proceso, este cambio puede ser esencial para regular la expresión de genes que son importantes para que se inicie y se complete el programa embriogénico.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

La implementación del protocolo experimental propuesto permitió cumplir el objetivo general, el cual consistió en la caracterización molecular de *SERK1* de *Coffea canephora* durante la ES, EC y diferentes tejidos, además de analizar genéticamente su implicación en la respuesta embriogénica y evaluar los cambios en los niveles de expresión de genes vinculados al proceso inicial de ES.

Los análisis de expresión génica demostraron que los niveles de expresión de *CcSERK1 in planta* son mayores en tejidos meristemáticos. En la EC mostró un patrón de expresión muy similar a la ES, con una mayor transcripción al inicio del proceso. Los resultados en la ES indican que la condición de pretratamiento e inducción de la ES provocó cambios muy marcados en el incremento de su expresión, por lo que estos cambios pueden ser decisivos para que se establezca el programa embriogénico.

Los resultados de la manipulación de su expresión en el modelo de la ES generaron evidencias sólidas que apoyan fuertemente la hipótesis que señala a *SERK1* como uno de los factores mas importantes para el establecimiento del proceso. Específicamente, la represión de *SERK1* provocó una reducción casi total de la respuesta embriogénica y la perturbación del control del destino embriogénico, provocando la formación de radícula a partir de las estructuras embriogenicas formadas. Esto indica que la función del receptor *SERK1* es requerida para el establecimiento del proceso embrionario pero también para que este avance de manera regulada.

En este trabajo también se mostraron las primeras evidencias de la influencia de *SERK1* y la expresión de genes implicados en el establecimiento y el avance de la ES; específicamente, se encontró que su expresión condujo a la inducción de genes involucrados en eventos tempranos y a la represión de genes reguladores de eventos tardíos. De esta manera, estos resultados sugieren que el control que *SERK1* parece tener sobre el control del establecimiento y el avance de la ES podría ser efectuado a través de la regulación de genes maestros del desarrollo embrionario, como *AG1L5*, *WUS*, *LEC1*, *EMK*, *BBM* y el factor de remodelación de cromatina *PKL*. Además, los resultados evidenciaron que la expresión de *SERK1* puede inducir genes de biosíntesis, transporte y señalización de auxinas, las cuales constituyen el grupo de reguladores del crecimiento vegetal asociados mas directamente con el desarrollo embrionario. La relación entre la concentración de auxinas y las modificaciones en la expresión de genes maestros del desarrollo embrionario debe demostrarse posteriormente.

De manera global, este trabajo generó evidencias sólidas que sustentan la función indispensable de *SERK1* para el establecimiento de la ES y ofrece, hasta donde sabemos, las primeras evidencias de los mecanismos moleculares mediante los cuales se lleva a cabo la regulación de la transición somática-embrionaria en vegetales.

5.2 PERSPECTIVAS

Con base en las evidencias generadas en este trabajo y empleando el modelo de regulación ectópica de la expresión del gen *CcSERK1*, se pueden plantear una serie de objetivos y de actividades experimentales que permitirían profundizar aún más en el entendimiento de los mecanismos mediante los cuales este regula la ES en *Coffea canephora*. Algunas de las que nos parecen más atractivas se listan en seguida:

1. Se puede analizar el papel de otros reguladores del crecimiento vegetal, como ABA, GA y CK en la regulación de la embriogénesis somática.
 2. Se puede determinar la relación genética entre los factores de transcripción *CcAGL15*, *CcWUS*, *CcLEC1*, *CcEMK* y *CcBBM* en el proceso, mediante análisis de epistasia.
 3. De acuerdo con el fenotipo observado en este trabajo se puede determinar la asociación (interacción proteína-proteína) de receptores candidato para identificar con cuál de ellos *CcSERK1* se asocia para activar la respuesta embriogénica en el explante. Por ejemplo, los receptores BRI1, PXY (Phloem Intercalated with Xylem) y RGFR1 (Root Meristem Growth Factor). El protocolo puede basarse en la fusión de sus cDNA con la secuencia de proteínas fluorescentes como GFP, YFP, CFP, o midiendo la dosis-respuesta de la adición de ligando en la activación del complejo y la respuesta embriogénica.
 4. Se puede emplear el mismo enfoque utilizado en este trabajo para investigar la implicación de los genes *CcSERK2* y *CcSERK3* identificados en el genoma de *Coffea canephora*, en la respuesta embriogénica.
-

ANEXOS

Anexo I

I.I Extracción de RNA total de explantes foliares de café

La extracción de RNA total de muestras individuales se realizó a partir de 100 mg de explantes foliares de *C. canephora L.* Se maceró en presencia de N₂ líquido, hasta obtener un polvo fino y uniforme. Se adicionó inmediatamente un mL del reactivo comercial TRIzol y 10 µL de β-mercaptoetanol, continuar macerando hasta obtener una solución homogénea. Transferir el macerado a un tubo eppendorf (1.5 mL) y dejar reposando 10 min a temperatura ambiente (TA), aplicar vórtex continuamente cada min. Centrifugar a 14,000 x g, por 15 min a 4 °C, recuperar cuidadosamente la fase acuosa sin tocar la interfase y transferir a un tubo limpio. Adicionar 0.3 mL de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) por cada un mL de TRIzol, e incubar a TA por 10 min con agitación vigorosa. Centrifugar a 14,000 x g, por 15 min a 4 °C, para separar las fases. Tomar la primera fase con mucho cuidado y transferir a un nuevo tubo, se mide el volumen extraído. De acuerdo con el volumen extraído, adicionar 0.5 vol. de isopropanol, mas 0.5 vol. una mezcla de 0.8 M de citrato de sodio/1 M de NaCl. Incubar a 4 °C, por hora y media, para precipitar el RNA presente en la muestra. Centrifugar a 14,000 x g por 15 min, a 4 °C, y decantar el sobrenadante, quedando solo la pastilla de RNA en el fondo del tubo. Lavar la pastilla con un mL de etanol al 75% (-20 °C). Centrifugar a 12,000 x g por 10 min, a 4 °C, y decantar el sobrenadante. Secar la pastilla a TA y por último resuspender la pastilla en 20-30 µL de agua tratada con DEPC o Sigma (libre de RNAsas).

I.II Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó por método CTAB (Doyle y Doyle, 1990), el cual consiste en pulverizar 200 mg de tejido de la muestra en un mortero con N₂ y se transfiere el tejido pulverizado a un tubo eppendorf y se adiciona un volumen de la solución de extracción recién preparada (CTAB 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 20 Mm, Tris-HCl 100 Mm pH 8.0), mas 2% de β-mercaptoetanol y se incuba a 60°C por 0.5-1 h en un termoblock. Agregar un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y mezclar por inversiones. Centrifugar a 10,000 x g durante 10 min y se transfiere la fase acuosa (superior) a un tubo nuevo. Repetir los dos pasos anteriores. Volver a centrifugar a 10,000 x g por 10 min y separar nuevamente la fase superior en un tubo nuevo. Para la eliminación de RNA, tratar con RNAsa (10 mg/mL) incubando durante 30 min a 37°C. Agregar 0.7 vol de isopropanol (-20°C) de acuerdo con el volumen extraído, y incubar durante una hora a -20°C para precipitar el DNA. Centrifugar nuevamente a 10,000 x g por 10 min. Retirar el sobrenadante, lavar la pastilla con 500 µL de solución de lavado y por último con 400 µL de alcohol al 70%. Secar a temperatura ambiente y resuspender en agua estéril.

I.III Análisis de expresión de *CcSERK1* de acuerdo con el número de ciclos.

