



Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y MOLECULAR DE LA
REGULACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA VÍA
UBICUITINA-PROTEASOMA EN *Coffea canephora* PIERRE EX
A. FROEHNER

Tesis que presenta

EVELYN ARLETTE CARRILLO BERMEJO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2025

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Evelyn Arlette Carrillo Bermejo titulado **Análisis morfológico y molecular de la regulación de la embriogénesis somática vía ubiquitina-proteasoma en *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner**, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de investigación de metabolismo integrativo, en el laboratorio No. 22 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 31 de marzo de 2025

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de: Materiales y Métodos, Resultados y Discusión de este documento, proviene de las actividades de investigación 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 Federal de Protección a la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y se registrarán, en todo caso, por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Evelyn Arlette Carrillo Bermejo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY)** por permitirme el uso de sus instalaciones durante todo el posgrado. Al **la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI)** por la beca otorgada la cual, fue un gran apoyo en el posgrado.

Al **Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández** por haberme permitido realizar el posgrado en su laboratorio. Le agradezco todo el tiempo que dedico a mi crecimiento profesional.

A mi comité tutorial, sin duda fue perfecto. **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas** gracias por siempre orientarme y aconsejarme en cada tutorial. **Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota** gracias por las acertadas preguntas que realizaba en cada tutorial. **Dr. Geovanny I. Nic Can** gracias por los valiosos comentarios que enriquecieron el escrito y trabajo de doctorado.

M. en C. Ligia Guadalupe Brito Argáez y **Dra. Rosa María Galaz Avalos** gracias por ser seres de luz en el posgrado, fueron un pilar clave en este crecimiento personal y profesional.

M. en C. Silvia Andrade Canto y **M. en C. Felipe Alonso Barredo Pool** no tengo palabras para agradecer cada consejo y conocimiento que me brindaron durante el posgrado. Gracias.

Dra. Clelia De la Peña Seaman, **Dra. Blondy Beatriz Canto Canché**, **Enrique Castaño de la Serna**, **Luis Carlos Rodríguez Zapata**, **Dra. Elizabeth Ortiz Vázquez** y **M. en C. Miguel Ángel Herrera Alamillo** gracias por estar al pendiente de mi durante el posgrado. Fueron un invaluable apoyo moral.

Dra. Ana Quintana y **Dra. María José García** son maravillosas personas, gracias por estar en todas mis recaídas del posgrado. Por favor, colaboremos en el futuro.

Dr. Hugo Méndez, M. en C. Ariana Pérez, M. C. Pedro Quiam, M.C. Laura Fuentes, Ing. Marina Hernández, Ing. Monserrat Hernández e Ing. Valeria Vargas gracias por siempre escucharme y motivarme.

Dr. Luis Alfredo Herbert Doctor, estuviste desde el inicio de mi maestría y te mantuviste hasta el final de mi doctorado, fuiste revisor externo de esta tesis de doctorado y me apoyaste cada minuto de este posgrado.

También quiero dar un espacio para agradecer a las doctoras jubiladas, **Dra. Teresa Hernández Sotomayor** y a la **Dra. María de Lourdes Miranda Ham** gracias por los grandes consejos que me dieron antes y durante el posgrado

DEDICATORIAS

Este trabajo se lo dedico a mis padres quienes me han apoyado moral y económicamente en cada una de mis metas personales y profesionales.

Mamá **Prof. Nora Adela Bermejo Baeza** y papá **Ing. Agr. Ángel Javier Carrillo Palma**. ¡Gracias por darme tanto amor!

A mis hermanos **Nora Sará Carrillo Bermejo** y **Ángel Javier Carrillo Bermejo** quienes siempre me contagian su ambición profesional. Sé que pasan meses y hasta años sin vernos, pero los quiero y respeto mucho.

A mi prometido **Luis Alfredo Herbert Doctor** quien me sostuvo moralmente durante todo este posgrado. Luis te admiro mucho, sé que llegarás lejos y para arriba.

PRODUCTOS GENERADOS

I. Artículos científicos

1. Carrillo-Bermejo Evelyn A., Ligia Brito-Argáez, Rosa M. Galaz-Ávalos, Felipe Barredo-Pool, Víctor M. Loyola-Vargas, and Victor Aguilar-Hernández, PROTEIN PROFILE CHANGES DURING PRIMING EXPLANTS TO EMBRYOGENIC RESPONSE IN *Coffea canephora*: IDENTIFICATION OF THE RPN12 PROTEASOME SUBUNIT INVOLVED IN THE PROTEIN DEGRADATION, Peer J., 12: e18372, (2024). DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.18372>.
2. Carrillo-Bermejo Evelyn A., Ligia Brito-Argáez, Rosa M. Galaz-Ávalos, Felipe Barredo-Pool, Andrade- Canto S., Víctor M. Loyola-Vargas, and Victor Aguilar-Hernández, MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CELL DIFFERENTIATION PROGRAM IN THE SOMATIC EMBRYOGENESIS OF *Coffea canephora* PIERRE EX A. FROEHNER: THE PROTEASOME INHIBITION (en preparación).

3. Actividades de divulgación científica

2024 Actividades recreativas de ciencia, correspondientes al verano de la ciencia: Mi currículum científico, llevadas a cabo durante los días 18, 19, 22, 23 y 24 de julio del 2024 en el Centro de Capacitación y Educación Ambiental de la Reserva Ecológica Cuxtal, Molas, Yuc., Méx. Ciencia Cakotanú. Organizadora, coordinadora y facilitadora.

2024 Actividades recreativas de ciencia realizadas en el marco del "Día Internacional de la Mujer y la Niña en la Ciencia", llevadas a cabo el 9 de febrero del 2024 en el centro de Capacitación y Educación Ambiental de la Reserva Ecológica Cuxtal, Molas, Yuc., Méx. Ciencia Cakotanú. Organizadora y coordinadora.

2024 Actividades recreativas de ciencia realizadas en la Esc. Secundaria Rafael Matos Escobedo del municipio de Oxkutzcab, como parte del programa "Mi currículum científico", llevadas a cabo el 9 de abril del 2024 en Oxkutzcab, Yuc., Méx. Ciencia Cakotanú. Organizadora y Coordinadora.

2024 Seminario de estudiantes de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY. Realizado el martes 16 de julio en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Organizadora.

2024 Actividades recreativas de ciencia, CICY casa abierta. Realizado el día 24 de octubre en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Tallerista.

2023 4.to evento anual de charlas de divulgación científica 2023, mi tesis en 10 minutos, en el marco del Día Internacional de la Cultura Científica, llevado a cabo en modalidad virtual del 5 al 26 de octubre del 2023. Ciencia Cakotanú. Coordinadora y facilitadora.

2023 Presentación de la revista de divulgación científica Ciencia Cakotanú, durante el 3er congreso nacional y 1er congreso internacional de Agave mezcal "Hacia la sustentabilidad". Celebrado los días 28, 29 y 30 de septiembre del 2023, en Oaxaca, México. Ciencia Cakotanú. Presentadora en stand.

2023 Actividades recreativas de ciencia, correspondientes al verano de la ciencia: Mi currículum científico, llevadas a cabo durante los días 21, 24, 26, 28, 31 de julio y 1 de Agosto en el Centro de Capacitación y Educación Ambiental de la Reserva Ecológica Cuxtal, Molas, Yuc., Méx. Ciencia Cakotanú. Coordinadora y facilitadora.

2023 Actividades recreativas de ciencia, CICY casa abierta. Realizado el día 9 de noviembre en el Centro de Investigación Científica de Yucatán. Tallerista.

2023 Taller "Aventura científica ". Facilitadora del taller. 2 horas. Programa Aventura Científica en el marco del 15° aniversario del SIDETEY, realizado en los municipios de Tizimín, Tekax, Maxcanú, Umán y el Parque Científico Tecnológico de Yucatán, del 18 al 25 de mayo.

2023 Cuentacuentos: "Cuentos de laboratorio". Facilitadora del cuentacuentos. 1 hora. Undécima edición de la Feria Internacional de la Lectura Yucatán, llevada a cabo del 11 al 19 de marzo.

2023 Actividades recreativas de ciencia, realizadas durante la inauguración de la "Feria Artesanal y Cultural de la Palma Jipijapa", llevada a cabo el 27 de abril en Santa Cruz Ex Hacienda, Calkiní, Campeche, Méx. Ciencia Cakotanú. Facilitadora.

2023 Actividades recreativas de ciencia, realizadas durante la "Expo Foro Ambiental 2023", llevadas a cabo del 2 al 4 de junio del 2023 en el Centro de Convenciones Siglo XXI, Mérida, Yucatán, Méx. Ciencia Cakotanú. Facilitadora.

2023 Actividades recreativas de ciencia "Extrayendo ADN", "Corriendo por un lugar", "Conociendo las epífitas" realizadas en el marco del "Día Internacional de la Mujer y la Niña en la Ciencia", llevadas a cabo 10 de febrero en el centro de Capacitación y Educación Ambiental de la Reserva Ecológica Cuxtal, Molas, Yuc., Méx Ciencia Cakotanú. Organizadora y coordinadora.

2022 Cuenta cuentos "Juanito y su amigo plantae". Facilitadora del cuentacuentos. 1 hora. Programa internacional "After Festival, de la divulgación científica" en el marco del día internacional de la Cultura científica, SOMEDECYT, Divulgaciencia México, llevado a cabo el 1 de octubre vía plataforma Zoom.

2022 Evento anual de charlas "Mi tesis en 10 min" en el marco del día internacional de la Cultura científica, SOMEDECYT, Ciencia Cakotanú, llevado a cabo del 3 al 31 de octubre. Organizadora.

2022 Taller "Jugando con tus gases y la importancia de la Biodiversidad", realizado el día 18 de agosto con una duración de 2 horas. Talento CICY 2022- secundaria. Facilitadora del taller.

2022 Semana Nacional del Conocimiento Yucatán: Ciencias Básicas para el desarrollo sostenible, 2022. Realizada durante los días del 17 al 21 de octubre en el centro de Investigación Científica de Yucatán. Ponente y coordinadora.

2022 Seminario de estudiantes de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del CICY realizado el 14 y 15 de noviembre. Ponente.

2021 Presentación de trabajo "Patrimonio etnomédico y cultural de la Reserva ecológica de Cuxtal" en el 1er Foro de Proyectos y Acciones por la Reserva Ecológica Cuxtal.

Congresos

2022 [Evelyn Carrillo-Bermejo A.](#), Ligia Brito- Argáez, Rosa Galaz-Avalos, Víctor Loyola-Vargas y Víctor Aguilar-Hernández. **Morphological and molecular analysis of ES regulation via Ubiquitin-Proteasome in *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner.** XXXII Congreso Nacional de Bioquímica, del 16 – 21 de octubre de 2022, Mérida, Yucatán. Modalidad Cartel.

2024 Carrillo-Bermejo Evelyn A., Brito-Argáez Ligia G., Galaz-Ávalos Rosa M., Andrade-Canto Silvia, Barredo-Pool Felipe, Loyola-Vargas Víctor M., Aguilar-Hernández Victor. **Análisis morfológico y molecular de la regulación de la Embriogénesis Somática de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner: inhibición del Proteasoma 26S.** XLII Congreso Mexicano de Histología y XI Congreso Iberoamericano de Histología, del 02 – 04 de octubre del 2024. Mérida, Yucatán. Modalidad Oral.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. ANTECEDENTES	1
1.1. Mecanismos para degradar las proteínas.	1
1.1.1. Mecanismo de degradación de proteínas por la vía UPS.	2
1.1.2. Composición del proteasoma 26S.....	3
1.1.3. Inhibidores reversibles e irreversibles del proteasoma 26S y ejemplos de su uso en plantas.....	5
1.1.4. UPS en la regulación del crecimiento y expresión génica.....	8
1.2. Embriogénesis somática: aspectos morfológicos y moleculares.	9
1.2.1. Formación y desarrollo del embrión en la ES.....	11
1.2.2. Regulación molecular de la ES.	12
1.3. Sistema UPS en la Inducción de la ES.	13
1.3.1. Recapitulación de los antecedentes.....	15
JUSTIFICACIÓN.....	16
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	17
OBJETIVO GENERAL.....	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA REGIÓN 19S y 20S DEL PROTEASOMA 26S EN <i>Coffea canephora</i>	21
2.1 INTRODUCCIÓN.....	21
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.2.1. Identificación de genes que codifican proteínas de las subunidades alfa y beta del proteasoma en <i>Coffea canephora</i>	21

2.2.2. Análisis filogenético de los genes que codifican la región 19S y 20S del proteasoma 26S	22
2.3. RESULTADOS	22
2.3.1. Identificación de los genes que codifican las proteínas para las regiones 19S y 20S del proteasoma 26S en <i>C. canephora</i> .	22
2.3.2. Análisis filogenético de los genes que codifican para las proteínas de las regiones 19S y 20S del proteasoma 26S en <i>C. canephora</i> .	25
2.3. CONCLUSIONES	27
CAPÍTULO III: PERFIL PROTEÓMICO DE LA ES DE <i>C. canephora</i> EN CONDICIONES DE AUXINAS Y CITOCININAS	29
3.1. INTRODUCCIÓN	29
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	30
3.2.1. Preparación del material vegetal, inducción de la ES y conteo de embriones somáticos.	31
3.2.2. Preparación de muestras de proteínas para electroforesis bidimensional en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida	31
3.2.3. Electroforesis bidimensional en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida y análisis de imagen del gel.	32
3.2.4. Digestión de proteínas en gel e identificación mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem	32
3.2.5. Análisis Western blot	33
3.2.6. Análisis de secuencias y diseño de cebadores para <i>C. canephora</i>	34
3.2.7. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR).	34
3.3. RESULTADOS	35
3.3.1. Acondicionamiento de los explantes con NAA y KIN.	35

3.3.2. Análisis de electroforesis bidimensional en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (2D SDS-PAGE)	37
3.2.3. Análisis de la expresión relativa del RPN12 y western blot de los explantes -NAA-KIN o + NAA-KIN con el anticuerpo ubiquitina.....	42
3.4. DISCUSIÓN.....	44
3.5. CONCLUSIÓN.....	47
CAPÍTULO IV: ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS (ES) SOMÁTICA EN CONDICIONES DE INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA 26S.....	49
4.1. INTRODUCCIÓN	49
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	53
4.2.1. Preparación del material vegetal, inducción de la ES y germinación de los embriones.....	53
4.2.2. Tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor del proteasoma 26S MG-132.....	54
4.2.3. Experimento complementario al tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor del proteasoma 26S MG-132.....	54
4.2.4. Microscopía electrónica.....	55
4.2.5. Histología.....	55
4.2.6. Extracción de proteínas, electroforesis y Western Blot.....	56
4.2.8. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y expresión relativa del gen <i>PBA1</i> por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).	57
4.2.9. Análisis estadístico.....	58
4.3. RESULTADOS	58
4.3.1. Efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de inhibidor del proteasoma 26S MG-132 en la inducción de la ES.	58
4.3.2. Restauración de la frecuencia de producción de embriones globulares en la inducción de la ES de los explantes aliviados.....	61
4.3.3. Germinación de los embriones somáticos cotiledonares.	63
4.3.4. Participación del proteasoma 26S en el origen del embrión somático.....	65
4.3.5. Inhibición del proteasoma 26S a través de MG-132.	66

4.3.6. Análisis morfológico, histológico y de la movilización de reservas de la inducción de la ES.....	68
4.3.6.1.Análisis morfológico e histológico de la ES.....	68
4.3.6.2.Movilización de reservas durante inducción de la ES.....	74
4.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	80
4.4.1. Impacto del proteasoma 26S en la inducción de la ES y en la germinación de los embriones somáticos cotiledonares.	80
4.4.2. Impacto del proteasoma 26S en el origen del embrión somático.....	81
4.4.3. Impacto del proteasoma 26S en la progresión morfológica, histológica y en la movilización de reservas durante la inducción de la ES.....	82
CAPÍTULO V: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA ES.....	83
5.1. INTRODUCCIÓN	83
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	85
5.2.1. Preparación del material vegetal, inducción de la ES y germinación de los embriones.....	85
5.2.2. Tratamiento con el inhibidor del proteasoma 26S MG-132	86
5.2.3. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de expresión relativa de genes involucrado en la ES por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).....	87
5.3. RESULTADOS	89
5.3.1. Expresión de genes involucrados en la inducción de la ES.	89
5.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	96
5.4.1. Expresión de genes involucrados en la inducción de la ES.	96
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL.....	101
6.1. DISCUSIÓN GENERAL.....	101
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	103

7.1	CONCLUSIONES GENERALES	103
7.2	PERSPECTIVAS.....	103
	BIBLIOGRAFÍA	105

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Vías de degradación de proteínas en la célula eucariota.	2
Figura 1.2. Marcaje de proteínas por ubiquitinación.	3
Figura 1.3. Organización del proteasoma 26S.	5
Figura 1.4. Unión de MG-132 al proteasoma 26S.	8
Figura 1.5. Regulación transcripcional dependiente de auxina.	9
Figura 1.6. Diagrama esquemático aceptado de las fases del proceso de ES <i>in vitro</i>.	11
Figura 1.7. Desarrollo embrionario de la planta dicotiledónea <i>A. thaliana</i>.	12
Figura 1.8. Estrategia experimental general utilizada.	19
Figura 2.1. Árboles filogenéticos de las subunidades 20S del proteasoma de <i>A. thaliana</i> y <i>C. canephora</i>.	26
Figura 2.2. Árboles filogenéticos de las subunidades 19S del proteasoma de <i>A. thaliana</i> y <i>C. canephora</i>.	27
Figura 3.1. Morfología y rendimiento de las plantas +NAA-KIN y -NAA-KIN en la embriogénesis somática de <i>C. canephora</i>.	36
Figura 3.2. Imágenes de gel electroforesis bidimensional y análisis de las manchas con abundancia diferencial en los explantes de hoja cortada antes de cultivarse en medio líquido Yasuda en oscuridad.	38
Figura 3.3. Expresión relativa del gen <i>CcRPN12</i> y western blot de los conjugados de ubiquitina en plantas - NAA-KIN y + NAA-KIN.	43
Figura 4.2. Proceso morfológico de la inducción de la ES en <i>C. canephora</i>.	51
Figura 4.3. Histomorfología de las principales etapas de desarrollo de la inducción de la ES <i>in vitro</i> en <i>C. canephora</i>.	52

Figura 4.4. Esquema experimental del tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor del proteasoma 26S MG-132 en el proceso de la ES en <i>C. canephora</i>.....	54
Figura 4.5. Número de embriones somáticos producidos a partir de explantes tratados con y sin MG-132..	60
Figura 4.6. Frecuencia de los embriones en explantes aliviados.	62
Figura 4.7. Aspecto morfológico de los embriones somáticos de <i>C. canephora</i> germinando.....	64
Figura 4.8. Embriones globulares desarrollándose en explantes de <i>C. canephora</i>.....	66
Figura 4.9. Análisis de Western Blot y RT-qPCR en explantes tratados con 40 μM MG-132 y DMSO	67
Figura 4.10. Embriogénesis somática en explantes de <i>C. canephora</i> tratados con y sin 40 μM MG-132.	71
Figura 4.11. Análisis histológico de la ES en explantes de <i>C. canephora</i> tratados con y sin 40 μM MG-132.....	72
Figura 4.12. Resumen de los cambios morfológicos e histológicos observados en los explantes previamente tratados con 40 μM MG-132 y DMSO durante la inducción de la ES.....	73
Figura 4.13. Análisis histoquímico de la ES en explantes de <i>C. canephora</i> tratados con y sin 40 μM MG-132.....	76
Figura 4.14. Análisis histoquímico de la ES en explantes de <i>C. canephora</i> tratados con y sin 40 μM MG-132	79
Figura 5.1. Expresión de los genes <i>ARF5</i>, <i>YUC1</i>, <i>IPT1</i>, <i>LEC1</i>, <i>BBM1</i>, <i>WOX4</i> durante la inducción de la ES en <i>C. canephora</i>..	84
Figura 5.2. Esquema experimental para la toma de muestras durante la ES en <i>C. canephora</i>. S.....	86
Figura 5.3. Verificación de la calidad del ARN total.	90
Figura 5.4. Validación del oligo ACT2 y cálculo de la eficiencia de reacción.....	91

[Figura 5.5. Expresión de los genes *WOX4*, *LEC1*, *BBM1*, *FUS3*, *AGL15*, *ARF5*, *AHK1*, *IPT1* y *YUC1* durante la inducción de la ES en *C. canephora*.](#) 96

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Inhibidores utilizados para inactivar el proteasoma 26S.	6
Cuadro 2.1. Genes que codifican las subunidades alfa (α) y beta (β) del proteasoma 20S en <i>C. canephora</i>.	23
Cuadro 2.2. Tabla de los genes que codifican para las subunidades RPN y RPT del proteasoma 19S en <i>C. canephora</i>.	24
Cuadro 3.1. Lista de proteínas con abundancia diferencial identificadas por LC-MS/MS.	38
Cuadro 4.1. Secuencias de los cebadores específicas de genes utilizadas para la amplificación semi-cuantitativa por RT-qPCR en tiempo real.	58
Cuadro 4.2. Número de embriones cotiledonares producidos a partir de explantes tratados con y sin MG-132.	60
Cuadro 5.1. Secuencias de los cebadores específicos para los genes analizados mediante RT-qPCR en tiempo real.	88

ABREVIACIONES

ES: embriogénesis somática

EC: embriogénesis cigótica

MS: medio Murashige y Skoog

RCV: reguladores del crecimiento vegetal

ABA: ácido abscísico

AUX: auxina

AIA: ácido indol-3-acético

CNE: callo no embriogénico

CE: callo embriogénico

UPS: vía ubiquitina-proteasoma

Ub: ubiquitina

ANA: Ácido 1-Naftalenacético

BA: benciladenina

AIA: ácido Indolacético

KIN: kinetina

RT-qPCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa en tiempo real.

RESUMEN

La vía ubiquitina-proteasoma (UPS) es una de las principales rutas de degradación de proteínas de vida corta y media en células eucariotas. En plantas, la percepción y señalización de reguladores del crecimiento (RCV) es modulada por la vía UPS. Los RCV intervienen en la embriogénesis somática (ES). Durante la ES se ha observado la expresión de genes y acumulación de proteínas relacionadas con factores de transcripción, transporte y síntesis de RCV (auxinas y citocininas) que son clave para la conversión de la célula somática a célula embriónica y la formación del embrión. Se han reportado proteínas responsables de la cascada de ubiquitinación y subunidades del proteasoma 26S durante la inducción de la ES pero, se desconoce el papel de la vía UPS en la inducción de la ES. Por lo tanto, en este trabajo, se bloqueó la actividad del proteasoma 26S con el inhibidor MG-132 durante la diferenciación celular asociada a la ES y promovida por auxina y citocinina de *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner. Se evaluaron los cambios morfológicos y moleculares durante la ES. Los resultados mostraron que los explantes de hoja, pretratados con MG-132 inducen y maduran embriones somáticos, pero presentan un retraso y reducción en el número de centros meristemáticos, respecto a los testigos, sin este tratamiento. Por otro lado, los embriones resultantes de los explantes de hoja pretratados con MG-132 mostraron una conversión más eficiente de globulares a embriones cotiledonares. Estos embriones presentaron una bifurcación temprana del procambium y dieron lugar a una raíz con mayor longitud, respecto a los testigos, sin este tratamiento. A nivel molecular, se observó que el tratamiento con MG-132 alteró los patrones de expresión de los genes *WOX4*, *LEC1*, *BBM1*, *AGL15*, *ARF5*, *AHK1*, *YUC1* e *IPT1*. Adicionalmente, los patrones de expresión de los genes *YUC1* e *IPT1* fueron los más afectados por MG-132, lo que sugiere una conexión entre el proteasoma 26S y la síntesis de auxinas y citocininas. Lo anterior sugiere que el proteasoma 26S está implicado en el programa de diferenciación celular en ES de *C. canephora*.