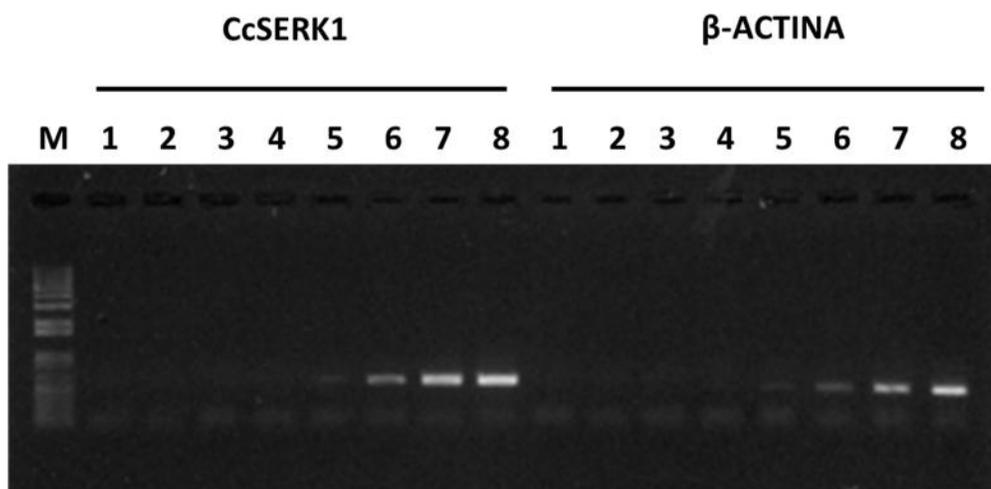


Figura A1. Análisis de expresión por RT-PCR del gen *CcSERK1* de acuerdo con el número de ciclos. Una alícuota de los productos de RT-PCR fueron fraccionados por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. La reacción se optimizó con el uso de 200 ng de RNA total. Carril1: 15 ciclos, Carril 2: 18 ciclos, Carril 3: 21 ciclos, Carril 4: 24 ciclos, Carril 5: 27 ciclos, Carril 6: 30 ciclos, Carril 7: 33 ciclos, Carril 8: 36 ciclos, M: Escalera de DNA de 1Kb. El análisis también se realizó para el gen de referencia β -Actina

I.IV Análisis de la identidad del plásmido binario pTA211

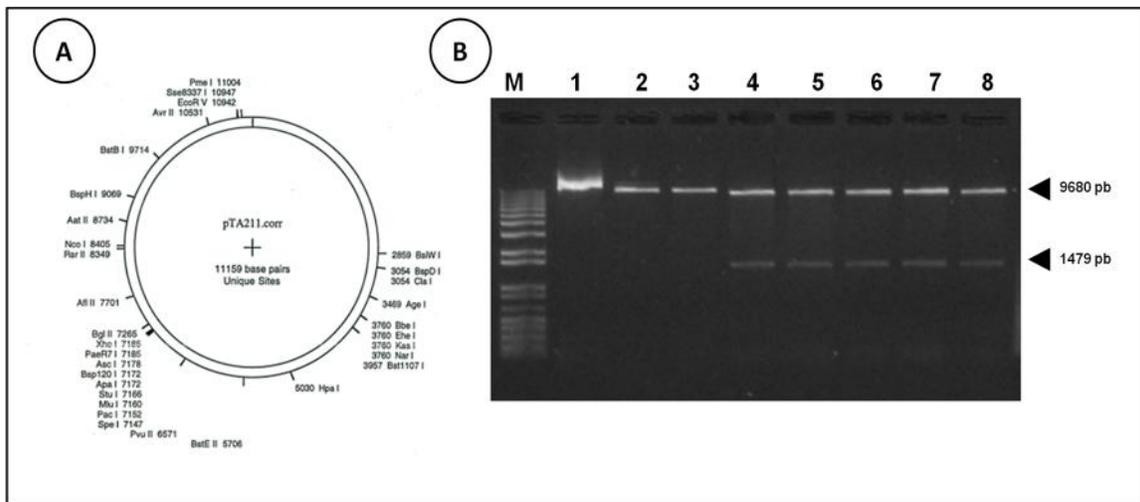


Figura A2. Verificación de la identidad del plásmido pTA211. Alícuotas de los productos obtenidos de la extracción de DNA plasmídico y digestión enzimática fueron separados por electroforesis en un gel nativo de agarosa y teñidas con $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) Mapa del plásmido pTA211, B) Carril1: plásmido pTA211 sin digerir, Carril 2: plásmido pTA211 digerido con la enzima XhoI, Carril 3: plásmido pTA211 digerido con la enzima BstEII, Carriles 4-8 plásmidos pTA211 digerido con las enzimas XhoI/ BstEII. M: escalera de DNA de 1 kb.

I.V PCR Directo a partir de colonias de *Agrobacterium tumefaciens*

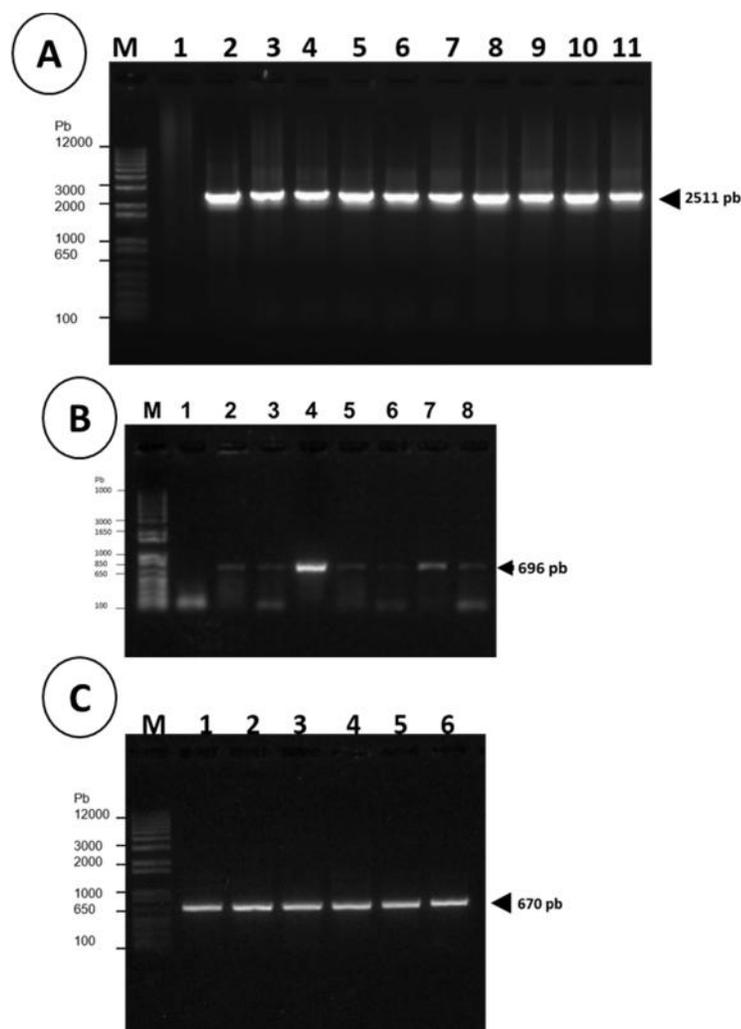


Figura A3. Verificación por PCR de la transformación de *CcSERK*-OE, *CcSERK*-SL y pTA211 vacío en *A. tumefaciens*. Una alícuota de los productos de PCR se fraccionó por electroforesis en un gel nativo de agarosa al 1% y teñida con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. A) PCR directo de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con *CcSERK*-OE. Carril 1: testigo negativo (H_2O), Carril 2: Testigo positivo (DNA plasmídico), Carriles 3-12 productos de PCR amplificados con cebadores específicos de *CcSERK1*. B) PCR directo de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con *CcSERK*-SL. Carril 1: testigo negativo (H_2O), Carriles 2-8 productos de PCR amplificados con cebadores específicos de *CcSERK1*. C) PCR directo de colonias de *A. tumefaciens* transformadas con pTA211. Carriles 1-6: Productos de PCR amplificados con cebadores específicos de higromicina. M: Escalera de DNA de 1 kb.