ABSTRACT

The ubiquitin-proteasome pathway (UPS) is one of the main pathways for degrading short- and medium-lived proteins in eukaryotic cells. In plants, the perception and signaling of plant growth regulators (PGR) are modulated by the UPS pathway. PGRs are involved in somatic embryogenesis (SE). During SE, gene expression and accumulation of proteins related to transcription factors, as well as the transport and synthesis of growth regulators (auxins and cytokinins) that are key for somatic cell to embryogenic cell conversion and embryo formation, have been observed. Proteins responsible for the ubiquitination cascade and 26S proteasome subunits during SE induction have been reported, but the role of the UPS pathway in SE induction is unknown. Therefore, in this work, 26S proteasome activity was blocked with the inhibitor MG-132 during auxin- and cytokinin-promoted cell differentiation in *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner ES. Morphological and molecular changes during ES were evaluated. The results showed that leaf explants, pre-treated with MG-132-induced and matured somatic embryos, presented a delay and reduction in the number of meristematic centers. On the other hand, embryos showed a more efficient conversion from globular to cotyledonary embryos. These embryos showed early bifurcation of the procambium and gave rise to a longer root. At the molecular level, it was observed that MG-132 alters the expression patterns of *WOX4*, *LEC1*, *BBM1*, *AGL15*, *ARF5*, *AHK1*, *YUC1* and *IPT1* genes. Additionally, the expression patterns of *YUC1* and *IPT1* genes were most affected by MG-132, suggesting a connection between the 26S proteasome and auxin and cytokinin synthesis. This suggests that the proteasome is involved in the cell differentiation program in SE of *C. canephora*.

INTRODUCCIÓN

La síntesis y degradación de proteínas son dos interruptores que controlan la expresión génica en la célula vegetal y la disponibilidad de proteínas (Ng, 2020). La síntesis y degradación de proteínas dependen del estadio de desarrollo de las plantas (Nelson et al., 2014). Una de las vías de degradación de proteínas más importantes de las células eucariotas es la vía proteasomal. Esta vía inicia con la ubiquitinación de las proteínas a degradar, mediante la adición covalente de proteínas tipo ubiquitina. Posteriormente, las proteínas poliubiquitinadas son captadas por el proteasoma 26S y degradadas. De acuerdo con lo anterior, la vía proteasomal es conocida como la vía ubiquitina-proteasoma (UPS) (Kurepa y Smalle, 2008). Actualmente, se ha reportado que la vía UPS modula el desarrollo de las plantas mediante la percepción y señalización de reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Por esta razón, las investigaciones que involucran la vía UPS se han centrado en procesos de desarrollo de la planta, valiosas por su aplicación a la biotecnológica de la embriogénesis somática (ES).

La ES es un proceso que puede ocurrir tanto en la naturaleza como en el laboratorio bajo condiciones controladas (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016; Quiroz-Figueroa et al., 2006). Bajo condiciones de laboratorio, la ES consiste en cultivar células somáticas en las condiciones adecuadas para dar lugar a células embriogénicas. Posteriormente, las células embriogénicas pasan por un proceso morfofisiológico que produce embriones somáticos y finalmente plantas completas. Se ha reportado que diferentes RCV, como auxinas y citocininas, juegan un papel esencial en la regulación de la ES. De manera similar, en diferentes investigaciones se ha reportado que las auxinas y/o citocininas exógenas durante la primera etapa de inducción de la ES juega un papel clave en la regulación genética de una célula que provoca su transformación en embrión. Esto sugiere que el estudio de la ES serviría para optimizar los sistemas biotecnológicos de regeneración vegetal (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016).

Por otro lado, se conoce que la expresión de genes y acumulación de proteínas involucradas en la síntesis y transporte de RCV, y genes que codifican a proteínas factores de transcripción, son esenciales para que ocurra la ES (Avilez-Montalvo et al., 2022; Méndez-Hernández et al., 2019; Wójcikowska & Gaj, 2017a). Por lo que el estudio del patrón de expresión de estos, y su acumulación a nivel de proteína bajo diferentes condiciones de la ES, es clave para comprender y optimizar la eficiencia de esta (Elhiti et al., 2013). El uso de herramientas de RT-PCR han permitido observar el patrón de expresión de genes en condiciones óptimas y no óptimas durante la inducción de la ES.

Por otra parte, la ES puede darse a través de dos rutas: embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta. En la ES indirecta se producen callos (tejido desorganizado y desdiferenciado) y posteriormente se forman células embrionarias que producirán embriones. Por otro lado, en la ES directa los embriones somáticos se forman en la superficie del explante vegetal, sin pasar previamente por callos (Quiroz-Figueroa et al., 2006). En ambas rutas la correcta regulación génica, es muy importante para un eficiente y exitoso protocolo de ES. Sin embargo, en la ES directa se considera que las células somáticas, una vez reprogramadas y convertidas en células embriogénicas, se convertirán en embriones (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Debido a ello, se podría sugerir que esta ruta comprende una regulación génica más compleja que en la ES indirecta.

No obstante, actualmente, se desconoce de qué manera la vía UPS pudiera estar interviniendo, mediante la degradación de proteínas, en la regulación de la expresión genes involucrados en la ES para la óptima inducción de la ES. No obstante, interesantemente se han encontrado proteínas del proteasoma 26S en condiciones óptimas y no óptimas para la inducción de la ES sugiriendo que el proteasoma puede estar regulando de una manera positiva o negativa la ES (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018). Esto ha despertado nuestro interés para estudiar la regulación morfológica y molecular de la inducción de la ES vía UPS en caféto (*Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner).

CAPÍTULO I. ANTECEDENTES

1.1. Mecanismos para degradar las proteínas.

Las plantas a lo largo de su desarrollo sintetizan y degradan proteínas que regulan diferentes genes necesarios para sus procesos biológicos. La síntesis y degradación de proteínas está sujeta a las etapas de desarrollo y al estímulo ambiental al que está sometida la planta (Nelson et al., 2014). Una regulación incorrecta de la acumulación de las proteínas ocasiona desequilibrios metabólicos, estrés proteotóxico e inhibición de procesos celulares (Vierstra, 1993a). Para modular esta regulación, las plantas, como otros organismos vivos, han desarrollado mecanismos de degradación proteolítica.

La proteólisis se puede llevar a cabo por tres vías diferentes: por la acción de las proteasas, la autofagia o en el proteosoma (Vierstra, 1993b). Las proteasas se descubrieron a principios de 1900, no requieren de adenosina trifosfato (ATP) para hidrolizar los péptidos y son específicas para ciertas secuencias de aminoácidos. Las proteasas pueden clasificarse de acuerdo con el sitio donde se escinden los péptidos blanco. Las endopeptidasas escinden aminoácidos no terminales de la proteína, mientras que las exopeptidasas cortan los aminoácidos terminales de la proteína. Por ejemplo, la tripsina que es una endopeptidasa corta cerca de residuos de lisina y arginina, pero no si un residuo de prolina está en el lado carboxilo del sitio de escisión. Las caspasas en cambio tienen la capacidad de escindir los péptidos en un residuo del ácido aspártico (Palma et al., 2002). A su vez, las exopeptidasas se dividen en aminopeptidasas y carboxipeptidasas, las cuales pueden cortar péptidos blanco en el extremo N-terminal y C-terminal, respectivamente (Palma et al., 2002).

Por otro lado, entre 1955 y 1966 se descubrió la autofagia (Duve et al., 1953). Esta vía implica la degradación de proteínas en los lisosomas, en los animales o en las vacuolas de las plantas. La autofagia involucra la formación de vesículas (autofagosomas) en el citoplasma que posteriormente se fusionan con los lisosomas o vacuolas para liberar proteínas u organelos blanco (Figura 1.1) (Clague y Urbé, 2010). Finalmente, en 1980 se descubrió la vía proteasomal (Etlinger y Goldberg, 1977; Wilk y Orłowski, 1980), también llamada como la vía Ubiquitina-Proteasoma (UPS) (Clague y Urbé, 2010; Marshall y Vierstra, 2019). Esta vía inicia con la ubiquitinación de las proteínas blanco, mediante la adición covalente de múltiples ubiquitinas. Posteriormente, las proteínas poliubiquitinadas son degradadas dentro del proteasoma 26S (Figura 1.1).

La vía UPS es una de las principales vías de degradación de proteínas en células eucariotas para controlar los niveles intracelulares de una variedad de proteínas de vida corta (Vierstra, 1993a, 2009). Proteínas asociadas al control de procesos del crecimiento y desarrollo, y a la respuesta al estrés biótico y abiótico son moduladas por ubiquitinación (Moon et al., 2004). De acuerdo con esto, es importante estudiar la relación entre la vía UPS y la ES que involucra la intervención de diferentes RCV y una estricta modulación de la abundancia de proteínas.

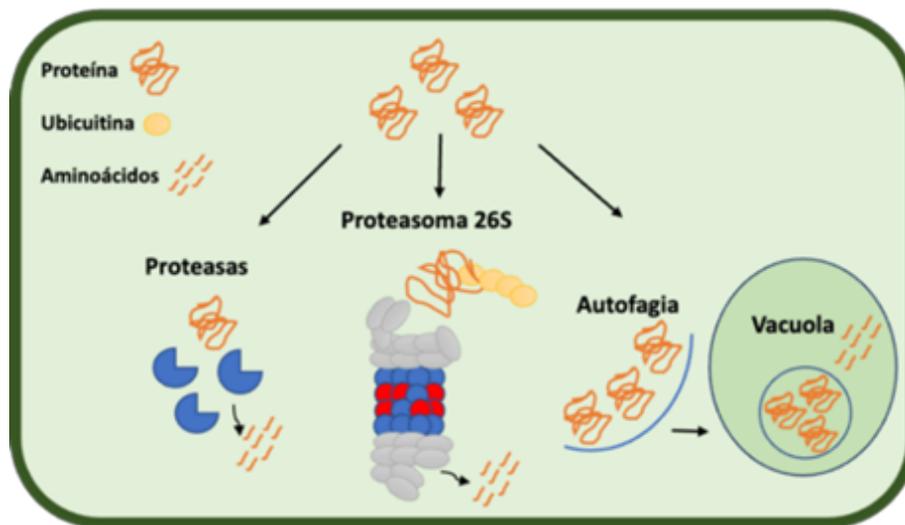


Figura 1.1. Vías de degradación de proteínas en la célula eucariota.

1.1.1. Mecanismo de degradación de proteínas por la vía UPS.

En 1978, los investigadores Aaron Ciechanover, Avram Hershko e Irwin Rose caracterizaron el sistema de conjugación de la ubiquitina y su papel en el marcado de proteínas para su degradación (Ciechanover et al., 1978). UPS involucra el marcado de las proteínas con poliubiquitinas para su posterior degradación en el proteasoma 26S por la acción de proteasas de tipo caspasa, tripsina y quimotripsina (Coux et al., 1996; Tanaka, 2009).

En el UPS, las proteínas se marcan covalentemente con un péptido de 76 aminoácidos, llamado ubiquitina (Ub), uniendo la Gly del extremo C-terminal de la Ub y un residuo de Lys de la proteína blanco. Sobre esta primera Ub unida se genera la cadena de ubiquitinas (Ubs) interconectadas a través de residuos de Lys, mayoritariamente la Lys48. Tres enzimas diferentes conocidas como enzima activadora Ub E1, enzima conjugadora Ub E2 y Ub ligasa E3 están implicadas en el

etiquetado de las proteínas blanco (Coux et al., 1996; Kurepa y Smalle, 2008) (Figura 1.2). Finalmente, la proteína marcada es reconocida por el proteasoma 26S y es degradada.

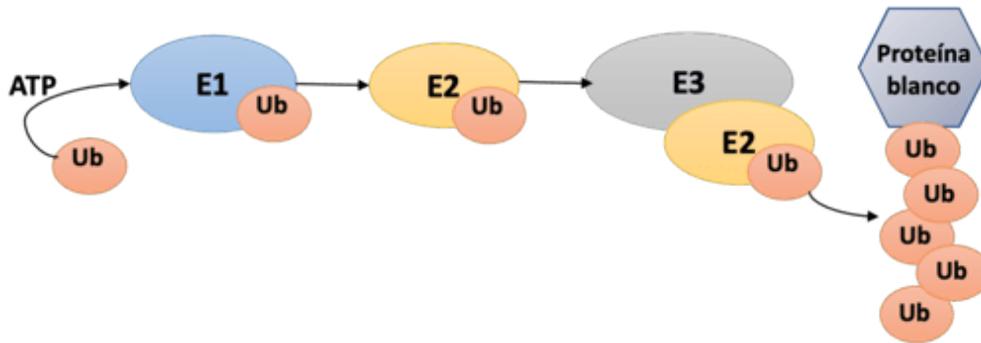


Figura 1.2. Marcaje de proteínas por ubiquitinación. La Ub se une a la enzima E1. Posteriormente, la Ub es transferida a la enzima de E2. El complejo E2-Ub se une a la enzima E3 para conjugar el monómero de Ub a un residuo de Lys de la proteína blanco.

La enzima E3 es muy importante en el proceso de ubiquitinación porque reconoce la proteína blanco. Las enzimas E3 se clasifican según sus mecanismos de acción y la organización de sus subunidades en tres clases: HECT (homología con el terminal carboxil asociado a E6), RING/U-box (nuevo gen realmente interesante RING/Caja U) y CRL (Cullin-RING ligasas de subunidades múltiples E3s). Las CRLs utilizan proteínas de reclutamiento pertenecientes a las familias F-box, el complejo Broad Tramtrack Bric-a-Brac (BTB) o DDB1 vinculante WD40 (DWD) para unir la proteína blanco (Ban y Estelle, 2021). Las CRL ligasas son consideradas como “centros moleculares” debido a que modulan la percepción y señalización de RCV como la auxina (Moon et al., 2004). Interesantemente, se presume que la auxina es clave en el proceso de la ES.

1.1.2. Composición del proteasoma 26S.

El proteasoma 26S es un complejo proteico altamente conservado en plantas, con múltiples subunidades que en conjunto tienen una masa molecular de 2.4 MDa. Consta de dos regiones aladañas 19S (RP, regulatory particle) y una región central (CP, core protease) conocida como proteasoma 20S (20SP) que se encarga de degradar las proteínas. La región RP, se divide en dos regiones conocidas como “puerta y base”. A su vez, las dos regiones RP puerta y base comprenden aproximadamente 20 subunidades diferentes que pueden dividirse en dos grupos: subunidades de triple ATPasa (RPT) y subunidades no ATPasas (RPN) (Figura 1.3) (Tanaka, 2009).

La región RP puerta, distante a la región CP, contiene las subunidades RPN 3, 5-9, 11, 12 y 15. La subunidad RPN11 tiene actividad metaloisoproteasa y, por lo tanto, desubicultina las proteínas, reciclando las Ubs. Las regiones RPN5, RPN6 y RPN7 han mostrado ser esenciales para el ensamblaje de la región RP. Por otra parte, la región RP base, próxima a la región CP, realiza el despliegue de la proteína y la transloca a la cámara de proteólisis de la región CP. La región RP base contiene las subunidades RPT 1-6 y las subunidades RPN 1, 2, 10 y 13. Las subunidades RPN 10 y 13 funcionan como receptores de Ub y atrapan las proteínas poliubiquitinadas (Coux et al., 1996; Kurepa y Smalle, 2008; Tanaka, 2009).

Ahora se conoce que *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh tiene 18 genes que codifican para subunidades RPN y 11 genes que codifican para subunidades RPT. Estudios realizados en el laboratorio 22 del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) revelaron que en *C. canephora* existen 13 genes que codifican para subunidades RPN y 7 que codifican para subunidades RPT (Ver Capítulo I). En *A. thaliana*, la subunidad RPN12 se ha asociado con la respuesta a los RCV auxina y citocinina (Smalle et al., 2002), y la subunidad RPN1 al desarrollo del embrión cigótico (Brukhin et al., 2005). Estos hallazgos y la participación de los RCV auxinas y citocininas en la ES sugieren que la vía UPS podría intervenir en la ES.

La región CP es una proteasa dependiente de ATP, constituida por 4 anillos apilados, los dos anillos internos están formados por siete subunidades beta (β -PB-A, β -PB-B, β -PB-C, β -PB-D, β -PB-E, β -PB-F y β -PB-G). De las siete subunidades, tres tienen actividad de proteasa: PB-A (β 1) tiene actividad de caspasa, PB-B (β 2) tiene actividad de tripsina y PB-E (β 5) es una proteasa con actividad de quimotripsina. Estas subunidades tienen aminoácidos treonina en sus sitios activos. Los anillos externos están compuestos por siete subunidades alfa (α -PA-A, α -PA-B, α -PA-C, α -PA-D, α -PA-E, α -PA-F, α -PA-G) (Figura 1.3) (Coux et al., 1996; Kurepa y Smalle, 2008). *A. thaliana* tiene 13 genes que codifican para subunidades alfa (α) y 11 genes que codifican para subunidades beta (β). De manera interna, en el laboratorio 22 del CICY se identificaron 9 genes que codifican para subunidades alfa (α) y 11 genes codifican para subunidades beta (β) en *C. canephora* (Ver Capítulo I).

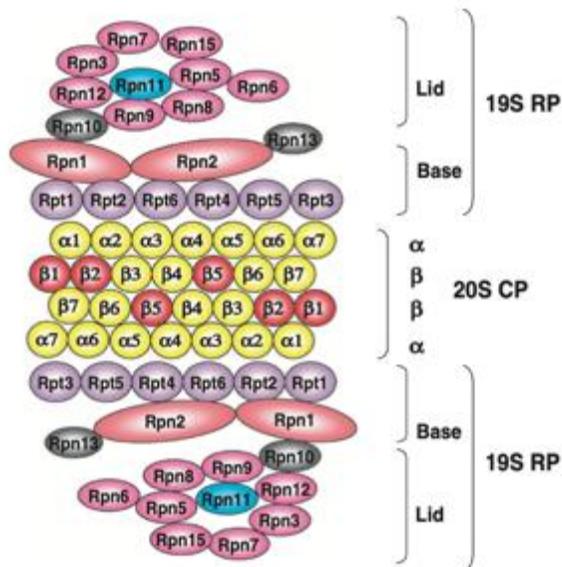


Figura 1.3. Organización del proteasoma 26S. Las subunidades en las regiones aledañas RP (19S) y central (CP) están indicadas. La degradación proteica tiene lugar en la región CP. Imagen tomada de Tanaka (2009).

Estudios de proteómica en ES han revelado la presencia de subunidades del proteasoma 26S, no obstante, se desconoce si el proteasoma 26S activo es necesario para la ES. Inhibidores para inactivar el proteasoma 26S se han utilizado en estudios de la germinación de polen (Sheng et al., 2006; Speranza et al., 2001), la fotosíntesis bajo condiciones de estrés por metales (Mendoza et al., 2020), y el desarrollo de la raíz (Pereksta et al., 2020).

1.1.3. Inhibidores reversibles e irreversibles del proteasoma 26S y ejemplos de su uso en plantas.

La abundancia de proteínas que se degradan a través de UPS puede verse afectadas por la presencia de inhibidores de proteasoma 26S en la célula y, por lo tanto, afectar diferentes procesos de la planta, incluyendo el desarrollo morfológico (Mendoza et al., 2020; Negi et al., 2010; Pereksta et al., 2020; Speranza et al., 2001). Por ejemplo, Speranza et al. (2001) reportó que el inhibidor MG-132 modificó la germinación del polen alterando el tubo polínico de *Actinidia deliciosa* (A. Chev.) C.F. Liang & A.R. Ferguson. Utilizando este mismo inhibidor MG-132, pero

en *Brassica napus L.*, Pereksta et al. (2020) reportaron alteraciones en la respuesta transcripcional asociada con la elongación de la raíz en las células radiculares.

Los inhibidores reversibles del proteasoma 26S tales como MG-132 y los inactivadores tales como syringolin A se unen a las subunidades del proteasoma 26S y se han utilizado efectivamente en plantas (Cuadro 1.1).

Cuadro 1.1. Inhibidores utilizados para inactivar el proteasoma 26S.

Inhibidores reversibles				
Nombre del Inhibidor	Origen	Organismo aplicado	Modo de acción	Referencia
MG-132	Sintético	Plantas/ animales	Reacciona el grupo aldehído del inhibidor con la treonina del sitio activo de la subunidad β 1 del proteasoma.	(Lee y Goldberg, 1998)
Bortezomib (MG-341 / PS-341)	Sintético	Animales	El grupo boronato del inhibidor se une a la treonina del sitio activo.	(D. Chen et al., 2011)
Ixazomib	Sintético	Animales	El inhibidor comprende un grupo boronato que se une a la treonina del sitio activo.	(Fricker, 2020)

Continuación cuadro 1.1. (Continuación).

Inhibidores irreversibles				
Lactacistina (blasto-beta-lactona)	Natural, extraído de <i>Streptomyces lactacystinaeus</i>	Animales	Se une covalentemente al residuo de treonina N-terminal del sitio activo en ciertas subunidades β del proteasoma 26S	(Ōmura y Crump, 2019; Coux et al., 1996)
Epoxomicina	Natural extraído de <i>Streptomyces</i>	Animales	El grupo epoxicetona del extremo C-terminal de la Epomicina forma un enlace covalente con la treonina del sitio activo de la subunidad β .	(Meng et al., 1999)
Carfilzomib	Sintético	Animales	Contiene una epoxicetona que forma un enlace covalente con la treonina del sitio activo del proteasoma 26S	(Khan y Stewart, 2011)
Siringolina A	Natural extraído de <i>Pseudomonas syringae pv syringae</i> .	Plantas	El sistema carbonílico α y β -insaturado reaccionan con la treonina del sitio activo del proteasoma 26S.	(Groll et al., 2008)

El inhibidor MG-132 es uno de los primeros inhibidores desarrollados para el proteasoma 26S. En *Chlamydomonas reinhardtii*, un alga unicelular se sugiere que el MG-132 ligado al proteasoma se puede eliminar después de 8 horas de cultivo del alga en medio fresco (Mendoza et al., 2020; Speranza et al., 2001). Durante la inhibición, el grupo aldehído de MG-132 forma un enlace

hemiacetal con el grupo hidroxilo de un residuo de treonina presente en el sitio activo de la subunidad $\beta 1$ del proteasoma 26S (Figura 1.4.) (Gladman et al., 2016). Debido a que la inhibición de MG-132 es reversible, los tratamientos de muestras van desde 30 minutos hasta 36 horas. (Mendoza et al., 2020; Negi et al., 2010; Pereksta et al., 2020; Speranza et al., 2001). Este inhibidor también actúa sobre las calpaínas y las catepsinas lisosomales (Fricker, 2020).

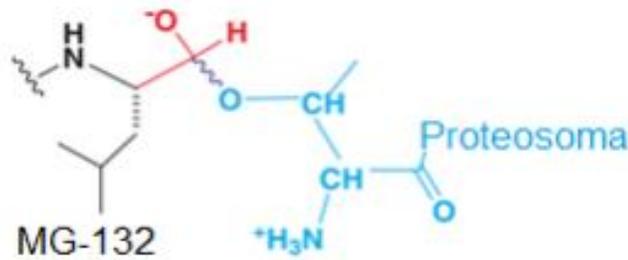


Figura 1.4. Unión de MG-132 al proteasoma 26S.