I.VI Extracción de RNA total RNeasy® Plant Mini Kit

CAPÍTULO II

La extracción de RNA total se realizó utilizando RNeasy® Plant Mini Kit, en cual consiste en los siguientes pasos. Se maceró en un mortero en presencia de N₂ líquido 100 mg de material vegetal. Se añadieron 450 µl del amortiguador de RLC (Amortiguador de lisis contiene Hidrocloruro de guanidina) y 4.5 µl de β-ME y se le aplicó vortex vigorosamente. Posteriormente se transfirió el lisado a una columna QIAshredder (color lila) colocado en un tubo de dos ml. Se centrifugó durante dos minutos a toda velocidad. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. Se añadieron 0.5 volúmenes de etanol (100%) al lisado, y se mezcló inmediatamente por pipeteo. La muestra (generalmente 650 µl) se transfirió a una columna RNeasy Mini (color rosa) colocado en un tubo de dos ml. Después se centrifugó durante 15 s a 8000 x g (10,000 rpm). Se desechó el flujo.

Posteriormente, se añadió 700 µl de tampón RW1 (Amortiguador de lavado de RNA unido a la membrana contiene Tiocianato de Guanidina, Etanol) a la columna RNeasy y se centrifugó durante 15 s a 8000 x g. A continuación, se desechó el flujo y se añadió 500 µl del amortiguador RPE (Amortiguador de lavado) a la columna RNeasy. Después se centrifugó nuevamente durante 15 s a 8000 x g y se desechó el eluato. Se repitió dos veces más el lavado anterior. Como paso opcional: Se colocó la columna RNeasy en un nuevo tubo de dos ml y se centrifugó a toda velocidad durante un min para secar la membrana. Se colocó la columna RNeasy en un tubo nuevo de 1.5 ml y se añadió 30µl agua libre de RNasa directamente al centro de la columna. Por último, se centrifugó durante un min a 8000 x g para eluir el RNA.

I.VII Cebadores específicos utilizados

Tabla A1. Lista de cebadores específicos para amplificación por PCR de secuencias de DNA genómico y/o cDNA

Nombre	Secuencia del cebador (3' 5')	Tm (°C)
CcSERK1-For	CAGCTTGACAGGTCCCATCCCATTG	71
CcSERK1-Rev	TGCAGCTCTCCACCTGGTGTTCG	71
-Actina-For	GCAGATGGTGAGGAGATTCAA	55
-Actina-Rev	GTCCAGCACAATACCAGTTGTACG	55
HPT-For	GCTCCATACAAGCCAACCAC	51
HPT-Rev	CGAAAAGTTCGACAGCGTCTC	51
VIRE2-For	TGCCACCAAGGCGGAAT T	53
VIRE2-Rev	CTTGCCGACCC ATC GA	49

Tabla A2. Cebadores específicos de CcSERK1 con sitio de corte para enzimas de restricción previamente elegidas

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (3' 5')	Tm (°C)
CcSERK1-XhoI-For	GCAGCTCGAGTTACAGAGGTGAAAAGTTTGCAGGGTG	71
CcSERK1-XhoI-Rev	GCAGCTCGAGTTTCGCACAAATTGAAATACATTTACAAT	72
CcSERK1EXT-ApaI-For	ATTGCAGGGCCCATGGCAAGGGTGGAGGGATTAGTT	72
CcSERK1EXT-XhoI-Rev	ATGCAGCTCGAGTCCTGGAGTAGCAATTGGAGGTGG	72

Tabla A3. Lista de cebadores específicos empleados en qRT-PCR

Acceso	Nombre	Sequence (3' 5')	Tm (C)
--------	--------	------------------	--------

CAPÍTULO II

Cc10_g06160	<i>SERK1</i>	F* ACGGGATCATGCTTCTTGAG R* CCCAATCAAGCAACATGACATC	62
Cc01_g11510	<i>EF-1</i>	F AGCCTGGTATGGTTGTGACC R ACCAGGAAGTGCCTCTTGAA	62
Cc02_g28980	<i>AGL15</i>	F GCAGATGTTGGGAAAGGATC R TCCTTTCTCGCCTTTATTGAAG	52
Cc09_g00330	<i>L1L</i>	F CCCCACCTCATTTCACCTG R TCTTTGAGAAACCCGTTCATG	53
Cc05_g00480	<i>LEC1</i>	F TGAAGAGGTCAAGACAACCA R GTCTTGCCTTGCTCACAG	60
Cc07_g10660	<i>WUS</i>	F CCTTCACCATACCAATTCCTG R GAGTTTCTAATTCTGGGACCG	53
Cc10_g04700	<i>WOX4</i>	F CGTGGATTTTGGGAGCATG R ACGGTGGTGGGAGTATTG	53
Cc09_g04020	<i>BBM</i>	F CCAACCCGAGAACAAGATC R GCAGATGTTGATTGTGACCC	53
Cc06_g13190	<i>EMK</i>	F GCTCTCGGCTTTGTTTTG R AGTTGGGATTTTGGCAGTG	53
Cc01_g17380	<i>ABI3</i>	F GCAAATCCATATCCGTATCAGG R TGCCATCCTTTTCTTGCG	53
Cc08_g00060	<i>PICKLE</i>	F CAACCCAACTCCTTGCTG R ACTTGATCCTCTACCTCCATG	53
Cc11_g15530	<i>TAA1</i>	F TCACTACACTCCCATTACCTC R CCCATCCAATTCTTGAACCAG	53
Cc06_g12600	<i>YUCCA1</i>	F GTAGTCGGGTACAAGAAATCAG R GTAACGCCTGACCACAATG	53
Cc11_g01360	<i>YUCCA4</i>	F ATTGCCTGTGGGTTGATG R AAGAATGACAGAAGGGACAC	52
Cc01_g20210	<i>YUCCA10</i>	F TCCAAACCTAGTCCTTGAGAG R GACAGAAGTGTAGCCAGG	53
Cc04_g06290	<i>PIN1</i>	F TCAAGGGAATGTACGGAGAG R CGAACATGAAGAGCATCAGAG	53

Cc03_g13040	<i>PIN4</i>	F CAATCCCTACACCATGAACC R GCCCCTTTTGCTCACTTTAG	53
Cc11_g08680	<i>PIN7</i>	F CTTTCCCTATCCACGCTTC R AATTTGTACCATTAGGCTCCC	52
Cc01_g20300	<i>TIR1</i>	F TGAAGTGATGGACGAGAGG R TGTCAAACCTAGGCCCTG	54

*Directo

+Reverso

BIBLIOGRAFÍA

- Aan den Toorn, M., M. M. Huijbers, S. C. de Vries, y C. P. van Mierlo (2012). The *Arabidopsis thaliana* SERK1 Kinase Domain Spontaneously Refolds to an Active State *In Vitro*. *PLoS one*, 7(12), e50907.
- Aker, J., J. W. Borst, R. Karlova, y S. C. de Vries (2006). The *Arabidopsis thaliana* AAA protein CDC48A interacts in vivo with the somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 receptor at the plasma membrane. *Journal of Structural Biology*, 156(1), 62-71.
- Aker, J., y S. C. de Vries, (2008). Plasma membrane receptor complexes. *Plant Physiology*, 147(4), 1560-1564.
- Albrecht, C., E. Russinova, V. Hecht, E. Baaijens, y S. C. de Vries, (2005). The *Arabidopsis thaliana* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASES1 and 2 control male sporogenesis. *The Plant Cell*, 17(12), 3337-3349.
- Aleith F. y G. Richter (1991). Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. *Planta*, 183(1), 17-24.
- Ammirato PV (1983) Embryogenesis. In: Evans D.A, Sharp W.R., Ammirato P.V., Yamada Y. (eds). *Techniques in Propagation and Breeding, Handbook of Plant Cell Culture*, Vol 1. MacMillan, New York. pp. 82-123.
- Aoyama, T. y N. H. Chua (1997). A glucocorticoid mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, 11(3), 605-612.
- Arroyo-Herrera, A., A. K. Gonzalez, R. C. Moo, F. R. Quiroz-Figueroa, V. M. Loyola-Vargas, L. C. Rodriguez-Zapata, C. B. D'Hondt, V. M. Suárez-Solís y E. Castaño, (2008). Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94(2), 171-180.
- Beck, M., y S. Robatzek (2012). Receptor Trafficking in Plants. In: Tax F.E., Birgit K. (eds).
-

Receptor-like kinases in plants. Berlin, Heidelberg, Germany, Springer, pp 253-274.

Belmonte, M. F., M. Tahir, D. Schroeder y C. Stasolla, C. (2007). Overexpression of HBK3, a class I KNOX homeobox gene, improves the development of Norway spruce (*Picea abies*) somatic embryos. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), 2851-2861.

Boutilier K., R. Offringa, y V. K. Sharma (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell*, 14(8), 1737-1749.

Bratzel, F., G. López-Torrejón, M. Koch, J. C. Del Pozo y M. Calonje (2010). Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Current Biology*, 20(20), 1853-1859.

Braybrook S. A., S. L. Stone, S. Park (2006). Genes directly regulated by *LEAFY COTYLEDON2* provide insight into the control of embryo maturation and somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(9), 3468-3473.

Bryan, A., A. Racolta, F. Tax, y S. Liljegren (2012). The social network: receptor kinases and cell fate determination in plants. In: Tax F.E., Birgit K. (eds). *Receptor-like kinases in plants*. Berlin, Heidelberg, Germany. Springer, pp.41-65.

Canales C, A. M. Bhatt, R. Scott, y H. Dickinson (2002). EXS, a putative LRR receptor kinase, regulates male germline cell number and tapetal identity and promotes seed development in Arabidopsis. *Current Biology*, 12(20), 1718-1727.

Canche-Moo, R. L. R., A. Ku-González, C. Burgeff, V. M. Loyola-Vargas, L. C. Rodríguez-Zapata y E. Castaño (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 84(3), 373-377.

Chan, A. L. (2013). *Light Induction of Somatic Embryogenesis and Dark Germination of*

CAPÍTULO II

- Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Tesis de Doctorado. University of Manitoba. Manitoba Canada. pp. 62-65.
- Chanvivattana, Y., A. Bishopp, D. Schubert, C. Stock, Y. H. Moon, Z. R. Sung y J. Goodrich, (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*, 131(21), 5263-5276.
- Chinchilla, D., L. Shan, P. He, S. C.de Vries, y B. Kemmerling (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science*, 14(10), 535-541.
- Chinchilla, D., C. Zipfel, S. Robatzek, B. Kemmerling, T. Nurnberger, J. D. Jones, G. Felix, y T. Boller (2007). A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature*, 448(7152), 497-500.
- Choi, Y. E., D. C. Yang, J. C. Park, W. Y. Soh, y K. T. Choi (1998). Regenerative ability of somatic single and multiple embryos from cotyledons of Korean ginseng on hormone-free medium. *Plant Cell Reports*, 17(6-7), 544-551.
- Cho, S.K, C. T. Larue, D. Chevalier, H. Wang, T. L. Jinn, S. Zhang, J.C. Walker (2008). Regulation of floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(40), 15629-15634.
- Chow, K. S., A. K. Ghazali, C. C. Hoh y Z. Mohd-Zainuddin (2014). RNA sequencing read depth requirement for optimal transcriptome coverage in *Hevea brasiliensis*. *BMC Research Notes*, 7(1), 69.
- Chugh, A. y P. Khurana (2002). Gene expression during somatic embryogenesis recent advances. *Current Science*, 83(6), 715-730.
- Colcombet, J., A. Boisson-Dernier, R. Ros-Palau, C. E. Vera, y J. I. Schroeder (2005). *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES1 and 2 are essential for tapetum development and microspore maturation. *The Plant Cell*, 17(12), 3350-3361.
- Clouse, S. D. (2011). Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation
-

to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell*, 23(4), 1219-1230.

Curaba J., T. Moritz, R. Blervaque, F. Parcy, V. Raz, M. Herzog, G. Vachon (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellins biosynthesis, is regulated during embryogenesis by *LEAFY COTYLEDONS2* and *FUS3* in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 136(3), 3660-3669.

Curtis, M. D., y U. Grossniklaus (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiology*, 133(2), 462-469.

De Vries, S., K. Shah, I. Rienties, V. Raz, V. Hecht, y J. Russinova (2003). The role of the Arabidopsis somatic embryogenesis receptor-like kinase 1 (AtSERK1) gene in embryogenic competence. In *Plant Biotechnology 2002 and Beyond*, Vasil I.K. (eds). Springer, Dordrecht, pp. 269-272.

Deng, W., K. Luo, Z. Li y Y. Yang (2009). A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis. *Plant Science*, 177(1), 43-48.

Domoki, M., J. Gyorgyey y J. Biro (2006). Identification and characterization of genes associated with the induction of embryogenic competence in leaf protoplast-derived alfalfa cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1759(11), 543-551.

Doyle, J. J. y J. L. Doyle (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12(1), 13-15.

Dudits, D., L. Bogre, J. Gyorgyey (1991). Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells *in vitro*. *Journal of Cell Science*. 99(3), 475-484.

Du, J., H. Yin, S. Zhang, Z. Wei, B. Zhao, J. Zhang, y J. Li (2012). Somatic Embryogenesis

Receptor Kinases Control Root Development Mainly via Brassinosteroid Independent Actions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54(6), 388-399.

Elhiti, M., C. Stasolla, y A. Wang (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49(6), 631-642.

Elhiti, M., M. Tahir, R. H. Gulden, K. Khamiss y C. Stasolla (2010). Modulation of embryo-forming capacity in culture through the expression of *Brassica* genes involved in the regulation of the shoot apical meristem. *Journal of Experimental Botany*, 61(14), 4069-4085.

El Ouakfaoui, S., J. Schnell, A. Abdeen, A. Colville, H. Labbé, S. Han, B. Baum, S. Laberge y B. Miki (2010). Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Molecular Biology*, 74(4-5), 313-326.

Feiler, H. S., T. Desprez, V. Santoni, J. Kronenberger, M. Caboche y J. Traas (1995). The higher plant *Arabidopsis thaliana* encodes a functional CDC48 homologue which is highly expressed in dividing and expanding cells. *The EMBO Journal*, 14(22), 5626.

Feher A., T. P. Pasternak y D. Dudits (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74(3), 201-228.

Florez, S. L., R. L. Erwin, S. N. Maximova, M. J. Gultinan y W. R. Curtis (2015). Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous *BABY BOOM* transcription factor. *BMC Plant Biology*, 15(1), 1.

Gallois, J. L., C. Woodward, G. V. Reddy y R. Sablowski (2002). Combined *SHOOT MERISTEMLESS* and *WUSCHEL* trigger ectopic organogenesis in *Arabidopsis*. *Development*, 129(13), 3207-3217.

Gatz, C. (1997). Chemical control of gene expression. *Annual Review of Plant Biology*, 48(1), 89-108.

Gatz, C., y I. Lenk (1998). Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science*, 3(9), 352-358.