1.1.4. UPS en la regulación del crecimiento y expresión génica.

La regulación molecular en las plantas comprende un preciso balance de reguladores de crecimiento que pueden inducir la expresión y/o represión de genes, y la síntesis de proteínas durante el desarrollo y el crecimiento. Estas proteínas de tipo estructural, reguladoras transcripcionales, transportadoras o receptoras de reguladores del crecimiento participan en la mayoría de los aspectos fisiológicos y bioquímicos, así como en la señalización interna y externa de la célula vegetal (Nelson et al., 2014). Mediante la modulación de la abundancia de estas proteínas, el UPS puede controlar el desarrollo de la planta. Por ejemplo, la vía UPS regula de manera positiva la percepción y señalización de auxinas. Las auxinas son percibidas por el receptor TIR1/AFB (Respuesta del Inhibidor de Transporte 1 / *F-Box* Señalización de Auxina), que es una enzima E3 ligasa y tiene como blanco la proteína Aux/IAA (Auxina/Indol-3-Acético). A bajas concentraciones de auxinas en la célula, Aux/IAA interactúa con ARFs (Factores De Respuesta Auxina) para prevenir la generación de transcritos blanco de ARFs. Por otro lado, a altos niveles de auxinas, el complejo TIR1/AFB percibe la auxina, ubiquitina Aux/IAA para ser degradado por el proteasoma 26S, lo que permite que los ARFs promuevan la transcripción de los genes blanco (Figura 1.5) (Das et al., 2021). En el ciclo celular hay dos proteínas muy importantes: las ciclinas y los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDK), los cuales

modulan las fases del ciclo celular. El proteasoma 26S controla la proteólisis espacial y temporal de las ciclinas y las CDKs, asegurando así la unidireccionalidad del ciclo celular (Adams, 2004).

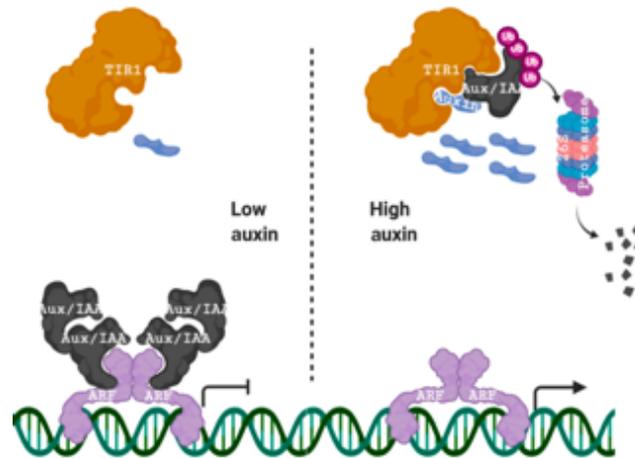


Figura 1.5. Regulación transcripcional dependiente de auxinas. Imagen tomada de Das et al., (2021).

Debido a que los reguladores del crecimiento promueven diferentes procesos celulares como la división celular y la ES, se han descrito como la base para el desarrollo de todos los órganos vegetales (del Pozo y Manzano, 2014; Zhao et al., 2013). De acuerdo con lo anterior, el papel del UPS en la ES podría ser relevante.

1.2. Embriogénesis somática: aspectos morfológicos y moleculares.

La ES ocurre en la naturaleza bajo ciertas condiciones ambientales, por ejemplo, en *Kalanchoe* spp. que producen embriones alrededor de sus hojas. También tiene lugar en el primordio de la semilla (óvulo), en las células madre de microsporas, y en las células del suspensor (Radoeva y Weijers, 2014).

La formación de embriones somáticos también puede inducirse *in vitro* desde un explante de tejido vegetal a través de reguladores del crecimiento (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016), desarrollándose a través de ES directa o ES indirecta. En la ES indirecta se producen callos (tejidos desorganizados y desdiferenciados) y posteriormente se forman células embrionarias que producirán embriones. Por otro lado, en la ES directa los embriones somáticos se forman en la

superficie del explante vegetal, sin pasar previamente por callos (Quiroz-Figueroa et al., 2006). En ambas rutas, la correcta regulación de la expresión de genes, que codifican a factores de transcripción, transportadores y enzimas involucradas en la regulación de reguladores del crecimiento, como las auxinas y citocininas, es muy importante para un eficiente y exitoso protocolo de ES (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018). Durante la ES directa las células somáticas, una vez reprogramadas y convertidas en células embriogénicas, se convertirán en embriones.

La ES ocurre en varias fases, tales como: 1) la inducción de la ES, 2) la formación de los centros meristemáticos y 3) el desarrollo del embrión somático (Elhiti et al., 2013) (Figura 1.6). En la inducción de la ES, las células somáticas pasan por una desdiferenciación y adquieren la competencia para posteriormente dar lugar a células embrionarias, normalmente esta fase se realiza en medios de cultivo suplementados con auxinas. Posteriormente, en la segunda fase las células embrionarias realizan una división celular rápida y se transforman a células meristemáticas, a partir de las cuales se desarrollan los embriones somáticos globulares. En la tercera fase, los embriones globulares atraviesan por diferentes formas, en el caso de las plantas dicotiledóneas son: corazón, torpedo y cotiledonar, esta transición de formas comprende la fase del desarrollo del embrión (Elhiti et al., 2013).

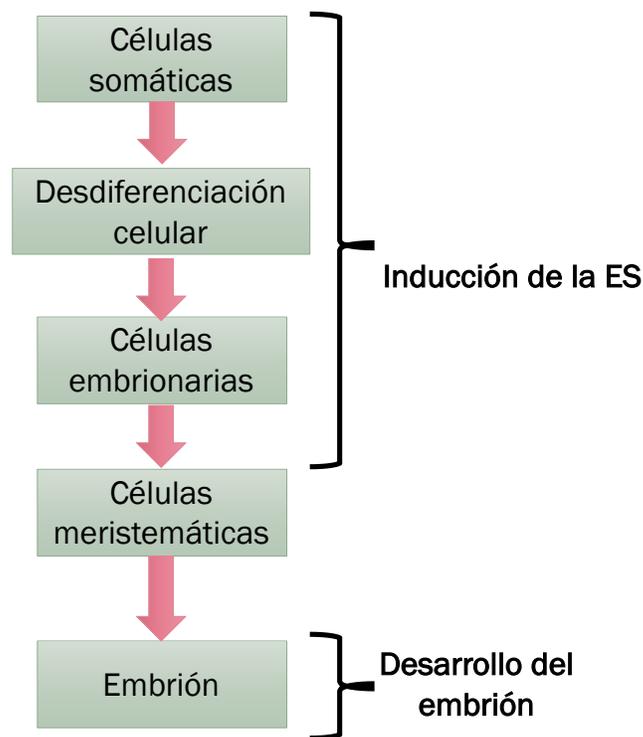


Figura 1.6. Diagrama esquemático aceptado de las fases del proceso de ES *in vitro*, imagen editada de Elhiti et al., (2013).

La ES depende de varios procesos bioquímicos y otros factores. Por ejemplo, la percepción y señalización de auxinas, la expresión de genes asociados con la embriogénesis, incluyendo ARF5, LEC1, AGL15, SERK y WOX4. Los patrones de expresión de estos factores de transcripción son clave para la desdiferenciación, la formación de células embriogénicas y el desarrollo del embrión (Fehér, 2015).

Interesantemente, en estudios con la embriogénesis somática indirecta en *Zea mays* L. Millo., la expresión del gen SERK1 determinó la viabilidad de los callos para formar embriones somáticos. De este modo, los callos embriogénicos (CE) en medios suplementados con auxinas, presentaban la expresión del gen SERK1, en comparación con los callos no embriogénicos (CNE). Además, el patrón de expresión del gen SERK1 varió durante la ES (Baudin Sylvie et al., 2000).

1.2.1. Formación y desarrollo del embrión en la ES.

La formación del embrión a partir de una o de un grupo de células somáticas sigue siendo un misterio y desafío fundamental para la comprensión de la ES. La histología se ha utilizado para visualizar el inicio de la formación de embriones somáticos en diferentes especies de plantas, lo que ayuda a determinar su origen. (Grzyb y Mikula, 2019; Rocha et al., 2012). La célula o células embriogénicas que dan lugar a los embriones generalmente tienen una pared celular con la presencia de cúmulos de almidón, citoplasma más denso, vacuola fragmentada, un núcleo altamente activo con nucléolo grande, alta relación núcleo-citoplasma y bajos niveles de heterocromatina (Awada et al., 2019; Rocha et al., 2012).

La competencia embriogénica suele estar precedida por la división celular de dos tipos de células: la célula basal, que dará lugar al suspensor, la hipófisis y la cubierta de la raíz; y la célula apical, que dará lugar al embrión (Armenta-Medina et al., 2020; Winkelmann, 2016). Este fenómeno se puede ver a nivel histológico como una región de células que se dividen constantemente. Luego, la división celular de las células basales y apicales dará lugar secuencialmente al dermatógeno, al embrión en estadio globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Figura 1.7). Al finalizar la etapa globular, se establecen células de tejido vascular, meristemo apical y meristemo radicular. Mientras que los cotiledones (las primeras hojas u órganos laterales) se establecen en el estadio

de corazón. Por último, el embrión en estadio corazón atravesará un período de morfogénesis que comprende la elongación de los meristemas apicales (MA) y radicales (MR), y el pliegue del hipocótilo (tallo embrionario) y los cotiledones alargados a medida que se desarrolla el embrión (Figura 1.6) (Armenta-Medina et al., 2020; Winkelmann, 2016). Se ha reportado que las diferentes estructuras morfológicas observadas durante el desarrollo embrionario son estimuladas por los reguladores del crecimiento auxinas y citocininas. Interesantemente, la interrupción de la subunidad RPN12 del proteasoma 26S, afecta en la sensibilidad de la planta por estos reguladores de crecimiento, resultado en alteraciones en el desarrollo de las hojas y las raíces. (Kurepa et al., 2013; Smalle et al., 2002).

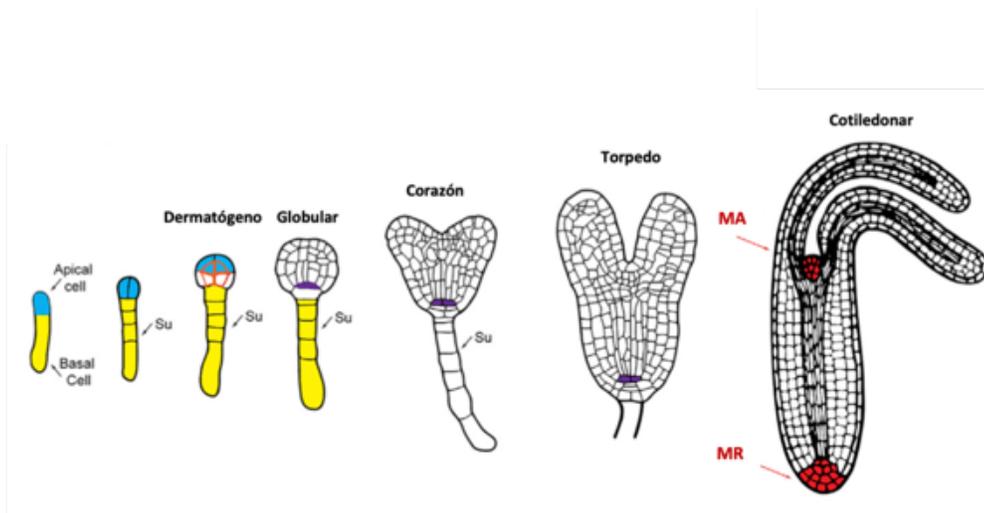


Figura 1.7. Desarrollo embrionario de la planta dicotiledónea *A. thaliana*. MA: meristemo apical; MR: meristemo radical. Imagen tomada de Armenta-Medina et al., (2020).

1.2.2. Regulación molecular de la ES.

En la inducción de ES, se ha observado un incremento en los niveles de expresión de genes implicados en la biosíntesis de las auxinas incluyendo *TAA1* (*TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1*), *YUC1* (*YUCCA1*) y *YUC3* (*YUCCA 3*) (Ayil-Gutiérrez et al., 2013), genes inducidos en respuesta a auxinas, como son los de la clase *ARFs* (*AUXIN RESPONSE FACTORS*) incluyendo *ARF5*, *ARF6*, *ARF8*, *ARF10*, *ARF16* (Wójcikowska & Gaj, 2017a). Los *ARFs* permiten la expresión de los factores de transcripción *LEC1* (*LEAFY COTYLEDON 1*) y *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 1*), que también están involucrados en la respuesta embriogénica (Lotan et al., 1998; Stone et al., 2001; Wójcik et al., 2020). En *A. thaliana*,

la expresión ectópica en embriones cigóticos inmaduros de *LEC1* y *LEC2* promueve la transición de la célula somática a célula embriogénica e induce la formación de embriones somáticos (Gaj et al., 2005). Por otro lado, se ha reportado que *LEC1* promueve la formación de tejido embrionario y *LEC2* promueve la formación directa de embriones somáticos (Brand et al., 2019). Mientras que, *BBM* (*BABY BOOM*) codifica para una proteína de la familia AP2/ERF (*APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR*) (Boutilier et al., 2002). La expresión de *BBM* en tejidos meristemáticos sugiere su participación en mantener la identidad celular (Horstman et al., 2017a). También la expresión de *BBM* se ha relacionado con la respuesta embriogénica y por lo tanto con la totipotencialidad (Boutilier et al., 2002), considerándose incluso como un "biomarcador" de la ES (Chen et al., 2022). Por otro lado, el gen *WOX4* (*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 4*), relacionado con la formación de células del meristemo apical del brote (Ohmori et al., 2013), es clave para el desarrollo temprano del embrión cigótico en *A. thaliana* (Haecker et al., 2004). El gen *SERK1* (*SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES 1*) que es una cinasa tipo LRR-RLK (*LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASE*) se ha reportado como un gen altamente expresado en células embriogénicas y en los diferentes estadios del desarrollo embrionario (Steiner et al., 2012). La sobreexpresión de *SERK1* ha dado lugar a la promoción de la respuesta embriogénica y de la formación de embriones (Baudin Sylvie et al., 2000). Otras cinasas con incidencia en la ES incluyen las del tipo CDK (*CYCLIN-DEPENDENT KINASES*) (Elhiti et al., 2013). Durante el desarrollo del embrión se ha observado expresión de *LEC1* y *FUS3* (*FUSCA3*) a lo largo del desarrollo del embrión., de *AGL15* (*AGAMOUS- LIKE 15*) durante las primeras etapas del desarrollo del embrión (Joshi et al., 2022; Zheng et al., 2016), de *BBM* durante la formación de embriones cotiledonares (Chen et al., 2022) y de *WOX4* en el procambium vascular (Ji et al., 2010).

1.3. Sistema UPS en la Inducción de la ES.

En la ES en caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), que fue mejorada a través de la adición de poliaminas (putrescina) al medio de inducción se ha observado un incremento de hasta 61 veces la abundancia de la proteína poli-Ub11 (Reis et al., 2016). Por otro lado, en un análisis comparativo de dos variedades de *Medicago truncatula* Gaertn contrastantes para la formación de callos embriogénicos, Ub fusionada a la proteína ribosomal S27a fue más abundante en la variedad no producía callos embriogénicos (Almeida et al., 2012). Interesantemente, en *Nicotiana benthamiana* Domin la supresión o sobreexpresión constitutiva del gen *S27a* alteró la proliferación de células indiferenciadas y el desarrollo normal de brotes y hojas. Por otra parte,

se ha observado que la unión de *S27a* a la proteína Ub causa una reducción severa en el nivel de esta proteína (Hanania et al., 2009).

En *S. officinarum*, UBC9, que es una enzima de conjugación de Ub se ha identificado como una E2 con baja abundancia en regímenes de luz que promueven el desarrollo del embrión somático (Heringer et al., 2017). Esto es importante debido a que UBC9 en levadura y en humanos se ha reportado que es esencial para la viabilidad celular y desempeña un papel clave en la regulación de la progresión del ciclo celular (Nowak y Hammerschmidt, 2006).

Por otra parte, la Ub ligasa E3 es responsable de reconocer los objetivos de ubiquitinación en la célula. En un trabajo realizado en *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze compararon líneas celulares embriogénicas y no embriogénicas, y encontraron que la Ub ligasa E3 de tipo RING, ORTHRUS 2 (ORTH2), tenía mayor acumulación en las líneas celulares embriogénicas (dos Santos et al., 2016). ORTH2 ha sido correlacionada con el estado de la metilación del ADN en plantas. Interesantemente, la metilación adecuada del genoma es esencial para la regulación génica en el proceso de la ES (Kraft et al., 2008).

La presencia de las enzimas del UPS en la ES sugiere la participación de la ubiquitinación para regular la abundancia de proteínas y para modular así la ES. La evidencia de esto se ha generado parcialmente en estudios de la embriogénesis cigótica (EC). En *A. thaliana*, un análisis de la EC en tejido de la mutante de la E3 ligase del tipo CRL, *Atcul3*, reportó embriones anormales y embriones arrestados en su desarrollo en la etapa globular (Figueroa et al., 2005). Al compartir procesos bioquímicos y fisiológicos similares entre EC y ES, es posible que UPS tenga un papel preponderante en la inducción y formación de embriones.

Las proteínas que forman parte del proteasoma 26S también han sido detectadas en la ES. En un trabajo realizado en *Vitis vinifera* L., se compararon las proteínas de dos tipos de tejido de CE y CNE, y se encontró que las subunidades PAA1 y PBA1 fueron más abundantes en CE, sugiriendo que la actividad del proteasoma 26S es crucial para la ES (Zhang et al., 2009). Otro hallazgo de la importancia del proteasoma 26S, es la detección de la subunidad RPT5 con mayor abundancia en CE que en CNE en *Cyclamen persicum* Mill (Lyngved et al., 2008), *Musa spp.* AAA cv. Gry Naine (Kumaravel et al., 2017), *Crocus sativus* L. (Sharifi et al., 2012) y *Zea mays* L. (Sun et al., 2013), y la identificación de la subunidad RPN12 con mayor abundancia en CNE que en CE (Kumaravel et al., 2017). Esto es muy interesante, ya que, en *A. thaliana*, la subunidad RPN12 ha sido ligada con la respuesta a los reguladores del crecimiento auxinas y citocininas

(Kurepa et al., 2013; Smalle et al., 2002). Esta misma subunidad ha sido relacionada con la respuesta embriogénica en *C. canephora* (Carrillo-Bermejo et al., 2024, ver capítulo II).

1.3.1. Recapitulación de los antecedentes.

La Vía Ubicuitina-Proteasoma (UPS) se considera el principal mecanismo de degradación de proteínas en células eucariotas. La vía UPS comprende la previa poliubiquitinación de las proteínas diana a degradar por el proteasoma 26S. El proteasoma 26S es un complejo proteico altamente conservado en plantas, comprende dos regiones aledañas 19S (RP, regulatory particle) y una región central (CP, core protease) conocida como proteasoma 20S (20SP) que se encarga de degradar las proteínas. (Tanaka, 2009). Los inhibidores del proteasoma 26S como MG-132 son una herramienta útil para bloquear su función en procesos biológicos y así comprender mejor su papel en estos. La vía UPS regula de manera positiva la percepción y señalización de auxinas mediante la degradación de la proteína represora Aux/IAA y permitiendo que el factor de transcripción ARF module la expresión de los genes en respuesta a auxina. La ES es un proceso promovido por las auxinas y citocininas. Durante la ES la formación de embriones puede darse de forma directa e indirecta. En la ES directa las células somáticas, una vez reprogramadas y convertidas en células embriogénicas, se convertirán en embriones; esto sugiere una compleja tasa de recambio de proteínas. La ES comprende cambios a nivel morfológico y moleculares. A nivel morfológico se encuentran las fases de inducción, formación de los centros meristemáticos y desarrollo del embrión somático (M. Elhiti et al., 2013) Durante estas fases se ha reportado una regulación molecular comprendida por los genes relacionados a la síntesis y transporte de auxinas como *YUC1*, *Aux/IAA*, *ARF*; y factores de transcripción que intervienen en la respuesta embriogénica y formación de centros meristemáticos como *WOX4*, *LEC1*, *BBM1*. Estudios de proteómica en ES han revelado la presencia de subunidades del proteasoma 26S, no obstante, se desconoce si el proteasoma 26S activo es necesario para la ES.

JUSTIFICACIÓN

Se ha demostrado que la vía UPS regula el desarrollo de las plantas por señalización y percepción de RCV como las auxinas. Las auxinas son clave para la inducción óptima de la ES, que es un proceso complejo que comprende la reprogramación de una célula somática en una célula embrionaria. Se ha reportado que el aumento o la disminución en la abundancia de algunas proteínas es clave en este proceso. Interesantemente, se ha detectado un aumento en la abundancia de proteínas relacionadas con la cascada de la ubiquitinación y el proteasoma 26S en tejidos con características contrastantes para la inducción de la ES. Este hecho conduce al interés de conocer si la vía UPS regula la inducción de la ES. Hemos escogido el modelo de la ES directa de *C. canephora* para este estudio por su repetibilidad y su eficiencia en la producción de embriones somáticos.

HIPOTÉISIS

Si la vía UPS participa en la cadena de señalización de la inducción de la embriogénesis somática, la inhibición del proteasoma 26S en la embriogénesis somática de *C. canephora* modificará la regulación morfológica y molecular de la embriogénesis somática.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Participa la vía UPS en la red de señalización que conduce a la embriogénesis somática de *C. canephora*?

OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios morfológicos y moleculares que suceden durante la embriogénesis somática de *C. canephora* Pierre ex A. bajo condiciones de inhibición del proteasoma 26S.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar a nivel morfológico y molecular el proceso de la ES en *C. canephora* mediante técnicas histológicas y proteómicas.
2. Analizar a nivel morfológico y molecular el efecto del inhibidor del proteosoma 26S en la inducción de la ES en *C. canephora*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para la realización de este trabajo, se diseñó una estrategia experimental (Figura 1.8). En la cual, como primera parte se inició con un ensayo de dosis-respuesta del inhibidor del proteasoma 26S MG-132 en el pretratamiento de la inducción de la ES de *C. canephora*. Posteriormente, las hojas vegetales sirvieron como explantes para la inducción. Durante la inducción de la ES, se realizó las observaciones morfológicas, histológicas y el conteo de los embriones somáticos mediante herramientas de histología. La toma de los explantes de los diferentes tratamientos (con y sin inhibidor) se realizó para la extracción de ARN, la síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) y se evaluó la expresión de los genes involucrados en la ES mediante la técnica de RT-PCR. Por otro lado, los tejidos foliares de los diferentes tratamientos fueron utilizados para la extracción de proteínas, electroforesis bidimensional en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida y análisis de imagen del gely se identificaron las proteínas mayormente acumuladas en la ES mediante mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem.

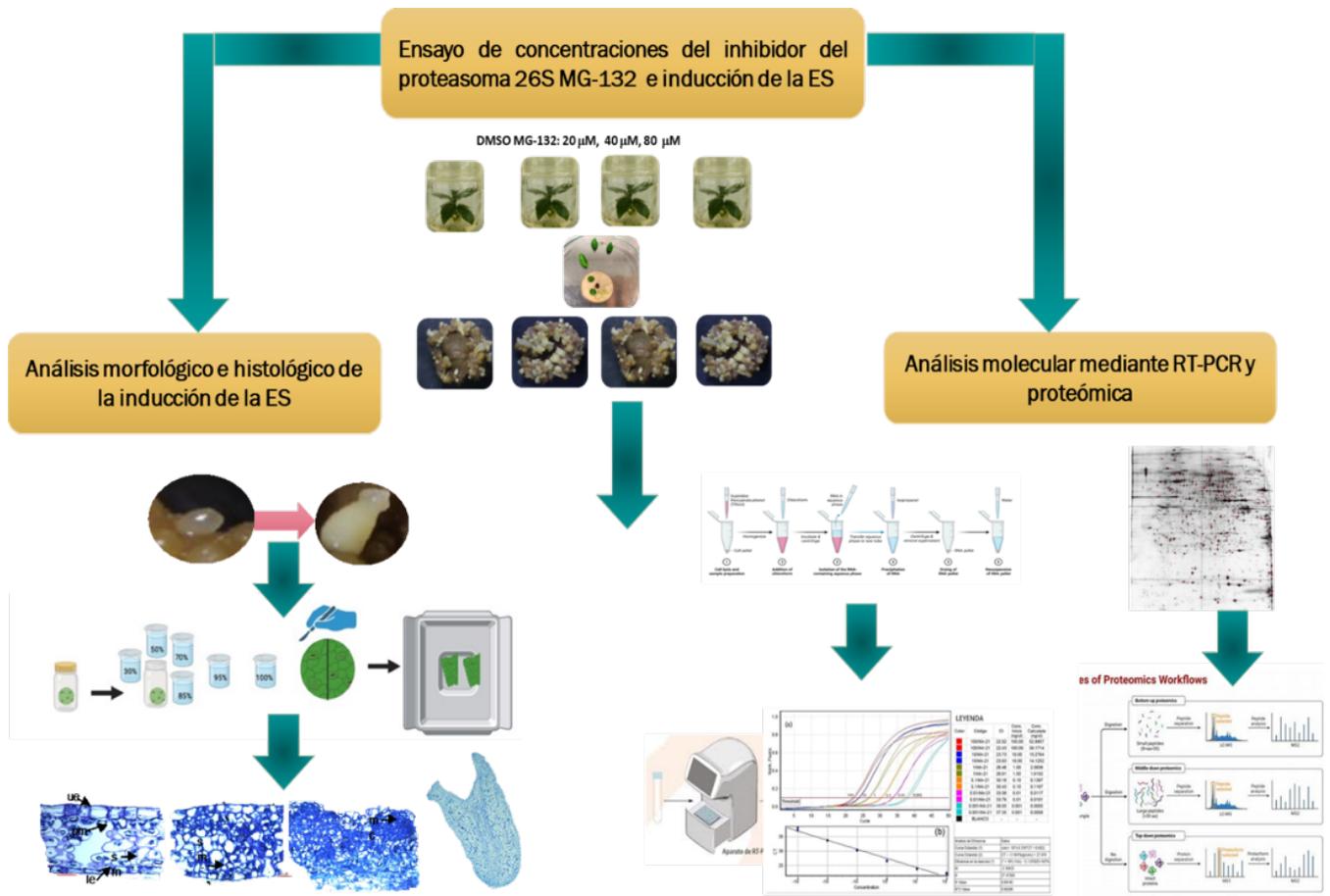


Figura 1.8. Estrategia experimental utilizada en este trabajo. Se inició con el ensayo de dosis-respuesta del inhibidor del proteasoma 26S MG-132 en el pretratamiento de la inducción de la ES de *C. canephora*. Después, las hojas vegetales sirvieron como explantes para la inducción de la ES. Posteriormente, durante la inducción de la ES se tomaron muestras para los análisis histológicos, de expresión de genes e identificación de proteínas.

CAPÍTULO II: IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LA REGIÓN 19S y 20S DEL PROTEASOMA 26S EN *Coffea canephora*.

2.1 INTRODUCCIÓN

La sección 1.1.2 describe el proteosoma 26S, que consiste en múltiples subunidades y está implicado en la degradación de proteínas ubicuitinadas a aminoácidos. Estudios enfocados a la identificación de las subunidades del proteosoma 26S en plantas ha revelado que tan numerosos son los genes *RPN* y *RPT*. En *A. thaliana*, existen 18 genes *RPN* y 11 genes *RPT*, 13 genes que codifican las subunidades alfa (α) y 11 genes que codifican las subunidades beta (β) (Gemperline et al., 2019). En *Oryza sativa* se han reportado que 14 genes codifican las subunidades RPN, 10 genes que codifican las subunidades RPT, 6 genes que codifican a las subunidades alfa (α) y 7 genes que codifican a las subunidades beta (β) (Sassa et al., 2000; Shibahara et al., 2002).

Coffea canephora es una planta diploide ($2n = 2x = 22$ cromosomas) de la familia Rubiaceae, también conocida como café robusta. Se considera uno de los progenitores de *Coffea arabica* ($4n = 4x$, tetraploide). *C. canephora* y *C. arabica* proporcionan aproximadamente el 30% y el 70% de la producción de los granos de café para el mercado mundial, respectivamente. (Ramalho et al., 2014).

La identificación de genes en plantas permite estudiar su expresión en diferentes condiciones y procesos biológicos, lo que facilita la comprensión de su función. Este capítulo presenta datos sobre la identificación del número de genes que codifican para el proteosoma 26S *C. canephora*. El proteosoma 26S participa en procesos biológicos como el desarrollo de la raíz, el ciclo celular, mediante la regulación de la percepción y señalización de las auxinas y citocininas (Adams, 2004; Smalle et al. 2002). Las auxinas y citocininas son reguladores de crecimiento vegetal que influyen en la inducción de la ES (Méndez-Hernández et al., 2019). Por ello, estos resultados son de gran utilidad para conocer la historia evolutiva y la función del proteosoma 26S en la ES de *C. canephora*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Identificación de genes que codifican proteínas de las subunidades alfa y beta del proteosoma en *Coffea canephora*.

A partir de los datos del genoma de *C. canephora*, se descargaron las secuencias de los genes y las proteínas de la base de datos (<https://coffee-genome-hub.southgreen.fr>, y <https://solgenomics.net>, consultadas el 2 de julio del 2022). Se utilizaron dos métodos, búsqueda BLAST y modelo oculto de Markov (HMM), para identificar los genes que codifican a las regiones 19S y 20S del proteasoma. Las búsquedas en BLAST se realizaron con secuencias de genes que codifican para las regiones 19S y 20S del proteasoma que ya están identificadas y anotadas en *Arabidopsis thaliana*. La integridad del dominio de los genes se determinó mediante el programa en línea Pfam (<http://pfam.xfam.org>, consultado el 6 de julio del 2022) con un valor $e \leq 0,01$.

2.2.2. Análisis filogenético de los genes que codifican la región 19S y 20S del proteasoma 26S

El alineamiento de las secuencias de aminoácidos (aa) de las proteínas que comprenden las regiones 19S y 20S del proteasoma se realizó utilizando el programa en línea Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>, consultado el 25 de julio del 2022). Para investigar la relación filogenética entre las subunidades del proteasoma, 19S y 20S, en *C. canephora* se utilizó el programa MEGA 6 y se generó el árbol filogenético de unión de vecinos (NJ) (Saitou & Nei, 1987). Los genes se clasificaron de acuerdo con el porcentaje de identidad con respecto a los genes en *A. thaliana*.

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Identificación de los genes que codifican las proteínas para las regiones 19S y 20S del proteasoma 26S en *C. canephora*.

Se identificaron nueve y once genes que codifican a las subunidades alfa (α) y beta (β) del proteasoma 20S, respectivamente en *C. canephora*. La longitud de los genes que codifican a las subunidades alfa (α) y beta (β) variaron entre 729 pares de base (pb) y 8024 pb, y 530 pb y 6212 pb, respectivamente (Tabla 2.1).

Por otro lado, se identificaron trece y siete genes que codifican a las subunidades RPN y RPT, respectivamente en *C. canephora*. La longitud de los genes que codifican a las subunidades RPN y RPT variaron entre 2059 pb y 8810 pb, y 3944 pb y 5582 pb, respectivamente (Tabla 2.2).

Cuadro 2.1. Genes que codifican las subunidades alfa (α) y beta (β) del proteasoma 20S en *C. canephora*.

subunidad (α)	ID del gen	locus	inicio	final	longitud del gen (pb)	longitud de la proteína (aa)
PAA1	Cc06_g12310	Chr6	9975650	9981044	5395	248
PAB1	Cc07t05020.1	Chr7	3512259	3518821	6563	234
PAB2	Cc04t13010.1	Chr 4	15302503	15311837	9335	259
PAC1	Cc09g05140	Chr9	4569531	4570259	729	146
PAC2	Cc09t05130.1	Chr9	4566937	4569428	2492	146
PAD1	Cc02t16280.1	Chr2	15071164	15074275	3112	250
PAE1	Cc04t00740.1	Chr4	532288	536793	4506	238
PAF1	Cc10t02620.1	Chr10	2005431	2009860	4430	190
PAG1	Cc06t22720.1	Chr6	35692100	35700123	8024	250
subunidad (β)	ID del gen	locus	inicio	final	longitud del gen (pb)	longitud de la proteína (aa)
PBA1	Cc00t00190.1	Chr0	337667	342256	4590	237
PBB1	Cc11t16060.1	Chr11	32334007	32337275	3269	274
PBC1	Cc10t12240.1	Chr10	21568827	21575038	6212	205
PBD1	Cc03t04050.1	Chr3	3051228	3055188	3961	205
PBE1	Cc11t16770.1	Chr11	32799532	32804634	5103	340

PBE2	Cc07t08060.1	Chr7	5933165	5935757	2593	230
PBF1	Cc02t36680.1	Chr2	51489428	51492871	3444	224
PBF2	Cc07t09940.1	Chr7	7262589	7266377	3789	224
PBG1	Cc01t11450.1	Chr1	30143732	30147565	3834	232
PBG2	Cc01t06380.1	Chr1	23428355	23433237	4883	308
PBG3	Cc01t06420.1	Chr1	23447969	23448498	530	148

Cuadro 2.2. Tabla de los genes que codifican para las subunidades RPN y RPT del proteasoma 19S en *C. canephora*.

subunidad RPN	ID del gen	locus	inicio	final	longitud del gen (pb)	longitud de la proteína (aa)
RPN1A	Cc05t07690.1	Chr5	22394758	22396816	2059	295
RPN1B	Cc05t07700.1	Chr5	22396956	22402495	5540	591
RPN2A	Cc03t07730.1	Chr3	7155674	7163242	7569	1005
RPN3A	Cc04t03370.1	Chr4	2494024	2501658	7635	487
RPN3B	Cc09t09820.1	Chr9	20736996	20743526	6531	487
RPN5A	Cc07t16710.1	Chr7	13753756	13762565	8810	422
RPN6	Cc11t12590.1	Chr11	29589769	29593714	3946	423
RPN7	Cc04t10290.1	Chr4	9540919	9545527	4609	386
RPN8A	Cc02t06850.1	Chr2	5418066	5423315	5250	310

RPN9A	Cc08t03830.1	Chr8	5239382	5245576	6195	386
RPN10	Cc07t10940.1	Chr7	8041416	8045618	4203	401
RPN11	Cc10t04380.1	Chr10	3360136	3363690	3555	312
RPN12A	Cc08t16370.1	Chr8	30902455	30906795	4341	267

Subunidad RPT	ID del gen	locus	inicio	final	Longitud del gen (pb)	longitud de la proteína (aa)
RPT1A	Cc04t00590.1	Chr4	446850	451598	4749	430
RPT2A	Cc01t17400.1	Chr1	34699642	34703649	4008	444
RPT3	Cc01t15400.1	Chr1	33364280	33369861	5582	326
RPT4A	Cc02t17230.1	Chr2	15875496	15879439	3944	399
RPT5A	Cc02t34180.1	Chr2	47526040	47530829	4790	424
RPT6A	Cc04t03870.1	Chr4	2938702	2942731	4030	420
RPT6B	Cc06t09040.1	Chr6	7222372	7227812	5441	426

2.3.2. Análisis filogenético de los genes que codifican para las proteínas de las regiones 19S y 20S del proteasoma 26S en *C. canephora*

Para estudiar la clasificación de las proteínas e investigar las relaciones filogenéticas de los genes de las subunidades alfa (α), beta (β), RPN y RPT del proteasoma 26S, se construyó un árbol filogenético con las secuencias de proteínas de las subunidades alfa (α), beta (β), RPN y RPT del proteasoma 26S de *A. thaliana* y *C. canephora* (Figura 2.1 y 2.2). Se observó que los genes que codifican las subunidades beta (β): PBA, PBB, PBC, PBD, PBE, PBF y PBG de *A. thaliana* y *C. canephora* se agruparon en los mismos clados, respectivamente (Figura 2.1 A). De manera similar, los genes que codifican a las subunidades alfa (α): PAA, PAB, PAC, PAD, PAE, PAF y PAG de *A. thaliana* y *C. canephora* se agruparon en los mismos clados, respectivamente. La

subunidad CcPAC2 no se encontró en el clado del grupo de los genes que codifican la subunidad PAC (Figura 2.1 B).

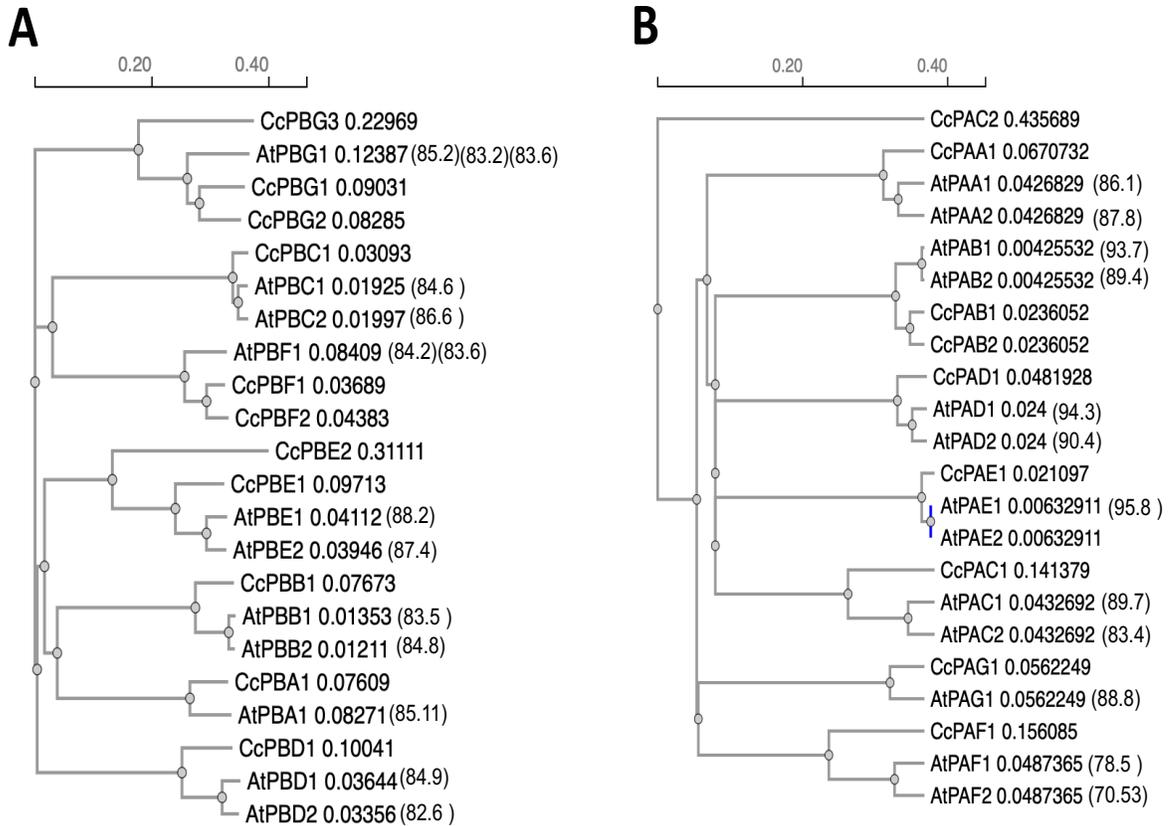


Figura 2.1. Árboles filogenéticos de las subunidades 20S del proteasoma de *A. thaliana* y *C. canephora*. (A) subunidades beta; (B) subunidades alfa. Los árboles filogenéticos de las secuencias de aminoácidos se generaron utilizando ClustalW (Madeira F et al., 1997). La distancia a lo largo del eje horizontal que separa dos secuencias es proporcional a la divergencia entre las secuencias. La similitud entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades 20S del proteasoma de *A. thaliana* y *C. canephora* se indica entre paréntesis a la derecha.

Por otro lado, las subunidades RPN1, RPN2, RPN3, RPN5, RPN6, RPN7, RPN8, RPN9, RPN10, RPN11 y RPN12 de *A. thaliana* y *C. canephora* se agruparon en los mismos clados, respectivamente. El CcRPN1A se observó en un clado diferente al de los genes RPN1 (Figura

2.2 A). Los genes que codifican las subunidades RPT1, RPT2, RPT3, RPT4, RPT5 y RPT6 de *A. thaliana* y *C.canephora* se agruparon en los mismos clados, respectivamente (Figura 2.2. B).

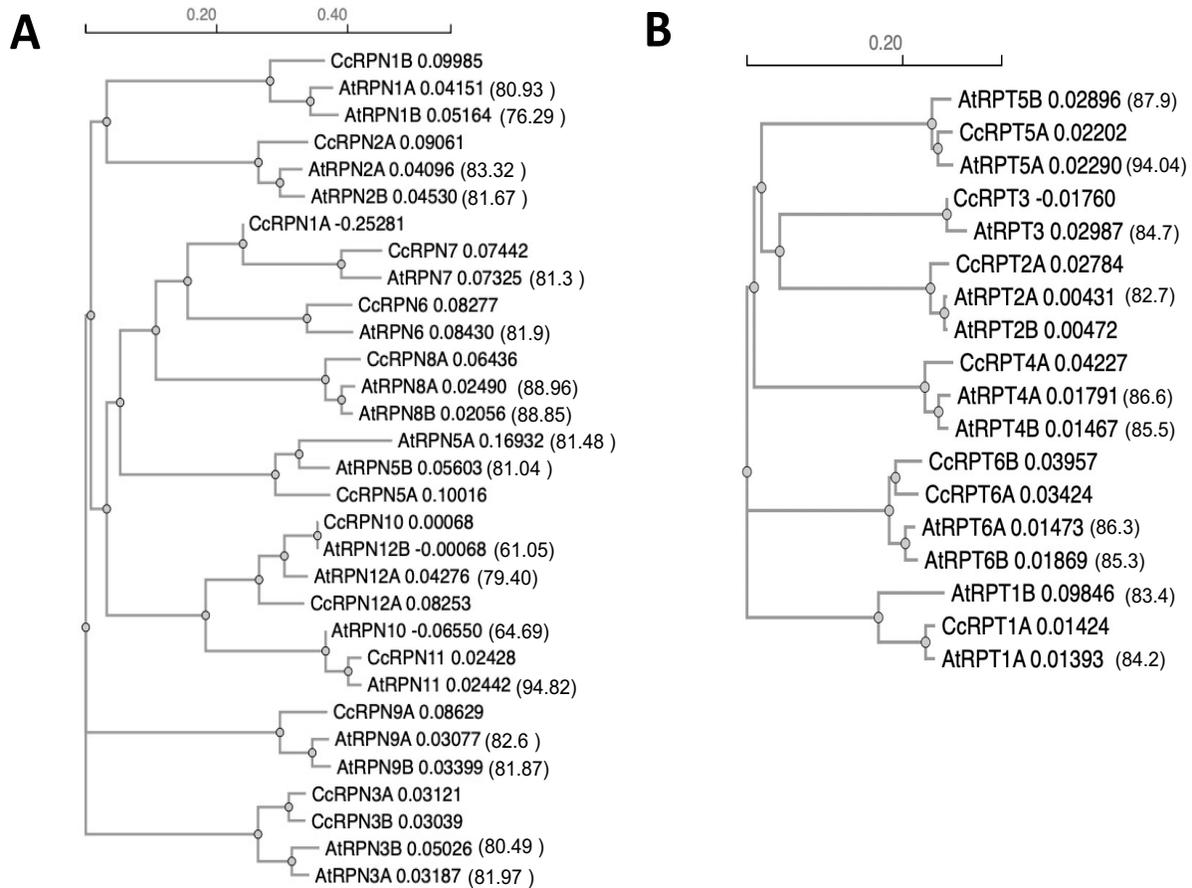


Figura 2.2. Árboles filogenéticos de las subunidades 19S del proteasoma de *A. thaliana* y *C. canephora*. (A) subunidades RPN; (B) subunidades RPT. Los árboles filogenéticos de las secuencias de aminoácidos se generaron utilizando ClustalW (Madeira F et al., 1997). La distancia a lo largo del eje horizontal que separa dos secuencias es proporcional a la divergencia entre las secuencias. La similitud entre las secuencias de aminoácidos de las subunidades 19S del proteasoma de *A. thaliana* y *C. canephora* se indica entre paréntesis a la derecha.

2.3. CONCLUSIONES

En este trabajo, se identificaron 13 genes que codifican las subunidades RPN y 7 que codifican las subunidades RPT en *C. canephora*. En *A. thaliana* hay 18 genes que codifican las subunidades RPN y 11 genes que codifican las subunidades RPT (Gemperline et al., 2019). *A. thaliana* ha tenido eventos de duplicación de genes que codifican a las subunidades RPT y RPN. Por otro lado, se realizó árboles filogenéticos de las subunidades RPN y RPT de *C. canephora* y *A. thaliana*

y se observó que las subunidades se agruparon en los mismos clados, respectivamente. Estos datos sugieren que los aminoácidos de las subunidades RPT y RPN se encuentran altamente conservados entre estas dos especies y posiblemente conservan funciones similares.

También, se identificaron los genes que codifican las subunidades alfa (α) y beta (β) del proteasoma 20S en *C. canephora*. Se encontraron 9 genes que codifican las subunidades alfa (α) y 11 genes codifican las subunidades beta (β). En *A. thaliana* se conoce que hay 13 genes que codifican las subunidades alfa (α) y 11 genes que codifican las subunidades beta (β) (Gemperline et al., 2019). Estos datos son interesantes, ya que sugieren una duplicación de los genes que codifican la subunidad alfa (α) del proteasoma 20S en *A. thaliana*. Por otro lado, se realizó árboles filogenéticos de las subunidades alfa (α) y beta (β) de *C. canephora* y *A. thaliana* y se observó que las subunidades se agruparon en los mismos clados, respectivamente. Estos datos muestran que los aminoácidos de las subunidades alfa (α) y beta (β) se encuentran altamente conservados entre estas dos especies y posiblemente conservan funciones similares.

De acuerdo con lo anterior, estos resultados sugieren que el proteasoma 26S de *C. canephora* conserva su función en la degradación de proteínas. Además, estos resultados facilitarán el estudio de la expresión de los genes del proteasoma 26S durante la ES en *C. canephora* y permitirán comprender su papel en la regulación molecular de la ES.