- Gaj, M. D., S. Zhang, J. J. Harada y P. G. Lemaux (2005) Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222(6), 977-988.
- Gazzarrini S., Y. Tsuchiya, S. Lumba, M. Okamoto y P. McCourt (2004). The transcription factor *FUSCA3* controls developmental timing in *Arabidopsis* through the hormones gibberellin and abscisic acid. *Developmental Cell*, 7(3), 373-385.
- Ge, X., F. Chang, y H. Ma (2010). Signaling and transcriptional control of reproductive development in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 20(22), R988-R997.
- Gianazza E., P. De Ponti, A. Scienza, P. Villa y L. Martinelli (1992). Monitoring by two dimensional electrophoresis somatic embryogenesis in leaf and petiole explants from *Vitis*. *Electrophoresis*, 13(1), 203-209.
- Gou, X., K. He, H. Yang, T. Yuan, H. Lin, S. Clouse, y J. Li (2010). Genome-wide cloning and sequence analysis of leucine-rich repeat receptor-like protein kinase genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, 11(1), 19.
- Gou, X., H. Yin, K. He, J. Du, J. Yi, S. Xu y J. Li (2012). Genetic evidence for an indispensable role of somatic embryogenesis receptor kinases in brassinosteroid signaling. *PLoS Genetics*, 8(1).
- Guzzo, F., B. Baldan, P. Mariani, F. L. Schiavo y M. Terzi (1994). Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *Journal of Experimental Botany*, 45(10), 1427-1432.
- Harding, E.W., W. Tang, K. W. Nichols, D. E. Fernandez y S. E. Perry (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of *AGAMOUS-Like 15*. *Plant Physiology*, 133(2), 653-663.
- He, K., X. Gou, T. Yuan, H. Lin, T. Asami, S. Yoshida, y J. Li (2007). BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-

death pathways. *Current Biology*, 17(13), 1109-1115.

Hecht, V., J. P. Vielle-Calzada, M. V. Hartog, E. D. Schmidt, K. Boutilier, U. Grossniklaus y S. C. de Vries (2001). *The Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127(3), 803-816.

Heidmann, I., B. De Lange, J. Lambalk, G. C. Angenent y K. Boutilier (2011). Efficient sweet pepper transformation mediated by the *BABY BOOM* transcription factor. *Plant Cell Reports*, 30(6), 1107-1115.

Henderson, J. T., H. C. Li, S. D. Rider, A. P. Mordhorst, J. Romero-Severson, J. C. Cheng, J. Robey, Z. R. Sung, S. C. de Vries y J. Ogas (2004). PICKLE acts throughout the plant to repress expression of embryonic traits and may play a role in gibberellin-dependent responses. *Plant Physiology*, 134(3), 995-1005.

Horstman, A., V. Willemsen, K. Boutilier y R. Heidstra (2014) AINTEGUMENTA-LIKE proteins: hubs in a plethora of networks. *Trends plant science*, 19(3), 146-157.

Hjortswang, H. I., A. S. Larsson, G. Bharathan, P. V. Bozhkov, S. von Arnold y T. Vahala, (2002). *KNOTTED1-like* homeobox genes of a gymnosperm, Norway spruce, expressed during somatic embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40(10), 837-843.

Ikeda-Iwai, M., M. Umehara, S. Satoh y H. Kamada (2003). Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 34(1), 107-114.

Ikeda, M., M. Umehara y H. Kamada (2006). Embryogenesis-related genes; its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23(2), 153-161.

Ishige, F., M. Takaishi, R. Foster, N. H. Chua y K. Oeda (1999). A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high levels of constitutive expression in dicot and

-
- monocot. *The Plant Journal*, 18(4), 443-448.
- Ivanova, A., M. Velcheva, P. Denchev, A. Atanassov y H. Van Onckelen (1994). Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*. *Physiologia Plantarum*, 92(1), 85-89.
- Jaillais, Y., Y. Belkhadir, E. Balsemão-Pires, J. L. Dangl y J. Chory (2011). Extracellular leucine-rich repeats as a platform for receptor/coreceptor complex formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8503-8507.
- Jia G., X. Liu, H. A. Owen y D. Zhao (2008). Signaling of cell fate determination by the TPD1 small protein and EMS1 receptor kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(6), 2220-2225.
- Jiménez, V. M. (2005). Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47(2-3), 91-110.
- Jiménez, V. M., y F. Bangerth, F. (2001a). Endogenous hormone concentrations and embryogenic callus development in wheat. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 67(1), 37-46.
- Jiménez, V. M., y F. Bangerth (2001b). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiologia Plantarum*, 111(3), 389-395.
- Jiménez, V. M., y F. Bangerth (2001c). Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Science*, 160(2), 247-257.
- Jin, F., L. Hu, D. Yuan, J. Xu, W. Gao, L. He y X. Zhang (2013). Comparative transcriptome analysis between somatic embryos (SEs) and zygotic embryos in

CAPÍTULO II

- cotton: evidence for stress response functions in SE development. *Plant Biotechnology Journal*, 12(2), 161-173.
- John C. y S. P. Gerald (2007). The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytologist*, 176(3), 511-536.
- Johnson, L. N., M. E. M. Noble y D. J. Owen (1996). Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell*, 85(2), 149-158.
- Junker, A., G. Mönke, T. Rutten, J. Keilwagen, M. Seifert, T. M. N. Thi, J. Renou, S. Balzergue, P. Viehöver, U. Hähnel, J. Ludwig-Müller, L. Altschmied, U. Conrad, B. Weisshaar y H. Bäumlein (2012). Elongation-related functions of *LEAFY COTYLEDON1* during the development of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 71(3), 427-442.
- Jyothishwaran, G., D. Kotresha, T. Selvaraj, S. H. Srideshikan, P. K. Rajvanshi y C. Jayabaskaran (2007). A modified freeze-thaw method for efficient transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Current Science*, 93(6), 770-772.
- Kamada, H, K. Ishikawa, H. Saga y H. Harada (1993). Induction of somatic embryogenesis in carrot by osmotic stress. *Plant Tissue culture letters*, 10(1), 38-44.
- Karlova, R., S. Boeren, E. Russinova, J. Aker, J. Vervoort y S. C. de Vries (2006). The *Arabidopsis* *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1* protein complex includes *BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1*. *The Plant Cell*, 18(3), 626-638.
- Karlova, R. B. (2008). *The SERK1 protein complexes*. Tesis de Doctorado, Wageningen Universiteit. The Netherlands, pp. 89-113.
- Karlova, R., S. Boeren, W. van Dongen, M. Kwaaitaal, J. Aker, J. Vervoort, y S. C. de Vries (2009). Identification of *in vitro* phosphorylation sites in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor-like kinases. *Proteomics*, 9(2), 368-379.
- Kiss-Papp, M. (2014). The role of BRI1-associated kinase 1 (BAK1) in the regulation of plant innate immunity: functional and genetic characterization of BAK1
-

-
- overexpression in *Arabidopsis thaliana*. Tesis de Doctorado. University of Basel. Basel, Switzerland, pp. 53-128.
- Komamine, A., M. Matsumoto, M. Tsukahara, A. Fujiwara, R. Kawahara, M. Ito, K. Nomura y T. Fujimura (1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures-physiology, biochemistry and molecular biology. In *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, Nijkamp, H. J. J., L. H. W. Van Der Plas, A. Van Aartrijk (eds). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 307-313.
- Krikorian, A.D. y L. K. Simola (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiologia Plantarum*, 105(2), 347-354.
- Kwaaitaal, M. (2007). *SERK1 links somatic embryogenesis to brassinosteroid signalling*. Doctoral dissertation, Wageningen Universiteit. The Netherlands, pp. 115-125.
- Kwaaitaal, M. A., y S. C. de Vries (2007). The SERK1 gene is expressed in procambium and immature vascular cells. *Journal of Experimental Botany*, 58(11), 2887-2896.
- Larsson, E., F. Sitbon y S. von Arnold (2012). Differential regulation of Knotted1-like genes during establishment of the shoot apical meristem in Norway spruce (*Picea abies*). *Plant Cell Reports*, 31(6), 1053-1060.
- Laux T., K. F. Mayer, J. Berger y G. Jürgens (1996). The *WUSCHEL* gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development*, 122(1), 87-96.
- Ledwo , A., y M. D. Gaj (2011). *LEAFY COTYLEDON1*, *FUSCA3* expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regulation*, 65(1), 157-167.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. 3^{ra}. edición revisada y aumentada. San José, Costa Rica, IICA. pp. 350-360.
- Leroy, T., E. Alpizar, M. Dufour y H. Etienne (2007). *Coffea (Coffea ssp.)* In: *Agrobacterium Protocols*, Kan, Wang (eds). Humana Press Inc., Totowa, N. J. 2:344.

pp. 191-207.