CAPÍTULO III: PERFIL PROTEÓMICO DE LA ES DE *C. canephora* EN CONDICIONES DE AUXINAS Y CITOCININAS

Este capítulo fue publicado en un artículo de investigación en la revista *Peer Journal* en 2024. Carrillo-Bermejo Evelyn A., Ligia Brito-Argáez, Rosa M. Galaz-Ávalos, Felipe Barredo-Pool, Víctor M. Loyola-Vargas, and Victor Aguilar-Hernández, PROTEIN PROFILE CHANGES DURING PRIMING EXPLANTS TO EMBRYOGENIC RESPONSE IN *Coffea canephora*: IDENTIFICATION OF THE RPN12 PROTEASOME SUBUNIT INVOLVED IN THE PROTEIN DEGRADATION, *Peer J.*, 12: e18372, (2024). DOI: <https://doi.org/10.7717/peerj.18372>.

3.1. INTRODUCCIÓN

La plasticidad de las células vegetales es un aspecto fascinante del desarrollo de las plantas, ya que pueden responder para formar embriones a través de la embriogénesis somática (ES). A pesar de la plasticidad inherente y natural de las células vegetales, éstas pueden responder a la embriogénesis y mantener la competencia embriogénica mediante cultivos suplementados con diferentes compuestos como, por ejemplo, los reguladores del crecimiento vegetal (RCV). Los medios de cultivo aplicados a la ES se han establecido para permitir la regeneración de plantas de diferentes especies de plantas (Etienne et al. 2018; Guan et al. 2016; Loyola-Vargas 2016a; Maruyama & Hosoi 2019; Pilarska et al. 2016). La transición de células somáticas a embriogénicas se inicia con una intensa remodelación del proteoma (Aguilar-Hernández & Loyola-Vargas 2018; Awada et al. 2019; Campos et al. 2016; Karami et al. 2009; Quintana-Escobar et al. 2019; Wójcikowska & Gaj 2017), que implica cambios en la abundancia de proteínas (Ge et al. 2015; Gomez-Garay et al. 2013; Hou et al. 2023; Zhu et al. 2018), especialmente durante las etapas ES (Gomez-Garay et al. 2013; Imin et al. 2005; Rode et al. 2012), y modificaciones postraduccionales como la acetilación o la fosforilación (Aroonluk et al. 2019; Xavier et al. 2022; Xia et al. 2016; Zhang et al. 2023). El análisis comparativo proteómico en muestras de explantes como callo embriogénico (CE), callo no embriogénico (CNE) y diferentes estadios de la ES han revelado proteínas claves asociadas a la competencia embriogénica y al proceso de desarrollo de ES (Aguilar-Hernández & Loyola-Vargas 2018; Heringer et al. 2018). Entre las clases de proteínas identificadas se encuentran enzimas relacionadas al metabolismo y señalización de los captadores de EROS, enzimas proteolíticas, proteínas chaperonas moleculares, proteínas del citoesqueleto, del metabolismo de las poliaminas, proteínas relacionadas a la regulación transcripcional, entre otras.

Señales particularmente influyentes para la reprogramación de las células puede verse influenciada por los RCV auxinas y citocininas, que impulsan cambios en la transcripción (Quintana-Escobar et al. 2023; Quintana-Escobar et al. 2019; Salaün et al. 2021; Salvo et al. 2014). Los genes de respuesta a citocinina de tipo *A-ARR* (*Arabidopsis response regulator*) conducen a la regulación negativa de la señalización de citocinina y la proliferación de embriones somáticos, mientras que los de tipo *B-ARR* y el factor de respuesta a auxina (*ARF*) de unión al ADN promueven la proliferación de embriones somáticos (Su et al. 2014; Wójcikowska & Gaj 2017). Además de la biosíntesis precisa, la acumulación y la distribución de auxina y citocinina (Correia et al. 2012; Hatanaka et al. 1991; Kumaravel et al. 2017; Li et al. 2022; Márquez-López et al. 2018; Michalczuk et al. 1992; Zhou et al. 2016), la activación de la biosíntesis de proteínas, las modificaciones postraduccionales de proteínas o la eliminación de proteínas innecesarias pueden ser requeridas para la reprogramación de la célula y lograr la ES.

En este trabajo se utilizó el protocolo de ES establecido por el grupo del Dr. Loyola en el CICY para *C. canephora* el cual, comprende en dos etapas continuas de cultivo *in vitro*. Una primera etapa denominada pretratamiento que comprende medios suplementados con auxinas y citocinas y una segunda etapa denominada inducción que comprende medios libres de auxinas y suplementado con citocininas (Quiroz-Figueroa et al. 2006). Los embriones somáticos cotiledonares producidos por este protocolo de ES pueden germinar en medios MS libres de RCV. Los mecanismos moleculares y celulares implicados en la conversión de la célula somática a embrión somático no se conocen por completo. La implicación de proteínas de la síntesis de auxinas dependiente de YUCCA, los factores de respuesta a auxinas (*ARFs*) y la señalización dependiente de auxinas (*Aux*)/*IAA*, y el transporte de auxinas mediado por *Pin* (*PIN*) en la ES de *C. canephora* se ha reportado a través de estudios bioquímicos y RNA-seq (Quintana-Escobar et al. 2019; Uc-Chuc et al. 2020). La modulación y la dinámica de las proteínas durante el ES de *C. canephora* están emergiendo (Quintana-Escobar et al. 2023), pero las proteínas responsables de la reprogramación de la respuesta embriogénica aún están pendientes de ser determinadas. Aquí, nos centramos en determinar y comparar el perfil proteico de explantes en forma de disco provenientes de hojas de plantas cultivadas en medios suplementados con y sin RCV, denominados +NAA-KIN y -NAA-KIN, respectivamente, que son utilizadas para la inducción de la ES en *C. canephora*.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Preparación del material vegetal, inducción de la ES y conteo de embriones somáticos.

Se utilizaron plantas *in vitro* de nueve meses de edad cultivadas en medio Murashige y Skoog (MS). Se empleó el protocolo de ES reportado por Quiroz et al., 2006 con las siguientes modificaciones. Se transfirieron las plantas de 9 meses de edad a medio MS suplementado con 0.54 μM de ácido 1-naftalenacético (NAA) y 2.32 μM de kinetina (KIN) durante 14 días, las cuales se denominarán en este capítulo +NAA-KIN, o se mantuvieron en MS sin ningún RCV, las cuales se denominarán en este capítulo -NAA-KIN. A continuación, se tomaron las primeras 6 hojas de la planta, se cortaron con un sacabocado de 0.8 cm y los explantes resultante se cultivaron en medio Yasuda (Yasuda et al. 1985) líquido suplementado con 5 μM de 6-benciladenina (BA) en oscuridad durante 100 días. Los embriones somáticos derivados de los explantes +NAA-KIN y -NAA-KIN se observaron y contaron bajo un estereomicroscopio (SMZ745T; Nikon, Tokio, Japón) con una cámara adaptada (EOS Rebel T3i; Canon, Melville, NY, EE.UU.) con un aumento de 10X después de 100 días de la inducción de los explantes cultivados en el medio Yasuda. Se utilizó el software de análisis estático GraphPad prism 9 versión 9.0.1 y la prueba t-Student para analizar las diferencias significativas entre los tratamientos. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de $P \leq 0.0001$.

3.2.2. Preparación de muestras de proteínas para electroforesis bidimensional en gel de dodecil sulfato sódico-poliacrilamida

Después de 14 días de cultivo se tomaron los tejidos foliares de las plantas +NAA-KIN y -NAA-KIN, y las proteínas se extrajeron triturando los tejidos foliares en nitrógeno líquido. El polvo resultante se homogeneizó en un amortiguador de extracción compuesto por 0.7 M de sacarosa, 100 mM de KCl, 500 mM de Tris-Cl (pH 7.5), 50 mM de EDTA, 50 mM de ditioneitol (DTT), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo y un cóctel de inhibidores de proteasas en condiciones de hielo (Hurkman & Tanaka 1986). Todos los pasos realizados y soluciones utilizadas fueron en condiciones de temperatura baja (Aprox. 18°C). Después, se centrifugó el homogeneizado a 15,000 g durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo Eppendorf y se le añadió 10% ácido tricloroacético / acetona al 50% y DTT 5 mM, la mezcla se incubó durante 5 minutos en hielo (Niu et al. 2018). Posteriormente, se centrifugó a 15,000 g, el sobrenadante sedesechó y el precipitado proteico resultante se lavó dos veces con acetona al 80% suplementada con 5 mM de DTT. Por último, se evaporó el residuo de acetona por aire y el precipitado de proteínas se disolvió en un amortiguador de rehidratación compuesto por 8 M de

urea, 1.5 M de tiourea. 1,5 % de CHAPS y 50 mM de DTT. La cantidad de proteína en las muestras se determinó por el método de Peterson (Peterson 1977).

3.2.3. Electroforesis bidimensional en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida y análisis de imagen del gel.

Se utilizaron aproximadamente 900 µg de proteína para una tira IPG de 24 cm con un intervalo de pH lineal entre 3 y 10 (ReadyStrip IPG; Bio-Rad, Hercules, CA, EE.UU.) mediante rehidratación pasiva en gel durante 12 horas. El enfoque isoelectrico se realizó a 20°C y se inició con un gradiente lineal de 100 V durante 4 horas, seguido de 250 V durante 4 horas, 1000 V durante 1 hora, gradiente lineal a 10,000 durante 2 horas, 10,000 V a 80,000 V en 1 hora, y 200 V durante 1 hora. A continuación, las tiras de gel se equilibraron en 5 mL de la solución equilibrada I (6 M de urea, 375 mM de Tris-HCl, pH 8.8, 2% de dodecil sulfato sódico (SDS), 20% de glicerol y 2% de DTT), seguida de un equilibrado en 5 mL de una solución suplementada con 2.5% de yodoacetamida sin DTT. Para el SDS-PAGE, se colocaron tiras de gel equilibradas sobre un gel de poliacrilamida al 12% y se cubrieron con agarosa al 1% (w/v) en solución de equilibrio I. Seguido, se realizó la electroforesis a 12°C con 200 V hasta que el colorante alcanzó el fondo del gel. Se usaron geles de 25 x 20.5 x 1.5 mm y se corrieron en el equipo de electroforesis Protean plus Dodeca Cell System (Bio-Rad). Después de la electroforesis, los geles se lavaron tres veces con agua Milli-Q, se tiñeron durante una hora con la tinción G-250 (PageBlue; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) y se lavaron con agua Milli-Q para eliminar el fondo. Se realizaron tres réplicas biológicas. Las imágenes digitales de los geles se adquirieron a 300 ppp utilizando el sistema ChemiDoc MP (Bio-Rad). El análisis de comparación de las imágenes de los geles, el procesamiento y la comparación cuantitativa de las manchas de proteínas en función de su volumen porcentual se realizaron con el software Melanie versión 8 (GE Healthcare, Chicago, IL, EE.UU.). Para encontrar cambios significativos en la abundancia de proteínas entre las muestras +NAA-KIN y -NAA-KIN se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía a $P < 0.05$ y un cambio de al menos 1.4 veces en el software Melanie.

3.2.4. Digestión de proteínas en gel e identificación mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem

Las manchas con significado estadístico se extrajeron manualmente y se sometieron a digestión en gel. Los péptidos tripticos se desalaron con puntas ziptip como se describe en Huerta-Campo

et al. (2012) (Huerta-Ocampo et al. 2012). Los péptidos se resuspendieron en ácido fórmico al 0.1% y se analizaron utilizando el sistema de cromatografía líquida Easy-nLC-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.) con la columna analítica de cromatografía líquida a nanoescala PepMAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE. UU.). La elución del péptido se realizó con un gradiente binario de agua como fase móvil A y acetonitrilo como fase móvil B suplementado con ácido fórmico al 0.1% y suministrado a $250 \mu\text{L min}^{-1}$ utilizando el siguiente programa: del 5% a 55% de B en 35 minutos, 55% a 100% de B en 5 minutos, 100% de B durante 5 minutos, 100% a 5% de B en 5 minutos seguido de un equilibrado de la columna con 5% de B durante 7 minutos. La espectrometría de masas se realizó utilizando el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) operado en modo de iones positivos y con un potencial easy-nanospray de 1.9 kV. La adquisición dependiente de los datos se realizó en el Orbitrap para el método top-10 con una resolución de 120,000 para la MS completa y un objetivo AGC de 1,000,000 y una resolución de 15,000 y un objetivo AGC de 50,000 para la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Los iones se fragmentaron en la célula de disociación de mayor energía (HCD). El umbral de iones para disparar eventos MS/MS fue de 5,000, y la exclusión dinámica fue de 90 segundos. Para el procesamiento de los datos se utilizó el software Proteome Discovery 2.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.) con MASCOT (Matrix Science Inc., Boston, MA, EE.UU.) y SEQUEST como motores de búsqueda y la base de datos de secuencias de proteínas de *Coffea canephora* (GCA_900059795.1) del National Center for Biotechnology Information. Los parámetros del motor de búsqueda fueron los siguientes: carbamidometilación de la cisteína como modificación fija, oxidación de la metionina como modificación variable, enzima tripsina, máxima escisión omitida 2 y taxonomía de *Coffea*. Se utilizó una base de datos señuelo y sólo se recuperaron coincidencias de proteínas basadas en dos identificaciones exitosas de péptidos. Los datos proteómicos de espectrometría de masas se depositaron en el Consorcio ProteomeXchange a través del repositorio PRIDE (Perez-Riverol et al. 2022) con el identificador de conjunto de datos PXD055039.

3.2.5. Análisis Western blot

Después de 14 días de cultivo, se tomaron los tejidos foliares de las plantas +NAA-KIN y -NAA-KIN, se trituraron 100 mg en mortero con nitrógeno líquido y se homogeneizaron en amortiguador Laemmli (Laemmli 1970). Las proteínas se desnaturalizaron a 95°C por 5 min y se separaron en geles de poliacrilamida al 12% (p/v); Las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie Blue R-250. Posteriormente, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P, Merck Millipore, Estados Unidos).

La membrana se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en TBS o con leche descremada al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente y, se incubó con anti-Ub (dilución 1:5000; ab19169; Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos) o con anti-HIS3 (dilución 1:10000) como control de carga (ab1791, Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos), respectivamente (Aguilar-Hernández et al. 2017). Se utilizó un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) para detectar los inmunocomplejos utilizando reagentes NBT/BCIP solución (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato / solución de cloruro de tetrazolio nitroazul, sustrato de fosfatasa alcalina) de 1 paso (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.).

3.2.6. Análisis de secuencias y diseño de cebadores para *C. canephora*

Dado que se ha reportado que hay dos genes RPN12 en *A. thaliana*, AtRPN12A (AT1G64520.1) y AtRPN12B (AT5G42040.1), y que AtACT2 (AT3G18780.2) es un gen de referencia para la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) (Book et al. 2010; Zhou et al. 2019), los ortólogos de esos genes se identificaron en *C. canephora* empleando búsquedas con BLAST en la plataforma Coffee Genome Hub (<http://www.coffee-genome.org>). *C. canephora* solo tiene un gen CcRPN12 que codifica a la subunidad RPN12 (Cc08t16370.1), con 75.13% y 75.84% de identidad contra *A. thaliana* AtRPN12A y AtRPN12B, respectivamente. El ortólogo de *A. thaliana* AtACT2 en *C. canephora* se identificó como Cc07t17400.1 (CcACT2). Se diseñaron oligonucleótidos específicos para el análisis RT-qPCR de CcRNP12 y CcACT2 de *C. canephora* a partir de las secuencias codificantes (CDS) utilizando el software Primer 3 (<https://primer3.ut.ee>). Los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa ADN-ARTIFICIAL (Guanajuato, México) en una escala de 25 nmol, con la opción de purificación desalada, sin modificaciones en los extremos 5' y 3'.

3.2.7. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

Las plantas de nueve meses se transfirieron a medio MS con o sin NAA-KIN y se mantuvieron durante 14 días. Se utilizó un equivalente a 100 mg de explantes foliares, el ARN total se extrajo utilizando el método de Trizol (invitrogen) descrito por Chomczynski (1993). Se evaluó la integridad del ARN total, en un gel de agarosa a la concentración de 1.2% y observando la presencia de las bandas de las unidades ribosomales 28S y 18S. Después, se evaluó la calidad del ARN midiendo las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Las muestras utilizadas tenían mediciones de la relación A260/A280 entre 1.89 y 1.99. Las

concentraciones de ARN de las muestras procesadas oscilaron entre 240.4 ng/ μ L y 353.4 ng/ μ L. Se utilizó 1 μ g de ARN para sintetizar ADNc, 200 unidades de la transcriptasa inversa ImProm-II™ (Cat # A3802; Promega, Madison, WI, USA) y 0.5 μ g de oligo dT18 (Cat # SO131; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), se siguió paso a paso las instrucciones del manual de la enzima transcriptasa inversa ImProm-II™. Posteriormente, se realizaron las reacciones de PCR en tiempo real. Para cada reacción se empleó 8 μ M de cada uno de los oligos específicos, para el gen ACT2 se emplearon los oligos CcACT2Fwd (5'-AGCAACTGGGATGACATGGA) y CcACTRev (5'-TCCAGCACAATACCAGTCGT) y para el gen RPN12 CcRPN12Fwd (5'-ATTCAAAGCTGCCTTCGTCC) y CcRPN12Rev (5'-CCTCGGGCATCAGTGTAGTA); 10 μ L de QuantiNova Probe PCR Master Mix (Cat. nº 208054; QIAGEN, Hilden, Alemania); y se empleó 100 ng de ADNc como molde para la amplificación por PCR en un volumen final de reacción de 20 μ L. Se utilizó el termociclador Rotor Gene Q MDx (QIAGEN). Se realizaron tres réplicas técnicas para cada reacción. El programa fue el siguiente: 95 °C durante 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C durante 15 segundos y 61 °C durante 30 segundos. Posteriormente, se determinó la expresión relativa del gen RPN12 mediante el método Delta-Delta Ct (2- $\Delta\Delta$ Ct) (Livak & Schmittgen 2001), utilizando como gen de referencia ACT2 (Gutiérrez et al. 2008). Los cambios significativos en la expresión relativa del gen RPN12 en los explantes +NAA-KIN y -NAA-KIN se determinaron mediante una prueba t de Student. Se empleó el software de análisis estadístico GraphPad Prism 9 versión 9.0.1 para analizar los datos de expresión génica con valores estadísticamente significativos de $P \leq 0.05$.

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Acondicionamiento de los explantes con NAA y KIN.

Previamente, en el apartado de materiales y métodos detallamos el protocolo de cultivo *in vitro* de las plantas de *C. canephora* en medios MS suplementados con auxina y citocinina (NAA-KIN) para promover la formación de embriones somáticos a lo largo de los bordes de los explantes. El objetivo de nuestro análisis fue comprender cómo NAA más KIN afectan a la respuesta embriogénica en estas condiciones de la ES. Por ello, las plántulas se cultivaron durante 14 días con o sin NAA-KIN, denominadas +NAA-KIN y -NAA-KIN, respectivamente, y luego las hojas se utilizaron como explantes para inducir la ES mediante BA. El tratamiento con +NAA-KIN no afectó la morfología y anatomía de las hojas de la planta *C. canephora* durante el cultivo de 14 días (Figura 3.1 A). Por otro lado, a los 28 días posteriores a la inducción de la ES los explantes -NAA-KIN mostraron un menor crecimiento de células meristemáticas que se observa como una menor

masa proembriónica a lo largo del borde de los explantes, en comparación de los explantes +NAA-KIN (Figura 3.1 A) Después de 100 días de la inducción de la ES registramos el número de embriones producidos en los explantes (Fig. 3.1 B) Los explantes +NAA-KIN produjeron un mayor número de embriones somáticos en estadio globular. A los 75 días de cultivo los explantes +NAA-KIN produjeron 2 veces más que -NAA-KIN, 128 y 67 embriones globulares por explante, respectivamente. Posteriormente, a los 100 días de cultivo +NAA-KIN presentó 16 veces más embriones somáticos en estadio cotiledonar que -NAA-KIN, 32 y 2 embriones cotiledonares por explante, respectivamente (Fig. 3.1 B). El aumento significativo del número de embriones cotiledonarios en los explantes +NAA-KIN con respecto a los explantes -NAA-KIN sugiere que la +NAA-KIN interviene en el acondicionamiento de los explantes para mejorar la ES.

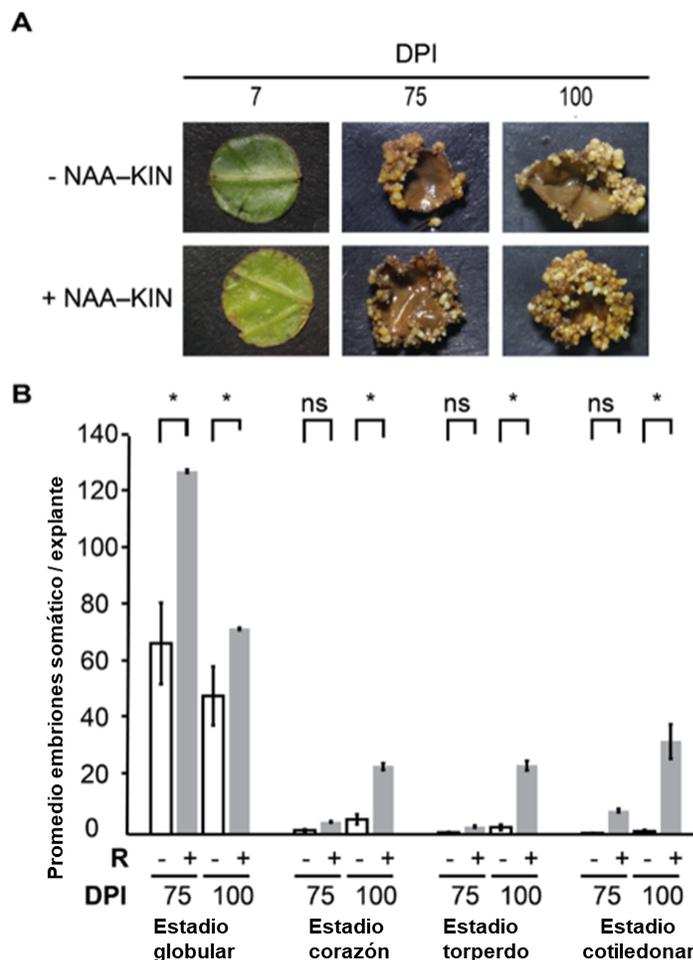


Figura 3.1. Morfología y rendimiento de las plantas +NAA-KIN y -NAA-KIN en la embriogénesis somática de *C. canephora*. (A) Explantes representativos de hojas cortadas de plantas - NAA-KIN y + NAA-KIN después de 7, 75 y 100 días de cultivo en medio líquido Yasuda con BA en oscuridad. DPI indica días

posteriores a la inducción. (B) Cuantificación de embriones somáticos en explantes de hojas cortadas de plántulas -NAA-KIN y +NAA-KIN tras 75 y 100 días de cultivo en medio líquido Yasuda con BA en oscuridad. Las barras blancas indican embriones somáticos producidos con explantes -NAA+KIN, mientras que las barras grises indican embriones somáticos producidos con explantes +NAA+KIN. Cada barra representa el número medio de al menos cinco explantes de tres réplicas independientes. El error representa el error estándar. El asterisco indica una diferencia significativa con $P < 0.0001$.