- Lewis, M. W., M. E. Leslie, E. H. Fulcher, L. Darnielle, P. N. Healy, J. Y. Youn y S. J. Liljegren (2010). The SERK1 receptor-like kinase regulates organ separation in *Arabidopsis* flowers. *The Plant Journal*, 62(5), 817-828.
- Li J, J. Wen, K. A. Lease, J. T. Doke, F. E. Tax y J. C. Walker (2002). BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell*. 110(2), 213-222.
- Long, J. A., E. I. Moan, J. I. Medford y M. K. Barton (1996). A member of the *KNOTTED* class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature*, 379(6560), 66.
- Lotan, T., M. Ohto, K. M. Yee, M. A. West, R. Lo, R. W. Kwong, K. Yamagishi, R. L. Fischer, R. B. Goldberg, J. J. Harada (1998). *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, 93(7), 1195-1205.
- Luerssen, H., V. Kirik, P. Herrmann y S. Misera (1998). *FUSCA3* encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 15(6), 755-764.
- Ma, J., Y. He, C. Wu, H. Liu, Z. Hu y G. Sun (2012). Cloning and molecular characterization of a SERK gene transcriptionally induced during somatic embryogenesis in *Ananas comosus* cv. Shenwan. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30(1), 195-203.
- Mahdavi-Darvari, F., N. M. Noor y I. Ismanizan (2014). Epigenetic regulation and gene markers as signals of early somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(2), 407-422.
- Mantiri, F. R., S. Kurdyukov, S. K. Chen y R. J. Rose (2008a). The transcription factor *MtSERF1* may function as a nexus between stress and development in somatic
-

embryogenesis in *Medicago truncatula*. *Plant Signaling & Behavior*, 3(7), 498-500.

Mantiri, F. R., S. Kurdyukov, D. P. Lohar, N. Sharopova, N. A. Saeed, X. D. Wang, A. V. Kathryn y R. J. Rose (2008). The transcription factor *MtSERF1* of the ERF subfamily identified by transcriptional profiling is required for somatic embryogenesis induced by auxin plus cytokinin in *Medicago truncatula*. *Plant Physiology*, 146(4), 1622-1636.

Matthys-Rochon, E. (2005). Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a mini-review. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47(1), 23-29.

Mayer, K. F., H. Schoof, A. Haecker, M. Lenhard, G. Jürgens y T. Laux (1998). Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the Arabidopsis shoot meristem. *Cell*, 95(6), 805-815.

Meng, X., J. Zhou, J. Tang, B. Li, V. M. de Oliveira, J. Chai, P. He y L. Shan (2016). Ligand-induced receptor-like kinase complex regulates floral organ abscission in Arabidopsis. *Cell Reports*, 14(6), 1330-1338.

Meinke, D. W. (1992). A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science*, 258(5088), 1647-1651.

Meinke, D. W., L. H. Franzmann, T. C. Nickle y E. C. Yeung (1994). Leafy cotyledon mutants of Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6(8), 1049-1064.

Michalczuk, L., y P. Druart (1999). Indole-3-acetic acid metabolism in hormone-autotrophic, embryogenic callus of Inmil® cherry rootstock (*Prunus incisa* x *serrula* 'GM 9') and in hormone-dependent, nonembryogenic calli of *Prunus incisa* x *serrula* and *Prunus domestica*. *Physiologia Plantarum*, 107(4), 426-432.

Miguel C. y L. Marum (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany*, 62(11), 3713-3725.

Mordhorst, A. P., K. J. Voerman, M. V. Hartog, E. A. Meijer, J. van Went, M. Koornneef, y S. C. de Vries (1998). Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated

CAPÍTULO II

by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics*, 149(2), 549-563.

Morillo, S. A. y F. E. Tax (2006). Functional analysis of receptor-like kinases in monocots and dicots. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 460-469.

Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473-497.

Nam K. H. y J. Li (2002). BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*, 110(2), 203-212.

Neelakandan, A. K. y K. Wang (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant Cell Reports*, 31(4), 597-620.

Nic-Can G. I., A. Lopez-Torres, F. Barredo-Pool, K. Wrobel, V. M. Loyola-Vargas, R. Rojas-Herrera, C. De-la-Peña (2013). New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PloS One*, 8(8): e72160

Nodine, M. D., A. C. Bryan, A. Racolta, K. V. Jerosky, y F. E. Tax (2011). A few standing for many: embryo receptor-like kinases. *Trends in Plant Science*, 16(4), 211-217.

Nolan, K. E., R. R. Irwanto y R. J. Rose (2003). Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. *Plant Physiology*, 133(1), 218-230.

Nolan, K. E., S. Kurdyukov y R. J. Rose (2009). Expression of the *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 (SERK1)* gene is associated with developmental change in the life cycle of the model legume *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 60(6), 1759-1771.

Nomura, K. y A. Komamine (1985). Identification and isolation of single cells that produce

- somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiology*, 79(4), 988-991.
- Nowak, K. y M. D. Gaj (2016). Transcription Factors in the Regulation of Somatic Embryogenesis. In *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, Loyola-Vargas V. M., Ochoa-Alejo N. (eds) Springer International Publishing, pp. 53-79.
- Ogas J., S. Kaufmann, J. Henderson y C. Somerville (1999). *PICKLE* is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(24), 13839-13844.
- Osakabe, Y., K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki y L. S. P. Tran (2013). Sensing the environment: key roles of membrane-localized kinases in plant perception and response to abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 64(2), 445-458.
- Pandey, D. K. y B. Chaudhary (2014). Oxidative Stress Responsive SERK1 Gene Directs the Progression of Somatic Embryogenesis in Cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Coker 310). *American Journal of Plant Sciences*, 5(1), 80.
- Parcy, F., C. Valon, A. Kohara, S. Miséra y J. Giraudat (1997). The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *The Plant Cell*, 9(8), 1265-1277.
- Pérez-Núñez, M. T., R. Souza, L. Sáenz, J. L. Chan, J. J. Zuniga-Aguilar y C. Oropeza (2009). Detection of a SERK-like gene in coconut and analysis of its expression during the formation of embryogenic callus and somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 28(1), 11-19.
- Pérez-Pascual Daniel (2013). Aislamiento del ADNc de SERK1 de *Coffea canephora* L. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. México. pp. 45-57.

CAPÍTULO II

- Perry, S. E., M. D. Lehti, D. E. Fernández (1999). The MADS-domain protein AGAMOUS-like 15 accumulates in embryonic tissues with diverse origins. *Plant Physiology*, 120(1), 121-130.
- Pinon, V., K. Prasad, S. P. Grigg, G. F. Sanchez-Perez y B. Scheres (2013). Local auxin biosynthesis regulation by PLETHORA transcription factors controls phyllotaxis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(3), 1107-1112.
- Pullman, G. S., Y. Zhang y B. H. Phan (2003). Brassinolide improves embryogenic tissue initiation in conifers and rice. *Plant Cell Reports*, 22(2), 96-104.
- Quiroz-Figueroa, F. R., C.F.J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20(12), 1141-1149.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R., Rojas-Herrera, R., M., Galaz-Avalos, V., M., Loyola-Vargas (2006a). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86(3), 285-301.
- Quiroz-Figueroa F., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2006b). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant tissue culture protocols 2nd edition*, Serie: Methods in molecular biology, vol. 318, Loyola Vargas V. M. y Vázquez-Flota F. (eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, EEUU, pp. 111- 117.
- Rani, A. R., V. D. Reddy, B. P. Prakash y G. Padmaja (2005). Changes in protein profiles associated with somatic embryogenesis in peanut. *Biología Plantarum*, 49(3), 347-354.
- Reinert, J. (1959). Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebe kulturen aus Karotten. *Planta* 53(4), 318-333.
- Rienties, I. M. (2003). Proteins interacting with the *Arabidopsis thaliana* Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase 1. Doctoral dissertation. Wageningen
-

Universiteit. The Netherlands, pp.62-131.

- Rienties, I. M., J. Vink, J. W. Borst, E. Russinova y S. C. de Vries (2005). The Arabidopsis SERK1 protein interacts with the AAA-ATPase AtCDC48, the 14-3-3 protein GF14 and the PP2C phosphatase KAPP. *Planta*, 221(3), 394-405.
- Rodríguez-Piña, Alma Laura (2013). Determinación del efecto de compuestos secretados al medio de cultivo por explantes de *Coffea arabica* en la inducción de la embriogénesis somática. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mexico. pp. 65-66.
- Rose, R. J., E. Nolan y L. Bicego (1999). The development of the highly regenerable seed line Jemalong 2HA for transformation of *Medicago truncatula*: implications for regenerability via somatic embryogenesis. *Journal of Plant Physiology*, 155(6), 788-791.
- Rose, R. J., F. R. Mantiri, S. Kurdyukov, S. K. Chen, X. D. Wang, K. E. Nolan, y M. B. Sheahan (2010). Developmental biology of somatic embryogenesis. In *Plant developmental biology-biotechnological perspectives*. Springer Berlin Heidelberg. pp. 3-26.
- Roux, M. y C. Zipfel (2012). Receptor Kinase Interactions: Complexity of Signalling. In: Tax F., Kemmerling B. (eds). *Receptor-like Kinases in Plants*. Signaling and Communication in Plants, vol 13. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 145-172.
- Sagare, A. P., Y. L. Lee, T. C. Lin, C. C. Chen y T. H. Tsay (2000). Cytokinin induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Corydalis yanhusuo* (Fumariaceae)-a medicinal plant. *Plant Science*, 160(1), 139-147.
- Santiago, J., C. Henzler y M. Hothorn (2013). Molecular mechanism for plant steroid receptor activation by somatic embryogenesis co-receptor kinases. *Science*, 341(6148), 889-892.

CAPÍTULO II

- Sánchez, J. P. y N. H. Chua (2001). Arabidopsis PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *The Plant Cell*, 13(5), 1143-1154.
- Sánchez, J. P., P. Duque y N. H. Chua (2004). ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA responsive genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 38(3), 381-395.
- Salaj, J., I. R. von Recklinghausen, V. Hecht, S. C. de Vries, J. H. Schel, y A. A. van Lammeren (2008). *AtSERK1* expression precedes and coincides with early somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(7), 709-714.
- Savona, M., R. Mattioli, S. Nigro, G. Falasca, F. Della Rovere, P. Costantino, S. C. De vries, B. Ruffani, M. trovato y M. M. Altamura, M. M. (2012). Two SERK genes are markers of pluripotency in *Cyclamen persicum* Mill. *Journal of Experimental Botany*, 63(1), 471-488.
- Senger, S., H. P. Mock, U. Conrad y R. Manteuffel (2001). Immunomodulation of ABA function affects early events in somatic embryo development. *Plant Cell Reports*, 20(2), 112-120.
- Somleva M. N., E. D. L. Schmidt y S. C. de Vries (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Reports*, 19(7), 718-726.
- Sorrell, D. A., A. M. Marchbank, D. A. Chrimes, J. R. Dickinson, H. J. Rogers, D. Francis, C. S. Grierson y N. G. Halford (2003). The Arabidopsis 14-3-3 protein, GF14omega, binds to the *Schizosaccharomyces pombe* Cdc25 phosphatase and rescues checkpoint defects in the rad24-mutant. *Planta*, 218(1), 50-57.
- Su, Y. H., X. Y. Zhao, Y. B. Liu, C. L. Zhang, S. D. O'Neill y X. S. Zhang (2009). Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59(3), 448-460.
-

- Suzuki, M., H. H. Y. Wang y D. R. McCarty (2007). Repression of the *LEAFY COTYLEDON 1/B3* regulatory network in plant embryo development by *VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3* genes. *Plant Physiology*, 143(2), 902-911.
- Schmidt, E. D., F. Guzzo, M. A. Toonen y S. C. de Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124(10), 2049-2062.
- Schrack K, S. Fujioka, S. Takatsuto, Y. D. Stierhof, H. Stransky, S. Yoshida y G. Jurgens (2004). A link between sterol biosynthesis, the cell wall, and cellulose in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 38(2), 227-243.
- Shah, K., T. W. Gadella Jr, H. van Erp, V. Hecht y S. C. de Vries (2001a). Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. *Journal of Molecular Biology*, 309(3), 641-655.
- Shah, K., J. Vervoort y S. C. de Vries (2001b). Role of threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(44), 41263-41269.
- Shiu, S. H., W. M. Karlowski, R. Pan, Y. H. Tzeng, K. F. Mayer y W. H. Li (2004). Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The Plant Cell*, 16(5), 1220-1234.
- Sharma, S. K., S. Millam, I. Hein y G. J. Bryan (2008). Cloning and molecular characterisation of a potato SERK gene transcriptionally induced during initiation of somatic embryogenesis. *Planta*, 228(2), 319-330.
- Sharp, W. R., M. R. Sondhal, L. S. Caldas y G. B. Maraffa (1980). The physiological of *in vitro* asexual embryogenesis. *Horticultural Reviews*, 2, 268-310.
- Shiu, S. H., y A. B. Bleeker (2001). Receptor-like kinases from Arabidopsis form a

monophyletic gene family related to animal receptor kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10763-10768.

Smertenko, A. y P. V. Bozhkov (2014a). Somatic embryogenesis: life and death processes during apical–basal patterning. *Journal of Experimental Botany*, 65(5), 1343-1360.

Smertenko, A. y P. V. Bozhkov (2014b). The life and death signalling underlying cell fate determination during somatic embryogenesis. In: Nick P., Opatrny Z. (eds). *Applied Plant Cell Biology*. Plant Cell Monographs, vol 22. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 131-178.

Srinivasan C, Z. Liu, I. Heidmann, E. D. Supena, H. Fukuoka, R. Joosen, J. Lambalk, G. Angenent, R. Scorza, J. B. Custers, K. Boutilier (2007). Heterologous expression of the *BABY BOOM* AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta*, 225(2), 41-51

Stasolla, C., M. F. Belmonte, L. van Zyl, D. L. Craig, W. Liu, E. C. Yeung y R. R. Sederoff (2004). The effect of reduced glutathione on morphology and gene expression of white spruce (*Picea glauca*) somatic embryos. *Journal of Experimental Botany*, 55(397), 695-709.

Stenvik, G. E., N. M. Tandstad, Y. Guo, C. L. Shi, W. Kristiansen, A. Holmgren, S. E. Clark, R. B. Aalen y M. A. Butenko (2008). The EPIP peptide of *INFLORESCENCE DEFICIENT IN ABSCISSION* is sufficient to induce abscission in Arabidopsis through the receptor-like kinases HAESA and HAESA-LIKE2. *The Plant Cell*, 20(7), 1805-1817.

Steward, F. C., M. O. Mapes y K. Mears (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45(10), 705-708.