3.3.2. Análisis de electroforesis bidimensional en gel de dodecilsulfato sódico-poliacrilamida (2D SDS-PAGE)

A continuación, se procedió a comparar los patrones proteicos de los explantes +NAA-KIN y -NAA-KIN mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D SDS-PAGE). Se obtuvieron múltiples geles 2D SDS-PAGE para representar tres repeticiones técnicas y biológicas. El mapa de referencia contenía 230 manchas de proteínas con mayor acumulación entre pI de 4 a 7 y de 50- a 100 kDa MW. Se identificaron 42 manchas diferenciales con un cambio de al menos 1.4 veces y un valor P de 0.05 con la prueba de análisis de varianza unidireccional. Cuarenta y un puntos se acumularon diferencialmente al alza y uno a la baja (Figura 3.2 A y B). Los cinco puntos proteínicos con mayor relación de abundancia fueron 1, 3, 4, 2 y 7. Doce de las 42 manchas diferenciales 2D-PAGE se identificaron con cromatografía líquida MS/MS utilizando el conjunto de datos del genoma de *C. canephora* depositado en el National Center for Biotechnology Information. Los cambios de acumulación de los puntos 1 (CDP17851), 4 (CDP17853) y 2 (CDP17852), los cuales son quitinasas A de clase III, y el punto 3 (CDP12187), el cual es la subunidad RPN12 del proteasoma 26S, fueron 5 veces más acumulados en los explantes +NAA-KIN en comparación con los explantes -NAA-KIN (Tabla 3.1).

Por otro lado, entre las proteínas que desempeñan un papel en el proceso metabólico de las proteínas se encuentran una proteína ribosómica CDP14047 (punto 37), la leucina aminopeptidasa CDP04332 (punto 17), la proteasa similar a la papaína CDP01294 (punto 7) y la subunidad del complejo proteolítico dependiente de ATP 26S proteasoma CDP12187 (punto 3). Entre las proteínas involucradas en el plegamiento se encuentran una chaperonina del cloroplasto CPN60 CDP18583 (punto 53) y una proteína mitocondrial de choque térmico 60 CDP099385 (punto 53). La proteína fosfatasa está implicada en la fosforilación reversible de proteínas CDP17727 (punto 7) y en la organización de la cromatina mediante el reconocimiento de dinucleótidos metilados CpG así CDP05220 (punto 46). Las proteínas asociadas a la oxidación-

reducción fueron la tioredoxina reductasa dependiente de NADPH CDP01751 (punto 59) y la isoflavona reductasa CDP07496 (punto 59), el proceso catabólico de la glicina CDP08258 (punto 17), la fotosíntesis CDP20139 y CDP17859 (puntos 50 y 7), y el proceso metabólico de los carbohidratos CDP17851, CDP17853 y CDP17852 (puntos 1, 4 y 2) (Tabla 1).

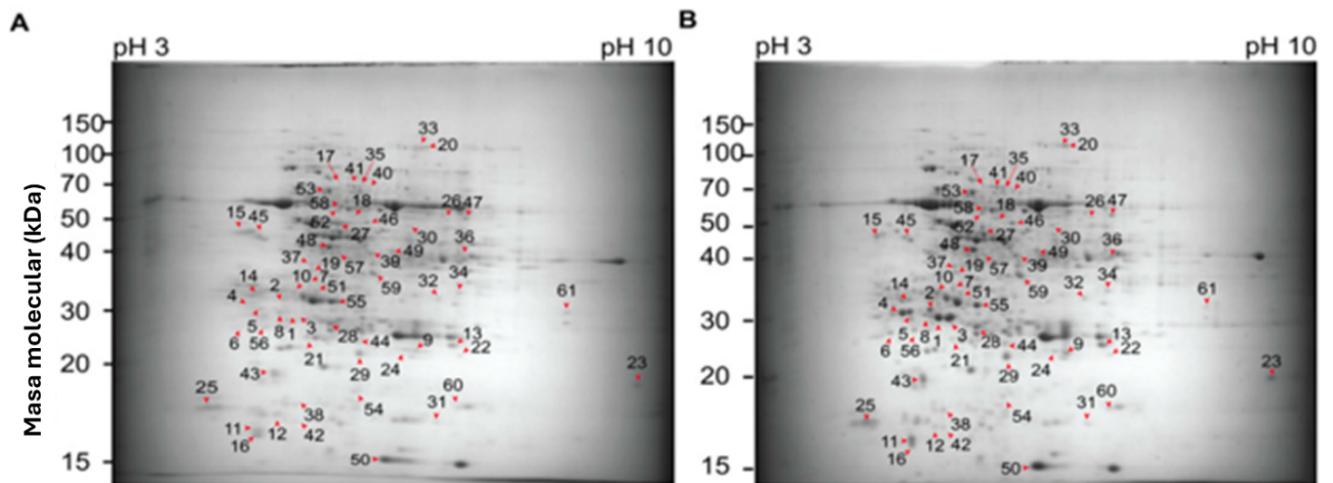


Figura 3.2. Imágenes de gel electroforesis bidimensional y análisis de las manchas con abundancia diferencial en los explantes de hoja cortada antes de cultivarse en medio líquido Yasuda en oscuridad. (A) Imágenes representativas del gel de las muestras de explantes de hoja cortada -NAA-KIN. (B) Imágenes representativas del gel de las muestras de explantes de hoja cortada +NAA-KIN. Las proteínas acumuladas diferencialmente se tiñeron con Coomassie G-250 coloidal. Las flechas rojas indican manchas de proteínas acumuladas diferencialmente.

Cuadro 3.1. Lista de proteínas con abundancia diferencial identificadas por LC-MS/MS.

Punto	Función de la proteína	Genbak/ Coffe ID	Mr		Anova (p)	Cober tura de secue	Punt aje Mas cot	Radio + NAA- KIN /
			/pl teóri co	Mr /pl expe				

				rime		ncias			encia	-
				ntal		(%)			s HT	NAA- KIN
Procesos metabólicos de carbohidratos										
	Quitinasa	CDP178								
	A clase III	51/								
	(CHIA/LY	Cc05_g0	35.6/	29.8/	0.0					
1	S1)	0760	5.86	5.20	09	6	18	119	1.96	11.5
	Quitinasa	CDP178								
	A clase III	53/			3.9					
	(CHIA/LY	Cc05_g0	34.9/	30.6/	1E-					
4	S1/SE2)	0780	5.03	4.75	05	7	10	157	10.43	7.6
	Quitinasa	CDP178								
	A clase III	52/			4.7					
	(CHIA/LY	Cc05_g0	35.9/	31.2/	3E-					
2	S1)	0770	5.35	5.11	04	15	29	214	15.8	7.5
Procesos metabólicos de proteínas										
	Partícula									
	Regulador									
	a No-	CDP121								
	ATPasa	87/			1.3					
	12a	Cc08_g1	30.8/	29.8/	2E-					
3	(RPN12A)	6370	5.24	5.34	06	12	5	48	0	8.5
	Respuesta									
	a la	CDP012								
	deshidrata	94/			1.1					
	ción 21a	Cc10_g0	51.4/	34.8/	2E-					
7	(RD21A)	4820	5.16	5.38	04	14	10	50	7.37	2.5
	Probable									
	proteína	CDP177								
	fosfatasa	27/			1.1					
	2C 71	Cc00_g0	31.5/	34.8/	2E-					
7	(WIN2)	2680	5.16	5.38	04	7	6	128	6.65	2.5
Fotosíntesis										

	ribulosa- 1,5- bisfosfato carboxilas a	CDP201								
	subunidad pequeña	39/ Cc00_g1	18.2/ 15.1/	0.0			28			
50	(SSU11)	5710	8.22	6.40	40	32	7	1288	71.55	1.9
	Subunidad p del fotosistem a II, subunidad p-1 del fotosistem a II (PSII- P)	CDP178 59/ Cc05_g0	28.5/ 34.8/	0.0						
7		0840	8.1	5.38	12	17	13	67	3.54	2.5

Proceso catabólico de la glicina

	Glicina descarboxi lasa P- proteína 2	CDP082								
	(GLDP2)	58/ Cc08_g1	112.7 72.4/	0.0						
17		0590	17.8	5.74	06	8	23	168	10.71	1.8
	Homólogo de la leucotrien o A-4 hidrolasa	CDP043								
	putativa	32/ Cc09_g0	69.2/ 72.4/	0.0						
17		2360	5.54	5.74	06	13	48	581	26.17	1.8

Ribosoma

	Proteína ribosómica ácida 60S	CDP140								
		47/					3.5			
		Cc02_g0	34.3/ 38.8/	6E-						
37		6780	5.1	5.39	04	13	19	84	3.84	1.7

P0
(RPP0A)

Replegamiento y plegamiento de proteínas

	Chaperoni									
	na-60	CDP185								
	beta2	83/								
	(CPN60β2	Cc01_g0	64.6/	67.2/	0.0					
53)	0200	5.77	5.61	33	19	33	252	25.1	1.6
	Proteína									
	de choque									
	térmico	CDO993								
	60-3b	85/								
	(HSP60-	Cc03_g0	61.1/	67.2/	0.0					
53	3B)	7040	5.76	5.61	10	11	11	118	9.58	1.6

Actividad antioxidante

	Tiorredoxi									
	na									
	reductasa									
	dependien									
	te de	CDP017								
	NADPH (51/								
	NTR2/NT	Cc07_g1	34.9/	37.0/	0.0					
59	RA)	2230	6.24	6.18	03	9	6	55	5.41	1.5
		CDP074								
		96/								
	Isoflavona	Cc10_g0	33.7/	37.0/	0.0					
59	reductasa	2660	7.06	6.18	03	11	7	71	2.35	1.5

Organización de la cromatina

	Proteína									
	13 del	CDP052								
	dominio	20/								
	de unión	Cc02_g0	52.9/	49.9/	0.0					
46	al metil-	3140	6.35	6.09	16	11	3	0	NA	1.5

cpg
(MBD13)

Función desconocida										
	N- acilneura minato-9- fosfatasa putativa	CDP095 30/ Cc06_g1	34.2/ 6.32	34.8/ 5.38	0.0 12					
7	(NAMP) Proteína similar a la proteína fijadora de	8960 CDP128 34/ Cc07_g1	6.32 9.29	5.38 9.18	12 29	6 19	4 7	113 126	3.42 5.89	2.5 1.7
23	citrato	6910	9.29	9.18	29	19	7	126	5.89	1.7

3.2.3. Análisis de la expresión relativa del RPN12 y western blot de los explantes -NAA-KIN o + NAA-KIN con el anticuerpo ubiquitina

La respuesta embriogénica y su relación con la alteración del proteoma a través de la activación de la biosíntesis de proteínas, las modificaciones postraduccionales de proteínas o la eliminación de proteínas innecesarias se han correlacionado mediante análisis bioquímicos y morfológicos (Aguilar-Hernández & Loyola-Vargas 2018; Gomez-Garay et al. 2013; Kumaravel et al. 2017). El complejo multicatalítico del proteasoma 26S dependiente de ATP es responsable de la degradación específica de proteínas marcadas con ubiquitinas (Vierstra 2009). En este estudio, se descubrió que la subunidad proteica CcRPN12 del complejo proteolítico 26S proteasoma dependiente de ATP estaba regulada al alza. A continuación, optamos por investigar si el aumento de la abundancia de la proteína CcRPN12 en los explantes + NAA-KIN estaba determinado por el nivel de transcripción utilizando qPCR con el gen CcACT2 como referencia. No hubo diferencias en la cantidad de CcRPN12 en los explantes + NAA-KIN o - NAA-KIN (Figura 3.3 A), lo que sugiere la existencia de un mecanismo post-transcripcional que conduce a la regulación al alza de CcRPN12 en los explantes + NAA-KIN. La proteína RPN12 es esencial para el ensamblaje del proteasoma (Boussardon et al. 2022; Smalle et al. 2002), por lo que la alteración de la abundancia de CcRPN12 podría afectar al conjunto de proteínas ubiquitinadas. Una de las formas generales de visualizar la ubiquitinación puede lograrse mediante western blot

contra ubiquitina (Aguilar-Hernández et al. 2017). Dado que dentro de las proteínas identificadas en este estudio están implicadas en el proceso catabólico de proteínas dependiente del proteasoma 26S, determinamos la mancha de ubiquitinación en los explantes - NAA-KIN y + NAA-KIN mediante western blot con anti-ubiquitina y utilizando anti-histona 3 como control de carga. Tanto los explantes - NAA-KIN como los + NAA-KIN mostraron una mancha de ubiquitinación similar en el alto MW (Figura 3.3 B), lo que sugiere que el proteasoma 26S está activo y que probablemente un pequeño grupo de conjugados de ubiquitina participa en la totipotencia de los explantes para producir embriones somáticos de forma eficiente.

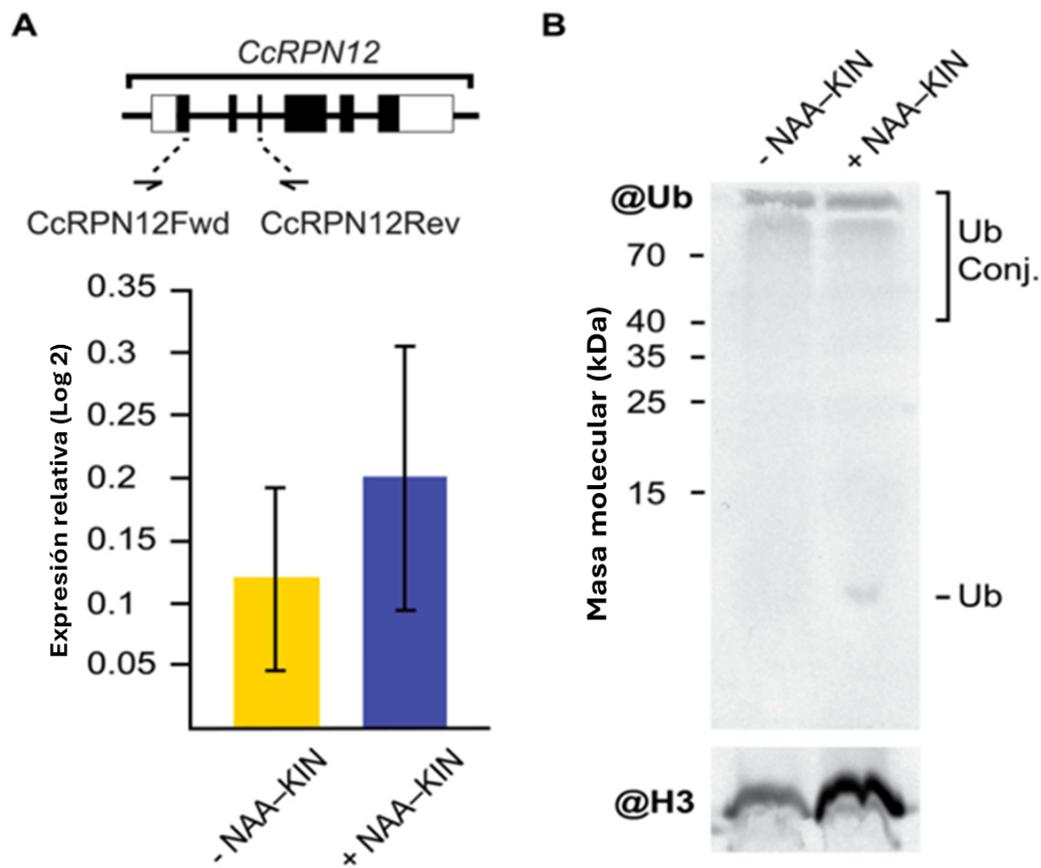


Figura 3.3. Expresión relativa del gen *CcRPN12* y western blot de los conjugados de ubiquitina en plantas - NAA-KIN y + NAA-KIN. (A) Diagrama del gen *CcRPN12* y su patrón de expresión mediante RT-qPCR. Las líneas denotan intrones y los recuadros denotan exones. Los valores de cambio log₂-fold se determinaron mediante RT-qPCR para *CcRPN12* en explantes de hoja cortada de plantas -NAA-KIN y + NAA-KIN antes de pasar al cultivo en medio líquido Yasuda en oscuridad. (B) Western blot de los conjugados de ubiquitina en explantes de hojas

cortadas de plantas - NAA-KIN y + NAA-KIN antes del cultivo en medio líquido Yasuda en oscuridad. Se indican el monómero y los conjugados de ubicuitina. El anticuerpo contra la histona 3 (H3) se utilizó como control de carga.

3.4. DISCUSIÓN

La proliferación de embriones somáticos se ve afectada en gran medida por la composición del medio de cultivo *in vitro* y las especies de plantas, como lo demuestra los diferentes medios de cultivos usados en la ES del género *Coffea* (Aguilar et al. 2022; Loyola-Vargas et al. 2016b). Los esfuerzos recientes para dilucidar los factores que impulsan la formación de embriones somáticos en los bordes de los explantes han llevado al descubrimiento de la implicación de la síntesis de novo de auxinas y la señalización mediada por ARF (Uc-Chuc et al. 2020). Este trabajo ha confirmado que una planta cultivada en medio suplementado con auxinas y citocininas permite una eficiente inducción de la ES a lo largo de los explantes de sus hojas cortadas y cultivadas en medios con BA. Reportamos que la auxinas y citocininas promueve una mayor acumulación de proteínas involucradas en el metabolismo y el plegamiento de proteínas, fotosíntesis, actividad antioxidante y regulación transcripcional se acumulan en los tejidos foliares usados como explantes. Se requiere una validación de las abundancias de las proteínas identificadas en los puntos solapados (Hunsucker & Duncan 2006; Pietrogrande et al. 2003), igual que el uso de geles IPG estrechos o enfoques de proteómica shotgun.

Para estudiar el impacto del cultivo de los explantes foliares con auxina y citocinina durante 14 días antes de inducir ES mediante BA, en este trabajo se empleó un protocolo desarrollado en *C. canephora* para lograr ES directa (Quiroz-Figueroa et al. 2006a). El protocolo de ES comprende explantes de hoja cortada, donde a través de BA las respuestas embriogénicas se dan a lo largo de los bordes de la hoja cortada (explantes). Cuando la embriogénesis somática se realizó con dos tipos de explantes utilizando explantes cultivados con dos RCV (0.54 μ M auxina ácido 1-naftalenacético (NAA) + 2.32 μ M citocinina kinetina (KIN)) durante 14 días o cultivados libre de RCV durante 14 días como testigo, se ha mostrado el impacto de cultivar explantes de hoja con RCV en la respuesta embriogénica a través de medios con BA. Las plantas cultivadas en medios libres de RCV (-NAA-KIN) como fuentes de explantes mostraron significativamente una menor totipotencia que las cultivadas con auxina y citocinina (+ NAA-KIN), ya que produjeron menos embriones somáticos. Nuestros hallazgos confirman que bajo condiciones apropiadas de cultivo *in vitro*, puede ocurrir la proliferación de embriones somáticos (Bidabadi & Jain 2020; Quiroz-Figueroa et al. 2002; Yasuda et al. 1985). La importancia del balance de RCV para promover la

ES está bien documentada. En específico, se ha reportado un incremento endógeno en la abundancia de auxinas y citocininas cuando las plántulas se cultivan con + NAA-KIN (Avilez-Montalvo et al. 2022; Ayil-Gutiérrez et al. 2013), por lo que el cambio transitorio en la relación citocinina/auxina mediado por el cultivo con + NAA-KIN contribuye a la respuesta embriogénica. El equilibrio de RCV para la expresión de SE también se ha observado en *Medicago falcata* (Ivanova et al 1994).

La plasticidad del desarrollo que conduce a la formación del embrión por embriogénesis somática directa se ha relacionado no solo con los RCV, sino también con la presencia de reguladores reductivos y oxidantes, el uso de inhibidores epigenéticos, pequeños péptidos, aminoácidos como la L-prolina y la temperatura de cultivo (Guo et al. 2024; Almeida et al. 2012; Couillerot et al. 2012; Fehér 2015; Fehér 2008). Se ha observado la acción sinérgica de los RCV en la inducción de ES en *C. arabica* cuando se utilizó 24-epibrassinolid (24-epiBR) con 2iP en la ES (Chone et al. 2018).

Dado que la proliferación de embriones somáticos se produce tanto en los explantes de hoja cortada -NAA-KIN como en los +NAA-KIN, lo más probable es que en los explantes haya múltiples tipos de células embriogénicas que muestren respuestas proliferativas específicas. Es el momento de especular que un tipo de célula embriogénica experimenta proliferación somática de forma dependiente de citocinina que ocurre en los explantes -NAA-KIN con BA, mientras que el otro requiere previo acondicionamiento por auxinas y citocininas que ocurre en los explantes +NAA-KIN a través de BA. La evidencia sugiere que el acondicionamiento de plantas con auxinas y citocinina facilita la proliferación unicelular de embriones somáticos a lo largo de los bordes de las hojas cortadas cultivadas en BA (Quiroz-Figueroa et al. 2002). En cultivo *in vitro*, la respuesta embriogénica específica en *C. canephora* se explica parcialmente por la percepción de las auxinas y citocininas exógenas seguida de la síntesis de novo de auxinas y citocininas y su transporte bajo el fotoperiodo (Ayil-Gutiérrez et al. 2013; Uc-Chuc et al. 2020), y los efectos negativos de las auxinas exógenas sobre la ES basada en BA en oscuridad (Hatanaka et al. 1991; Yasuda et al. 1985). El análisis de la ES basado en hoja cortada en *C. canephora* con otras citocinas además de BA, como 2iP y kinetina, ha mostrado que las citocinas son absorbidas en los bordes de la hoja cortada pero no transportadas al interior de la hoja (Hatanaka et al. 1991). El conocimiento sobre la regulación molecular en líneas con proliferación de embriones somáticos está emergiendo en especies como *Cyathea delgadii* Sternb (Mikula et al. 2021).

Las auxinas y citocininas son compuestos maestros reguladores del crecimiento y el desarrollo. Las auxinas son percibidas por las ubicuitinas ligasas E3 respuesta inhibitoria del

transporte1/auxina F-Box (TIR1/AFB) y promueve la interacción de las TIR1/AFB con sustratos de ubiquitinación como las proteínas represoras transcripcionales auxina/ácido indol-3-acético (Aux/IAA) implicadas en la señalización de auxinas (Blázquez et al. 2020; Gray et al. 2001; Tan et al. 2007). La citocinina es percibida por proteínas cinasas de histidina (Arabidopsis Histidine Kinase) que realizan una cascada de fosforilación a través de un sistema de dos componentes e inducen la respuesta por ARRs (Arkhipov et al. 2019; Inoue et al. 2001; Werner & Schmölling 2009). Encontramos que la subunidad del complejo proteico proteasoma 26S RPN12 se acumula al alza de forma dependiente de auxinas y citocininas. Esta subunidad de la región reguladora del proteasoma 26S es esencial para la integridad del proteasoma 26S y la correcta degradación de las proteínas ubiquitinadas. En *A. thaliana*, el mutante *rpn12* muestra fenotipos asociados a hiposensibilidad a auxinas y citocininas con estabilización de proteínas ubiquitinadas, agrandamiento y proliferación celular (Kurepa et al. 2009; Smalle et al. 2002). Basándose en este hecho, una explicación para la mayor proliferación de embriones por plántulas adecuadas con auxinas y citocininas podría ser un aumento de la sensibilidad a la auxinas y citocininas exógenas para el reconocimiento y recambio de proteínas ubiquitinadas. Otras subunidades del proteasoma 26S que han mostrado una abundancia diferencial durante la respuesta embriogénica somática o la maduración embrionaria incluyen PAA1 en *Vigna unguiculata*, *Vitis vinifera* y *Quercus suber* (Gomez-Garay et al. 2013; Nogueira et al. 2007; Zhang et al. 2009), PBA1 en *Vigna unguiculata*, *Pinus pinaster*, y en *Q. suber* (Gomez-Garay et al. 2013; Morel et al. 2014b), PBF1 en *P. pinaster* (Morel et al. 2014a; Morel et al. 2014b), RPT4 en *Carica papaya* (Botini et al. 2021), RPT5 en *Cyclamen persicum*, *Musa spp.* AAA cv. Grand Naine, azafrán y maíz endogámico H99 (Kumaravel et al. 2017; Lyngved et al. 2008; Sharifi et al. 2012; Sun et al. 2013), RPT1 en *Cyathea delgadii* (Domzalska et al. 2017), RPT3 en *C. persicum* (Rode et al. 2012), RPT2 en *P. pinaster* (Morel et al. 2014a) y RPN9 en caña de azúcar (Heringer et al. 2017). Aunque los estudios transcriptómicos y proteómicos sobre la ES han demostrado que las subunidades del proteasoma 26S están estrechamente reguladas, se desconocen las proteínas ubiquitinadas durante la ES. Con la comparación de la acumulación de conjugados de ubiquitinas entre los explantes de hoja cortada -NAA-KIN y +NAA-KIN, se podría especular que algunos objetivos clave de ubiquitinación podrían estar regulados en los explantes +NAA-KIN.

En la proliferación de embriones somáticos intervienen múltiples niveles de regulación. Los acontecimientos moleculares y celulares asociados con el estado embriogénico, en parte, pueden inferirse a partir de las proteínas identificadas aquí. La proteína quitinasa A clase III (Spot 1, 2 y 4), relacionada con el estrés y la defensa, se ha descrito en la ES (De Jong et al. 1992). Se han

identificado proteínas quitinasas durante la inducción de la ES (De Jong et al. 1992; Liu et al. 2015), las cuales, se unen a las Arabinogalactan-proteínas (AGP) de la pared celular y liberan oligosacáridos que pueden actuar como moléculas de señalización (Domon et al. 2000; van Hengel et al. 2001). La homeostasis de las especies reactivas del oxígeno (EROS) mantiene el poder reductor de la oxidoreductasa a través del sistema de la tiorredoxina (punto 59) (Marty et al. 2009; Zagorchev et al. 2012). Durante la ES, se han identificado proteínas relacionadas con la homeostasis de EROS en *Gossypium hirsutum* (Zhou et al. 2016), *Elaeis guineensis* (Aroonluk et al. 2019) y *Catharanthus roseus* (Gulzar et al. 2019). La organización de la cromatina se ve facilitada por el reclutamiento de proteínas organizadoras del ADN, como las proteínas de unión a metil CpG (spot 46) y el complejo de proteínas histona desacetilasa, lo que concuerda con la metilación de histonas observada en la ES de *C. canephora* (Grzybkowska et al. 2020; Nic-Can et al. 2013). La homeostasis de aminoácidos libres a través de la hidrólisis de proteínas y el aminoácido leucina del extremo N-terminal se ha sugerido dependiente de PEG durante la ES en *Carica papaya* (Bartos et al. 2018; Matsui et al. 2006; Vale Ede et al. 2014), y la proteína glicina descarboxilasa se ha relacionado al aumento de serina (Igamberdiev y Kleczkowski, 2018; Timm et al., 2012). Esto concuerda con los hallazgos de la proteína serina hidroximetiltransferasa que participa en la síntesis de serina a través de glicina, asociada a la competencia en callos de caña de azúcar (Xavier et al. 2022).

3.5. CONCLUSIÓN

En resumen, hemos confirmado que el acondicionamiento de plantas con auxinas y citocininas es necesario para el alto rendimiento de la embriogénesis somática en el protocolo de ES en *C. canephora*. El acondicionamiento de plantas con auxinas y citocinina no sólo aumenta la proliferación de embriones somáticos, sino que también cambia la acumulación de proteínas asociadas a ellos. Las proteínas identificadas están implicadas en el metabolismo y el plegamiento de proteínas. La proteína identificada RPN12, que es una subunidad de la región reguladora del proteasoma 26S, muestra que la ubiquitinación podría ser una nueva vía en la regulación de la competencia embriogénica en *C. canephora*. Uno de los principales retos en el futuro es aislar los sustratos de la ubiquitinación mientras se cultivan los explantes y se induce la embriogénesis somática.

CAPÍTULO IV: ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS (ES) SOMÁTICA EN CONDICIONES DE INHIBICIÓN DEL PROTEASOMA 26S.

4.1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos compuestos por múltiples células altamente especializadas para cumplir diferentes funciones en la planta. A pesar de esto, las células vegetales tienen la capacidad de regenerar una planta completa, esta capacidad usualmente se le refiere como “totipotencia” (Fehér, 2019; Méndez-Hernández et al., 2019). Esta capacidad de totipotencia ha sido aprovechada en la ES para la micropropagación masiva de especies de plantas agroindustrialmente importantes como *C. canephora*. Durante la ES *in vitro*, las células somáticas son incubadas bajo diferentes tipos de estrés y sometidas a estímulos con reguladores del crecimiento. Esto da como resultado que las células somáticas lleven a cabo desdiferenciación, cambios morfofisiológicos, y su posterior conversión en células embriogénicas que producirán embriones somáticos.

De acuerdo con lo anterior, se ha reportado que la aplicación exógena de auxinas y/o citocininas, durante la primera etapa de inducción de la ES, contribuye a que las células somáticas se reprogramen y adquieran la capacidad de desarrollar embriones somáticos. Esto sugiere que el estudio del inicio de la ES serviría para optimizar los sistemas biotecnológicos de regeneración vegetal (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). De manera similar, se ha reportado que el proceso inicial de ES en *C. canephora* comprende un pretratamiento de 14 días en medio suplementado con auxinas y citocininas, y posteriormente en un medio libre de auxinas suplementado con citocininas (Figura 4.1) (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

Por otro lado, los estudios anatómicos y ultraestructurales como la histología y la microscopía electrónica han contribuido a la comprensión de los procesos estructurales y morfofisiológicos involucrados en la adquisición de la competencia embriogénica. La comprensión de las características morfofisiológicas y la determinación del origen del embrión son esenciales para el desarrollo de protocolos eficientes (Fehér, 2019; Fehér et al., 2003).

De acuerdo con lo anterior, se ha logrado observar que diferentes factores como el tipo de explante, los tratamientos de estrés y los reguladores del crecimiento pueden afectar el origen del embrión e inducir cambios anatómicos y ultraestructurales en la ES. Por ejemplo, en *C. canephora*, su protocolo de inducción de la ES comprende dos partes: un pretratamiento con los

reguladores de crecimiento auxina (NAA) y citocinina (KIN) y posteriormente, un medio de inducción con regulador de crecimiento citocinina (BA) (Figura 4.1), que induce cambios morfofisiológicos, anatómicos y ultraestructurales que conducen a la conversión de la célula somática a célula embrionaria.

Los cambios morfológicos e histomorfológicos durante la inducción de la ES de *C. canephora* han sido descritos detalladamente (Márquez-López et al., 2018; Nic-Can et al., 2013). Por ejemplo, se ha reportado que a partir de los 21 días después de la inducción de la ES, se producen los primeros cambios histomorfológicos mediante la formación de centros meristemáticos, los cuales se originan a partir de células pertenecientes al mesófilo. Estas células, en comparación con las células vecinas, son relativamente más pequeñas, con núcleos grandes y citoplasma más denso. Durante este periodo de tiempo, se observa la formación de masa proembriogénica en la región periférica de los explantes (Figura 4.1 C y 4.2 A, B). A los 35 días, después de la inducción de la ES, se observa, a nivel histológico, un crecimiento coordinado de un grupo de células meristemáticas pequeñas; sin aparente conexión vascular con el tejido madre (Figura 4.2 F). Estos cambios corresponden morfológicamente a la formación de proembriones globulares (Figura 4.1 E). Durante los 42 días posteriores a la inducción de la ES, los proembriones realizan una serie de divisiones que conducen a la formación de embriones globulares (Figura 4.3 G), los cuales muestran una protodermis bien definida (Figura 4.2 I). Posteriormente, los embriones globulares pasan por la etapa de corazón, torpedo y cotiledonar (Figura 4.2 H, J, K). En esta última etapa, histológicamente se observa un procambium bien definido, el cual comprende células con núcleos alargados (Figura 4.3 I) y se pueden observar a nivel morfológico embriones somáticos con simetría bilateral y meristema apical y radicular (Figura 4.3 J). Por último, a los 56 días después de la inducción de ES, el recuento de todas las etapas embriogénicas alcanza un promedio de 70 ± 20 embriones somáticos por explante (Figura 4.1 G) (Márquez-López et al., 2018; Nic-Can et al., 2013).

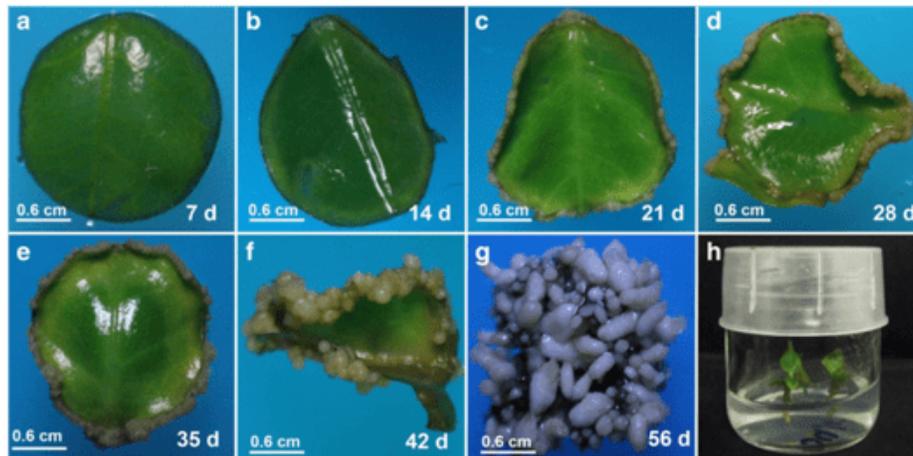


Figura 4.1. Proceso morfológico de la inducción de la ES en *C. canephora*. (A–B) explantes iniciales de la inducción de la ES; (C) formación de la masa proembriogénica; (D) emergencia de las primeras estructuras embriogénicas somáticas; (E) proembriones globulares; (F) embriones globulares; (G) embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo; (H) plántulas de embriones somáticos después de 28 días de la germinación. Imagen tomada de Márquez-López et al., (2018).

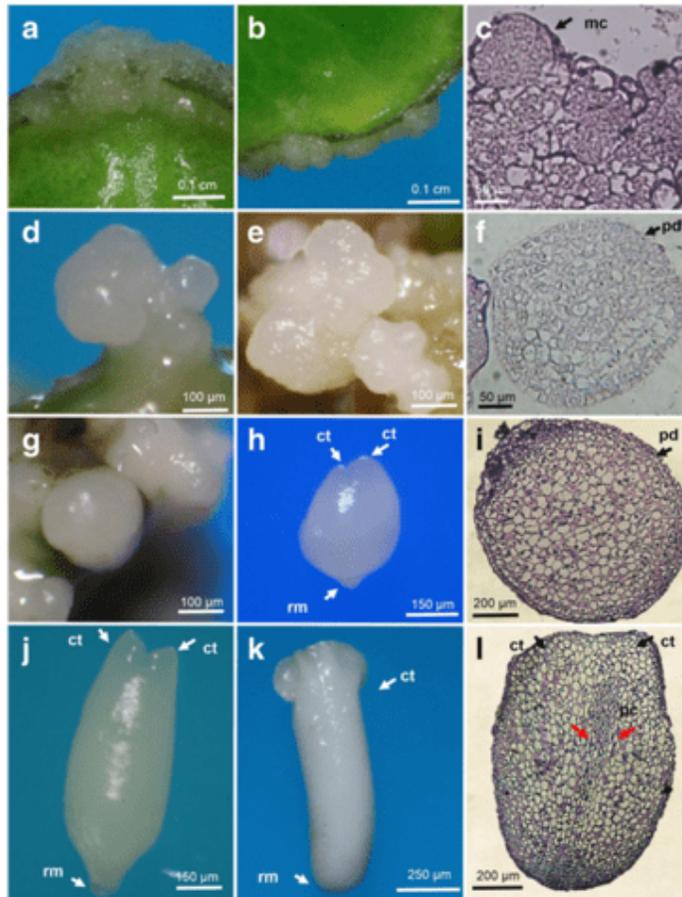


Figura 4.2. Histomorfología de las principales etapas de desarrollo de la inducción de la ES *in vitro* en *C. canephora*. (A–B) masa proembriogénica; (C) sección longitudinal de la masa proembriogénica, la punta de flecha negra indica los centros meristemáticos (mc) y el comienzo de la formación de un embrión globular; (D–E) estructuras embriogénicas somáticas. (F–I) sección longitudinal de un embrión somático, la punta de flecha negra indica la presencia de una capa de protodermo bien definida (pd); (G) etapa corazón; (H) etapa torpedo; (J) etapas cotiledonar temprana y (K) tardía; (I) sección longitudinal en la etapa cotiledonar temprana. La punta de flecha roja indica la zona de procambium (pc), mientras que la punta de flecha negra indica el desarrollo del primordio cotiledonar temprano (ct). rm: meristemo raíz. Imagen tomada de Márquez-López et al., (2018).

A diferencia del conocimiento que se tiene sobre los eventos morfológicos e histológicos relacionados con la adquisición de la competencia embriogénica, se sabe poco sobre la regulación molecular y estructural involucrada en dicho proceso. No obstante, se ha reportado ampliamente que la percepción y señalización de las auxinas juegan un papel importante en la regulación molecular y estructural involucrada en la adquisición de la competencia embriogénica

(Su et al., 2020). La subunidad RPN12 del proteasoma 26S influye en la sensibilidad exógena de las citocininas y auxinas (Smalle et al., 2002; Das et al., 2021). Es interesante destacar que, en el capítulo anterior, se evidenció una alta tasa de recambio de proteínas clave durante la etapa de pretratamiento del protocolo de ES en *C. canephora*, así como la acumulación de la subunidad RPN12 del proteasoma 26S en esta fase. En conjunto, estos resultados sugieren que la ubiquitinación podría ser una nueva vía en la regulación de la competencia embriogénica en *C. canephora*. Existen escasos trabajos en los que se haya reportado de qué manera la vía UPS interviene en el proceso morfofisiológico e histomorfológico de la ES.

Por tal motivo, y con la finalidad de ampliar el conocimiento sobre la regulación morfológica en la ES vía UPS, en este trabajo se realizó la inhibición del proteasoma 26S con el inhibidor reversible MG-132 durante el pretratamiento de la inducción de la ES de *C. canephora*. El uso de inhibidor del proteasoma 26S bloqueará la degradación de proteínas por esta vía y permitirá visualizar el papel que comprende en la ES.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Preparación del material vegetal, inducción de la ES y germinación de los embriones.

Las plantas de *C. canephora*, se propagaron en condiciones de 25 ± 2 °C, bajo fotoperíodo 16 / 8h ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, en medio Murashige & Skoog (Phyto Technology Laboratories, M524) ajustado a pH 5.8 y suplementado con: tiamina-HCl $29.6 \mu\text{M}$ (Sigma, T3902), *Myo*-inositol $550 \mu\text{M}$ (Sigma, I5125), cisteína $0.15 \mu\text{M}$ (Sigma, C8277), sacarosa 87.64mM (Sigma, S539) y 0.25% (p/v) Goma gellan (PhytoTechnology Laboratories, G434). Para la inducción de la ES, las plántulas se transfirieron al mismo medio suplementado con ácido naftalenacético $0.54 \mu\text{M}$ (NAA; Sigma, N1145) y kinetina $2.32 \mu\text{M}$ (KIN; Sigma, K0753) por 14 días, en las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo. Posteriormente, se tomaron las primeras hojas de las plántulas para cortar los explantes con sacabocados en un tamaño de 0.25cm^2 , después colocados en medio líquido Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985), en presencia de $5 \mu\text{M}$ de Benciladenina (BA; PhytoTechnology Laboratories, B800) y se cultivaron a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 55rpm durante 108 días.

Los embriones cotiledonares producidos en el medio de Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985) se transfirieron al medio de propagación.

4.2.2. Tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor del proteasoma 26S MG-132

Para la inhibición del proteasoma MG-132 (abcam, ab141003) se añadió al medio de pretratamiento el inhibidor reversible a concentraciones de 20, 40 y 80 μM . La adición de MG-132 se realizó tres días antes de pasar al medio de Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985) (tiempo -3). Pasado el tiempo -3, se continuó con el proceso de inducción de la ES en *C. canephora* sin el uso del inhibidor (Figura 4.4). Como testigo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO). Con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ 745T) a 20x, se monitoreo el desarrollo y número de embriones producidos por explante durante 108 días después de la inducción de los explantes en el medio Yasuda modificado (DAI) (Yasuda et al., 1985). En el pretratamiento, por cada concentración del inhibidor MG-132 se utilizaron 3 plántulas. Al final de la inducción de la ES se evaluaron 15 matraces por tratamiento.

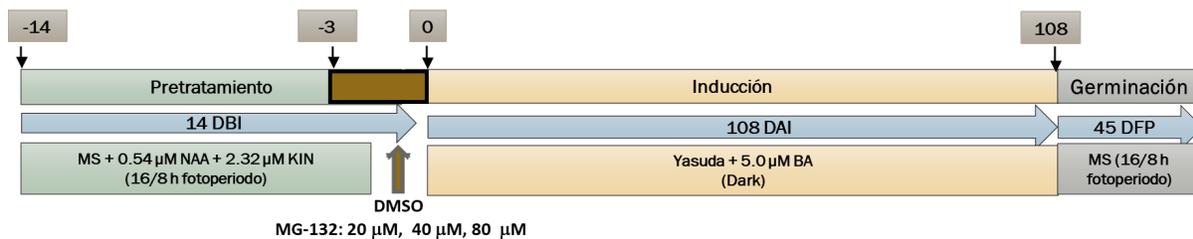


Figura 4.4. Esquema experimental del tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor del proteasoma 26S MG-132 en el proceso de la ES en *C. canephora*. A, proceso de la inducción de la ES en *C. canephora*. 14 DBI: 14 días antes de la inducción de la ES, 108 DAI: 108 días después de la inducción de la ES.

4.2.3. Experimento complementario al tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor del proteasoma 26S MG-132

Para el experimento complementario al tratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor del proteasoma 26S MG-132, se empleó con modificaciones el esquema experimental previamente mencionado en el párrafo anterior. Se añadió al medio de pretratamiento el inhibidor reversible MG-132 a 40 μM tres días antes de pasar al medio de Yasuda modificado (tiempo -3). Pasado el tiempo -3, se procedió a pasar los explantes al medio de pretratamiento libre del inhibidor MG-132, durante 3 días (tiempo +3). Posteriormente, pasado el tiempo +3, se continuó

con el proceso de inducción de la ES en *C. canephora* sin el uso del inhibidor. Utilizando un microscopio estereoscópico (Nikon, SMZ 745T) a 20x, se monitoreo el desarrollo y el número de embriones producidos por explante durante 108 días después de la inducción de los explantes en el medio Yasuda modificado (DAI) (Yasuda et al., 1985).

4.2.4. Microscopía electrónica

Los diferentes tejidos se fijaron en amortiguador de fosfatos (fosfato sódico monobásico 2 mM, fosfato dibásico sódico heptahidratado 2 mM y glutaraldehído al 2.5%) a pH 7.3. Se les aplicó a las muestras vacío durante 10 min y posteriormente, se mantuvieron a temperatura ambiente durante 24 h. Después, se mantuvieron a 4 °C y se lavaron dos veces con el amortiguador de fosfatos, sin glutaraldehído. Los tejidos fijados se deshidrataron de manera gradual con etanol a 10, 30, 50, 70, 85, 96 y 100%. Entre cada paso de la deshidratación gradual por etanol se les aplicó a las muestras vacío durante 10 min y posteriormente, los tejidos se mantuvieron durante 1 h a 4 °C, por duplicado. Posteriormente, las muestras se secaron gradualmente hasta el punto crítico con CO₂ con ayuda de un secador Samdri-PVT. Finalmente, las muestras se montaron en una parrilla metálica (Polaron SEM Coating System E S100) y se cubrieron con oro utilizando 30 mA durante 60 segundos a 120 mTorr, hasta que se alcanzó una capa de 150 Å. Las muestras se observaron por el microscopio electrónico de barrido (GEOL JSM 6360 LV).

4.2.5. Histología

Los diferentes tejidos fueron fijados en solución de formaldehído al 10%, ácido acético al 5%, etanol al 50% v/v (FAA) durante 48 h y se lavaron cinco veces con amortiguador de fosfatos a pH 7.3 (fosfato monobásico de sodio 2 mM, fosfato de sodio dibásico heptahidratado 2 mM). Los tejidos fijados se deshidrataron de manera gradual con etanol a 10, 30, 50, 70, 85, 96 y 100%. Entre cada paso de la deshidratación gradual por etanol se les aplicó a las muestras vacío durante 10 min y posteriormente los tejidos se mantuvieron durante 1 h a 4 °C, por duplicado. Posteriormente, para la inclusión de muestras, se utilizó resina JB-4 (kit JB-4Embedding, Polysciences). Los bloques se seccionaron en fragmentos de 5 µm utilizando un micrótopo MICROM® HM 325. Los cortes se tiñeron con 4 soluciones diferentes: azul de toluidina para caracterización estructural, Xilidina Ponceau para proteína total (Vidal 1977), ácido peryódico-reactivo de Schiff (PAS) para polisacáridos con grupos glicol vecinales (Feder y O Brien 1968) y

sudan IV para lípidos totales (Pearse 1980). Las imágenes se adquirieron usando un microscopio de estereoscopía MZFL III (Leica).

4.2.6. Extracción de proteínas, electroforesis y Western Blot

Las proteínas se extrajeron, triturando 100 mg de la muestra en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en amortiguador de Laemmli (1970) (4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol y 0.125 M Tris HCl, pH 6.8). Las proteínas se desnaturalizaron a 95°C por 5 min y se separaron en geles de poliacrilamida al 12% (p/v); las bandas de proteínas se visualizaron mediante tinción con Coomassie Blue R-250. Posteriormente, las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immobilon-P, Merck Millipore, Estados Unidos).

La membrana se bloqueó con albúmina de suero bovino (BSA) al 5% en TBS o con leche descremada al 5% en PBS durante una hora a temperatura ambiente y, se incubó con anti-Ub (dilución 1:2500; ab19169; Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos) o con anti-HIS3 (dilución 1:10000) como control de carga (ab1791, Abcam, Cambridge, MA, Estados Unidos), respectivamente (Aguilar-Hernández et al. 2017). Se utilizó un anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina (AP) para detectar los inmunocomplejos utilizando regentes NBT/BCIP solución (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato / solución de cloruro de tetrazolio nitroazul, sustrato de fosfatasa alcalina) de 1 paso (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EE. UU.).