- Stone, S. L., L. W. Kwong, K. M. Yee, J. Pelletier, L. Lepiniec, R. L. Fischer, R. B. Goldberg, J. J. Harada (2001). *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(20), 11806-11811.
- Stone, S. L., S. A. Braybrook, S. L. Paula, L. W. Kwong, J. Meuser, J. Pelletier, T. Hsieh, R. L. Fischer, R. B. Goldberg y J. J. Harada (2008). Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON2* induces maturation traits and auxin activity: implications for somatic embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3151-3156.
- Taylor, M. G. y I. K. Vasil (1996). The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). *American journal of botany*, 83(1), 28-44.
- Thakare, D., W. Tang, K. Hill y S. E. Perry (2008). The MADS-domain transcriptional regulator *AGAMOUS-LIKE15* promotes somatic embryo development in Arabidopsis and soybean. *Plant Physiology*, 146(4), 1663-1672.
- To, A., C. Valon, G. Savino, J. Guillemot, M. Devic, J. Giraudat y F. Parcy (2006). A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *The Plant Cell*, 18(7), 1642-1651.
- Touraev, A., O. Vicente y E. Heberle-Bors (1997). Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends in Plant Science*, 2(8), 297-302.
- Thakare, D., W. Tang, K. Hill y S. E. Perry (2008). The MADS-domain transcriptional regulator *AGAMOUS-LIKE15* promotes somatic embryo development in Arabidopsis and soybean. *Plant Physiology*, 146(4), 1663-1672.
- Thibaud-Nissen, F., R. T. Shealy, A. Khanna y L. O. Vodkin (2003). Clustering of microarray data reveals transcript patterns associated with somatic embryogenesis in soybean. *Plant Physiology*, 132(1), 118-136.

CAPÍTULO II

- Tsuwamoto, R., S. Yokoi y Y. Takahata (2010). Arabidopsis *EMBRYOMAKER* encoding an AP2 domain transcription factor plays a key role in developmental change from vegetative to embryonic phase. *Plant Molecular Biology*, 73(4-5), 481-492.
- Van Hengel, A. J., Z. Tadesse, P. Immerzeel, H. Schols, A. Van Kammen, S. C. de Vries (2001). N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 125(4), 1880-1890.
- Villanueva-Alonzo, H. J. (2006). Aspectos bioquímicos y moleculares en el inicio de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. Tesis de maestría en ciencias y biotecnología de plantas. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C. México. pp. 69-78.
- Vogel, G. (2005). How does a single somatic cell become a whole plant?. *Science*, 309 (5731), 86-86.
- von Arnold, S. V., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. H. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 233-249.
- Waki, T., T. Hiki, R. Watanabe, T. Hashimoto y K. Nakajima (2011). The Arabidopsis RWP-RK protein RKD4 triggers gene expression and pattern formation in early embryogenesis. *Current Biology*, 21(15), 1277-1281.
- Wang, H., L. V. Caruso, A. B. Downie y S. E. Perry (2004). The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism. *The Plant Cell*, 16(5), 1206-1219.
- Wang, X., X. Li, J. Meisenhelder, T. Hunter, S. Yoshida, T. Asami, J. Chory (2005) Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental Cell*, 8(6), 855-865.
- Wang, X., Q. W. Niu, C. Teng, C. Li, J. Mu, N. H. Chua y J. Zuo (2009). Overexpression of *PGA37/MYB118* and *MYB115* promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Cell research*, 19(2), 224-235.
-

-
- West, M. A., K. M. Yee, J. Danao, J. L. Zimmerman, R. L. Fischer, R. B. Goldberg y J. J. Harada (1994). *LEAFY COTYLEDON1* is an essential regulator of late embryogenesis and cotyledon identity in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 6(12), 1731-1745.
- Williams, E. G., y G. Maheswaran (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57(4), 443-462.
- Wójcikowska, B., K. Jaskóła, P. G. siorek, M. Meus, K. Nowak y M. D. Gaj (2013). *LEAFY COTYLEDON2* (LEC2) promotes embryogenic induction in somatic tissues of Arabidopsis, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta*, 238(3), 425-40.
- Wu, K., G. Lu, P. Sehne y R. J. Ferl (1997a). The heterologous interactions among plant 14-3-3 proteins and identification of regions that are important for dimerization. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 339(1), 2-8.
- Wu, K., M. F. Rooney y R. J. Ferl (1997b). The Arabidopsis 14-3-3 multigene family. *Plant Physiology*, 114(4), 1421-1431.
- Wu, X. M., F. G. Li, C. J. Zhang, C. L. Liu y X. Y. Zhang (2009). Differential gene expression of cotton cultivar CCRI24 during somatic embryogenesis. *Journal of Plant Physiology*, 166(12), 1275-1283.
- Yang X. y X. Zhang (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 36-57.
- Yang, X. y X. Zhang (2011). Developmental and Molecular Aspects of Nonzygotic (Somatic) Embryogenesis. In: Trigiano R.N., Gray D.J. (eds). *Plant tissue culture, development, and biotechnology*, CRC Press. pp. 307-326.
- Yang, S.L., L. Jiang, C. S. Pua, L. F. Xie, X. Q. Zhang, L. Q. Chen, W. C. Yang y D. Ye (2005). Overexpression of *TAPETUM DETERMINANT1* alters the cell fates in the Arabidopsis carpel and tapetum via genetic interaction with *EXCESS MICROSPOROCTES1/EXTRA SPOROGENOUS CELLS*. *Plant*

Physiology, 139(1), 186-191.

Yang, S.L., L. F. Xie, H. Z. Mao, C. S. Puah, W. C. Yang, L. Jiang, V. Sundaresan y D. Ye (2003). *TAPETUM DETERMINANT1* is required for cell specialization in the Arabidopsis anther. *The Plant Cell*, 15(12), 2792-2804.

Yang, X., X. Zhang, D. Yuan, F. Jin, Y. Zhang y J. Xu (2012). Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biology*, 12(1), 110.

Yang, C., F. Bratzel, N. Hohmann, M. Koch, F. Turck y M. Calonje (2013). VAL-and AtBMI1-mediated H2Aub initiate the switch from embryonic to postgerminative growth in Arabidopsis. *Current Biology*, 23(14), 1324-1329.

Yeung, E. C. (1995). Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe T.A. (eds). *In Vitro Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 20. Springer, Dordrecht, The Netherlands. pp. 205-247.

Zhao, D. Z., G. F. Wang, B. Speal y H. Ma (2002). The *EXCESS MICROSPOROCYTES1* gene encodes a putative leucine-rich repeat receptor protein kinase that controls somatic and reproductive cell fates in the Arabidopsis anther. *Genes & Development*, 16(15), 2021-2031.

Zeng F. C., X. L. Zhang, L. F. Zhu, L. Tu, X. P. Guo y Y. C. Nie (2006). Isolation and characterization of genes associated to cotton somatic embryogenesis by suppression subtractive hybridization and Macroarray. *Plant Molecular Biology*, 60(2), 167-183.

- Zheng, Y., N. Ren, H. Wang, A. J. Stromberg y S. E. Perry (2009). Global identification of targets of the Arabidopsis MADS domain protein AGAMOUS-Like15. *The Plant Cell*, 21(9), 2563-2577.
- Zheng, Q., Y. Zheng y S. E. Perry (2013). *AGAMOUS-Like15* promotes somatic embryogenesis in Arabidopsis and soybean in part by the control of ethylene biosynthesis and response. *Plant Physiology*, 161(4), 2113-2127.
- Zhu, C., y S. E. Perry (2005). Control of expression and autoregulation of AGL15, a member of the MADS-box family. *The Plant Journal*, 41(4), 583-594.
- Zuo J. R., Q. W. Niu, G. Frugis y N. H. Chua (2002). The *WUSCHEL* gene promotes vegetative to embryonic transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 30(3), 349-359.
- Zuo, J. R., Q. W. Niu y N. H. Chua (2000). An estrogen receptor based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *The Plant Journal*, 24(2), 265-273.