4.2.7. Análisis de secuencias y diseño de cebadores para *C. canephora*

Dado que se ha reportado que hay un solo gen *PBA1* en *Arabidopsis thaliana*, *AtPBA1* (*AT4G31300*) y que *AtACT2* (*AT3G18780.2*) es un gen de referencia para la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) (Book et al. 2010; Zhou et al. 2019), los ortólogos de esos genes se identificaron en *C. canephora* empleando búsquedas con BLAST en la plataforma Coffee Genome Hub (<http://www.coffee-genome.org>). *C. canephora* solo tiene un gen *CcPBA1* que codifica a la subunidad PBA1 del proteasoma 20S (*Cc00_g00190*), con 85.11% identidad contra *A. thaliana AtPBA1*. El ortólogo de *A. thaliana AtACT2* en *C. canephora* se identificó como *Cc07t17400.1 (CcACT2)*. Se diseñaron oligos específicos para el análisis RT-qPCR de *CcRNP12* y *CcACT2* de *C. canephora* a partir de las secuencias codificantes (CDS) utilizando el software Primer 3 (<https://primer3.ut.ee>). Los oligos fueron sintetizados por la empresa ADN-ARTIFICIAL

(Guanajuato, México) en una escala de 25 nmol, con la opción de purificación desalada, sin modificaciones en los extremos 5' y 3'.

4.2.8. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y expresión relativa del gen *PBA1* por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

Para la extracción del ARN total de las muestras, se empleó el método de Trizol descrito por Chomczynski (1993). Se realizó la verificación de la calidad del ARN total, observando la presencia de las bandas de las unidades ribosomales 28S y 18S. Después, se evaluó la calidad del ARN midiendo las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Posteriormente, se procedió a realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total empleando la enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega). Brevemente, se utilizaron 200 unidades de la transcriptasa inversa ImProm-II™ (Cat # A3802; Promega, Madison, WI, USA) y 0.5 µg de oligo dT18 (Cat # SO131; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), se siguió paso a paso las instrucciones del manual de la enzima transcriptasa inversa ImProm-II™.

Posteriormente, se realizaron las reacciones de PCR en tiempo real. Para amplificar el gen *PBA1* (número de accesoión: Cc00_g00190 en la reacción de PCR tiempo real (RT-qPCR) se utilizaron 0.8 µM de los cebadores F-PBA1 y R-PBA1; F-ACT2 y R-ACT2 (Cuadro 4.1), 10 µL de QuantiNova Probe PCR Master Mix 2x (Cat. n° 208054; QIAGEN, Hilden, Alemania) y 100 ng de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) en un volumen final de 20 µL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de PCR en tiempo real Rotor Q MDx (QIAGEN), con el siguiente programa: período de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min; 40 ciclos a 95 °C durante 15 s con 30 s de hibridación a la temperatura específica de los cebadores (Cuadro 4.2). Los resultados de RT-qPCR se analizaron mediante el método 2-ΔΔCt (Livak & Schmittgen, 2001). Se utilizaron cinco réplicas biológicas para la expresión génica relativa y el experimento se realizó por triplicado técnico. El gen *ACTINA2* (número de accesoión: Cc07_g17400 se amplificó con los cebadores F-ACT2 y R-ACT2 como estándar interno del gen de interés. Por último, se determinó la expresión relativa del gen *PBA1* mediante el método Delta-Delta Ct (2-ΔΔCt) (Livak & Schmittgen 2001), utilizando como gen de referencia ACT2 (Gutiérrez et al. 2008). Los cambios significativos en la expresión relativa del gen *PBA1* de los explantes se determinaron mediante una prueba de Tukey. Se empleó el software de análisis estadístico GraphPad Prism 9 versión

9.0.1 para analizar los datos de expresión génica con valores estadísticamente significativos de $P \leq 0.05$.

Cuadro 4.1. Secuencias de los cebadores específicas de genes utilizadas para la amplificación semi-cuantitativa por RT-qPCR en tiempo real.

Gen	Cebador	Tm °C	Amplicon (pb)
<i>PBA1</i>	F-PBA1: GAGGATCGGGCTCTTCGTAT	61	202
Cc00_g00190	R-PBA1: GGAAGCGAGTCACCAGGATA		
<i>ACT2</i>	F-ACT2: AGCAACTGGGATGACATGGA	61	233
Cc07_g17400	R-ACT2: TCCAGCACAATACCAGTCGT		

4.2.9. Análisis estadístico.

Todos los datos fueron procesados y analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA). El nivel de significación entre los valores medios se realizó mediante la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con valores de $P \leq 0.05$. Los datos fueron analizados en el software de análisis estadístico GraphPad prism 9, versión 9.0.1.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Efecto de los tratamientos con diferentes concentraciones de inhibidor del proteasoma 26S MG-132 en la inducción de la ES.

Con el fin de observar si el inhibidor del proteasoma 26S, MG-132, colocado en el pretratamiento, afectaba la inducción de la ES en *C. canephora*, se evaluó el progreso de la formación del embrión globular y la conversión de embriones globulares a embriones cotiledonares en el medio de

Yasuda modificado durante 108 días. Los embriones somáticos se contaron según su estadio de desarrollo: globular y cotiledonar (Figura 4.5 A), este último estadio se logró monitorear su germinación después de 45 días de fotoperíodo (Figura 4.7 A-D).

Nuestros resultados mostraron una disminución significativa en el número de embriones somáticos globulares en los explantes previamente tratados con el inhibidor MG-132, produciendo para el explante previamente tratado con 20 μM : 57 ± 9.85 , 40 μM : 69.33 ± 7.0 y 80 μM : 65.29 ± 6.12 embriones globulares, en comparación con el tratamiento testigo que generó 98.92 ± 5.47 embriones globulares. El número máximo de formación de embriones globulares para los explantes previamente tratados con el inhibidor MG-132 se observó el día 67 después de la inducción de la ES (67 DAI), mientras que en los del tratamiento testigo en el día 60 después de la inducción de la ES (60 DAI) (Figura 4.5 A). Posteriormente, se observó una disminución significativa en el número de embriones somáticos globulares entre los días 100 y 108 en todos los tratamientos incluyendo el testigo (Figura 4.5 A). Por otro lado, en la etapa de cotiledonar se observó un aumento en el número de embriones somáticos cotiledonares, entre los días del 94 y 108 después de la inducción de la ES (94-108 DAI) en todos los tratamientos incluyendo el testigo. El número de embriones somáticos cotiledonares producidos por los explantes previamente tratados con el inhibidor y el testigo, no fueron significativamente diferentes (Figura 4.5 A; Cuadro 4.2). No obstante, la relación entre los embriones somáticos cotiledonares obtenidos y los globulares producidos fue mayor para los explantes previamente tratados con el inhibidor MG-132 a comparación explantes del grupo testigo (Figura 4.5 A; Cuadro 4.2).

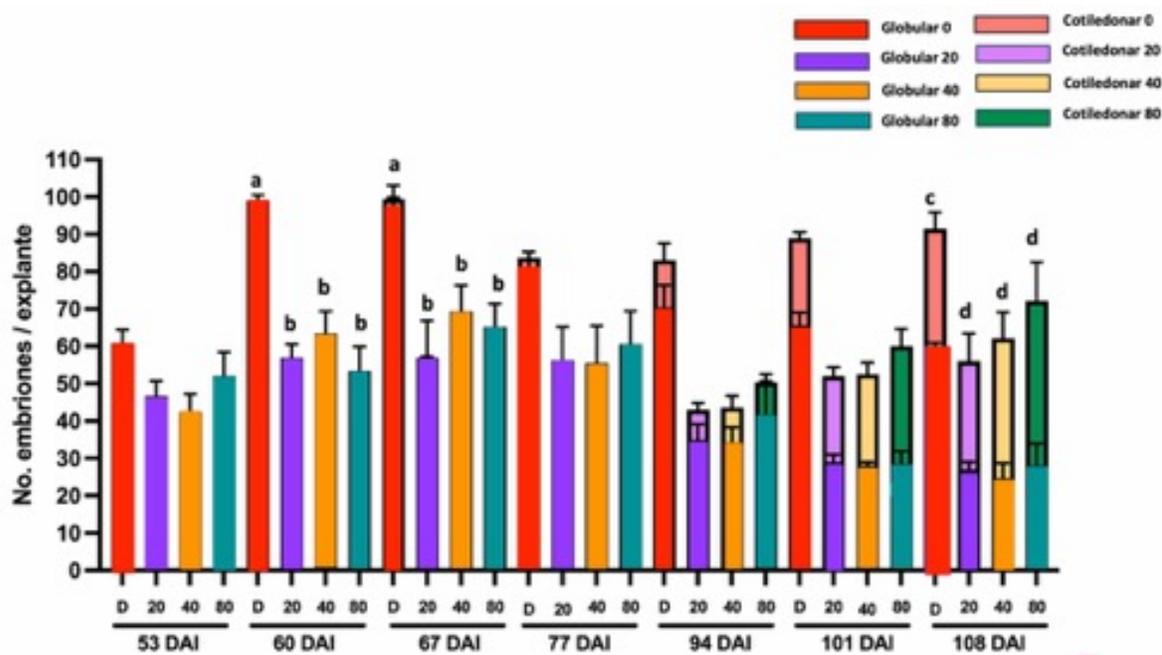


Figura 4.5. Número de embriones somáticos producidos a partir de explantes tratados con y sin MG-132. Número de embriones somáticos en estadios globular y cotiledonar de los cultivos de *C. canephora* durante la inducción de la ES. Las letras minúsculas denotan diferencias significativas entre tratamientos para determinado día de cultivo. Tukey $P \leq 0.05$. 0: testigo dimetilsulfóxido; 20, 40, 80: concentraciones en μM del inhibidor MG-132. DAI: Días después de la inducción de la ES.

Cuadro 4.2. Número de embriones cotiledonares producidos a partir de explantes tratados con y sin MG-132.

Tratamientos	Número de embriones somáticos cotiledonares / explante	Relación cotiledonares / globulares
DMSO	$32.75 \pm 4.42^{\text{ns}}$	0.33 ^a
20 μM MG-132	$30 \pm 7.4^{\text{ns}}$	0.52 ^b
40 μM MG-132	$39.5 \pm 7.0^{\text{ns}}$	0.56 ^b

80 μ M MG-132 44 ± 10.4^{ns} 0.67^b

ns: no significativamente diferentes. a, b, c: Diferencias significativas entre tamaños para determinado tratamiento. Tukey $P \leq 0.05$.

4.3.2. Restauración de la frecuencia de producción de embriones globulares en la inducción de la ES de los explantes aliviados

Posteriormente, para confirmar que la disminución significativa en el número de embriones somáticos globulares y la relación embriones somáticos globulares a embriones somáticos cotiledonares era consecuencia de la pérdida de función del proteasoma, se aliviaron las plantas tratadas MG-132 cultivándolas en medio fresco. Utilizando como testigo de referencia explantes tratados con MG-132, se procedió a comparar las plántulas que provenían del medio con DMSO o MG-132. Posteriormente, se evaluó el progreso de la embriogénesis somática. El número de embriones globulares contabilizados para explantes provenientes de medios con MG-132 y después aliviados fue de 71.59 ± 1.54 . Mientras que, para su contraparte, explantes provenientes de medios con DMSO y después aliviados fue de 62.44 ± 0.86 . Nuestros resultados no mostraron diferencias significativas en el número de embriones somáticos globulares producidos por los explantes independientemente de su procedencia de cultivos en medio con DMSO o con MG-132. Por el contrario, en los explantes previamente tratados con MG-132, se mantuvo una frecuencia baja de producción de embriones globulares, 45.00 ± 2.67 que concuerda con lo reportado en el apartado 4.3.1. Por otro lado, el número de embriones somáticos cotiledonares producidos fueron significativamente diferentes entre los explantes provenientes de los diferentes medios. El número de embriones cotiledonares contabilizados para explantes provenientes de medios con MG-132 y después aliviados con medio fresco fue de 45 ± 4.32 . Mientras que para su contraparte, explantes provenientes de medios con DMSO y después aliviados con medio fresco fue de 30.68 ± 1.82 . (Figura 4.6). En los explantes previamente tratados con MG-132, se observó un resultado similar al apartado 4.3.1, se mantuvo una frecuencia similar de producción de embriones globulares, 36.94 ± 3.53 , en comparación con los explantes provenientes de medios con DMSO y después de ser aliviados. La relación entre los embriones somáticos cotiledonares a globulares (embriones cotiledonares / embriones globulares) fue de 0.62 en los explantes aliviados en medio fresco en comparación con su contraparte provenientes de medios con DMSO, que fue de 0.48. Por otro lado, la relación entre los embriones somáticos cotiledonares a

globulares en explantes tratados con MG-132 fue de 0.82. El hecho de que la frecuencia de embriones somáticos globulares en los explantes aliviados fuera similar a explantes no expuestos al inhibidor y que los explantes tratados con MG-132 presentaran una mayor conversión de embriones globulares a cotiledonares, sugiere que el proteasoma 26S se requiere en la diferenciación celular y la conversión de los embriones.

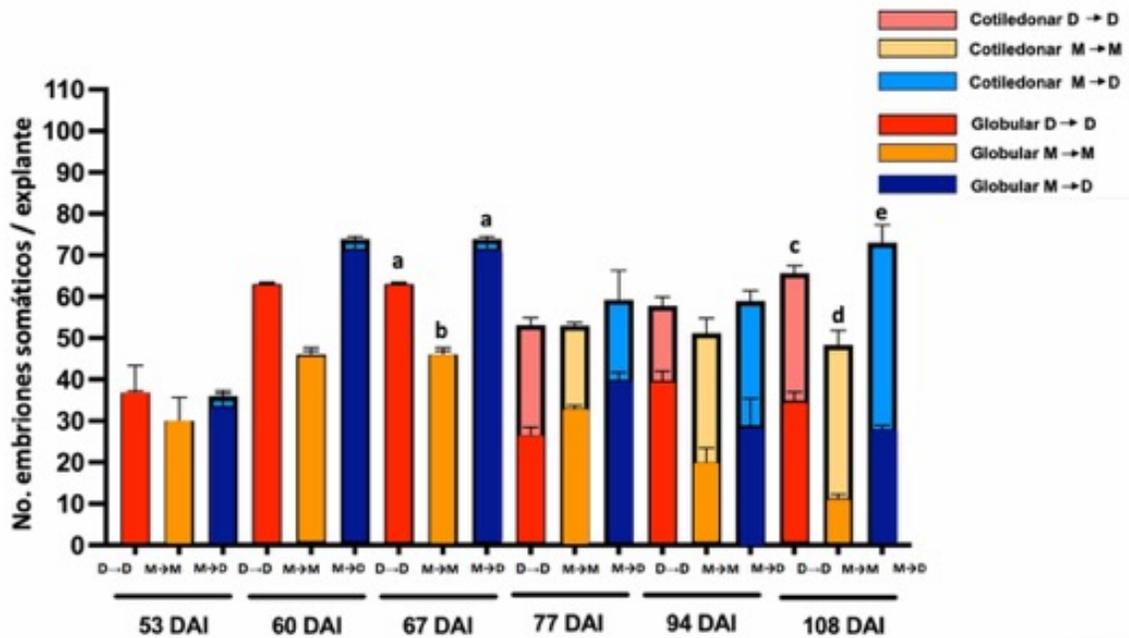


Figura 4.6. Frecuencia de los embriones en explantes aliviados. Se muestran el número de embriones somáticos globulares y cotiledonares registrados durante en inducción de la ES. El medio de cultivo fue renovado según lo indicado por las flechas y continuó durante tres días antes de la inducción de la embriogénesis. D→D: explantes previamente tratados con DMSO y después aliviados en medio fresco sin inhibidor; M→M: explantes previamente tratados con 40 μ M del inhibidor MG-132 y posteriormente utilizados para la inducción de la ES; M→D: explantes previamente tratados con 40 μ M del inhibidor MG-132 y después aliviados en medio fresco sin inhibidor. Las letras minúsculas denotan diferencias significativas entre los tratamientos en cierto día de después de la inducción. Tukey $P \leq 0.05$. DAI: Días después de la inducción de la ES.

4.3.3. Germinación de los embriones somáticos cotiledonares.

Para monitorear la germinación de los embriones durante 45 días, los embriones somáticos cotiledonares después de los 108 días de la inducción de la ES fueron transferidos al medio de propagación y cultivados en fotoperíodo 16 h / 8 h (Figura 4.7 A). A los 15 días de fotoperíodo, los embriones somáticos cotiledonares provenientes de explantes previamente tratados con el inhibidor presentaban estructuras similares al testigo, un hipocótilo prominente, cotiledones bien desarrollados y alargados (Figura 4.7 B). A los 28 días de fotoperíodo, los embriones cotiledonares previamente de explantes tratados con el inhibidor mostraron una coloración verde, mientras que los cotiledonares testigo mostraron una coloración verde hasta los 30 días de fotoperíodo (datos no mostrados); transcurridos 30 días de fotoperíodo los embriones somáticos cotiledonares de los diferentes tratamientos ya diferían en su fenotipo; los embriones cotiledonares previamente tratados con el inhibidor a una concentración de 40 μM presentaban hipocótilos más gruesos y ya presentaban raíz, en comparación de los demás tratamientos, incluyendo el testigo (Figura 4.7 C). A los 45 días de fotoperíodo, todos los embriones somáticos cotiledonares de todos los tratamientos, incluyendo el testigo, ya presentaban raíz, no obstante, las diferencias en la longitud de raíces fueron evidentes entre los tratamientos, los cotiledonares provenientes de los explantes previamente tratados con el inhibidor desarrollaron raíces con mayor longitud en comparación con el testigo (Figura 4.7 D). Además, los embriones previamente tratados con el inhibidor a una concentración de 40 μM presentaban un hipocótilo más alargada en comparación con los demás tratamiento, incluyendo el testigo (Figura 4.7 D).



Figura 4.7. Aspecto morfológico de los embriones somáticos de *C. canephora* germinando. (A) embriones somáticos finalizando el proceso de la ES a los 108 días después de la inducción de la ES (108 DAI), la barra representa 5 mm; (B) embriones somáticos después de 15 días de fotoperíodo, la barra representa 2 mm; (C) embriones somáticos después de 30 días de fotoperíodo, la barra representa 2 mm; (D) plántulas germinadas después de 45 días de fotoperíodo, la barra representa 1 cm. Fotoperíodo: 16 h luz / 8 h oscuro a 25 ± 2 °C.

4.3.4. Participación del proteasoma 26S en el origen del embrión somático.

El origen del embrión somático puede ser uni y/o multicelular. Cuando los embriones presentan un origen unicelular se observan divisiones celulares coordinadas y el embrión está conectado al tejido materno mediante una estructura similar a un suspensor (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Por el contrario, los embriones que presentan un origen multicelular se observan al inicio como una protuberancia, sin divisiones celulares coordinadas observables, y el embrión no se encuentra fusionado al tejido materno (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Hasta la fecha, aún se desconoce la señal que desencadena que el origen del embrión somático sea uni o multicelular. Pero, hay trabajos que sugieren que el tipo de explante y factores externos como el estrés en la inducción de la ES, intervienen en la señal del origen del embrión (Grzyb & Mikuła, 2019). También, hay reportes que sugieren que el origen del embrión somático está estrechamente relacionado con la frecuencia de los embriones somáticos globulares (Grzyb & Mikuła, 2019; Mikuła et al., 2021). En este trabajo se encontró que la inhibición del proteasoma 26S en el pretratamiento de la ES de *C. canephora* redujo la producción de embriones somáticos globulares (apartado 4.3.1). De acuerdo con lo anterior, se consideró analizar, si la inhibición del proteasoma 26S pudo haber afectado el origen del embrión somático de los explantes expuestos al inhibidor MG-132.

Se analizaron 66 muestras de embriones globulares en los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. Ambos tratamientos presentaron origen uni y multicelular del embrión somático (Figura 4.8 A, B, C y D). Los explantes previamente tratados con MG-132 mostraron 44 muestras de embriones globulares con características de origen multicelular y 22 muestras de embriones globulares con características de origen unicelular. En contraste con los explantes previamente tratados con DMSO, que presentaron 22 muestras de embriones globulares con características de origen multicelular y 44 muestras de embriones globulares con características de origen unicelular.

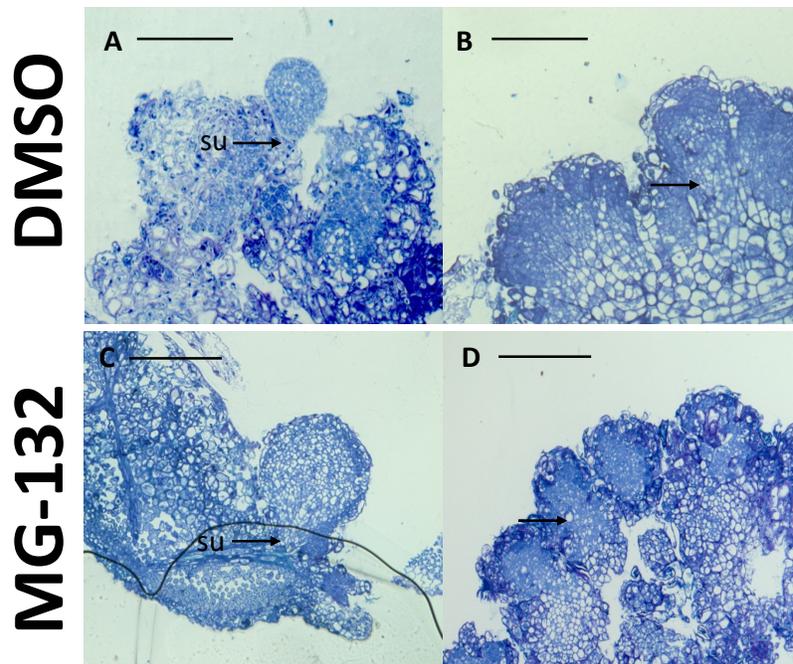


Figura 4.8. Embriones globulares desarrollándose en explantes de *C. canephora*. (A–B) Explantes previamente tratados con DMSO. (C–D) Explantes previamente tratados con MG-132. su: estructura que asemeja a un suspensor y es una característica del origen unicelular. Las flechas señalan las estructuras de los embriones globulares que están aledañas al tejido materno. El embrión globular de origen unicelular muestra un pseudosuspensor entre el tejido materno y el embrión globular. El embrión globular de origen multicelular muestra un protodermo fusionado a otros embriones globulares y se observan las células meristemáticas sin una delimitación bien definida entre el tejido madre y las células meristemáticas que conforman el embrión globular somático.

4.3.5. Inhibición del proteasoma 26S a través de MG-132.

Se ha reportado que la inhibición del proteasoma 26S induce la expresión del gen *PBA1* que codifica la subunidad catalítica $\beta 1$ del proteasoma 26S y la acumulación de proteínas poliubiquitinadas (Gladman et al., 2016; Speranza et al., 2001). Por lo que se analizó mediante RT-qPCR la expresión relativa del gen *PBA1* y a través de Western Blot los niveles de proteínas poliubiquitinadas para validar la inhibición del proteasoma 26 en los explantes (Figura 4.9 A, B).

El Western Blot contra ubiquitina mostró acumulación de proteínas poliubiquitinadas en muestras cultivadas en presencia de MG-132. Caracterizado por un aumento en la intensidad de la señal para proteínas de grandes (Figura 4.9 A). En cambio, el Western Blot contra Histona 3 (H3), utilizado como testigo, mostró señal equivalente entre muestras de medios con y sin MG-132.

La adición del inhibidor MG-132 (40 μ M) al medio de pretratamiento, resultó en la inducción de la expresión del gen *PBA1*. Después de 48 horas de exposición, el explante indujo 5.1 veces más el gen *PBA1* en comparación con el testigo. Por otro lado, después de 72 horas de exposición la expresión del gen *PBA1* disminuyó en comparación con la expresión mostrada a las 48 horas. A las 72 horas, el explante expresó 3.2 veces más el gen *PBA1* en comparación con el testigo (Figura 4.9 B). Por lo tanto, se concluye que la función del proteasoma 26S se intervino en los explantes provenientes de medios de cultivo con MG-132.

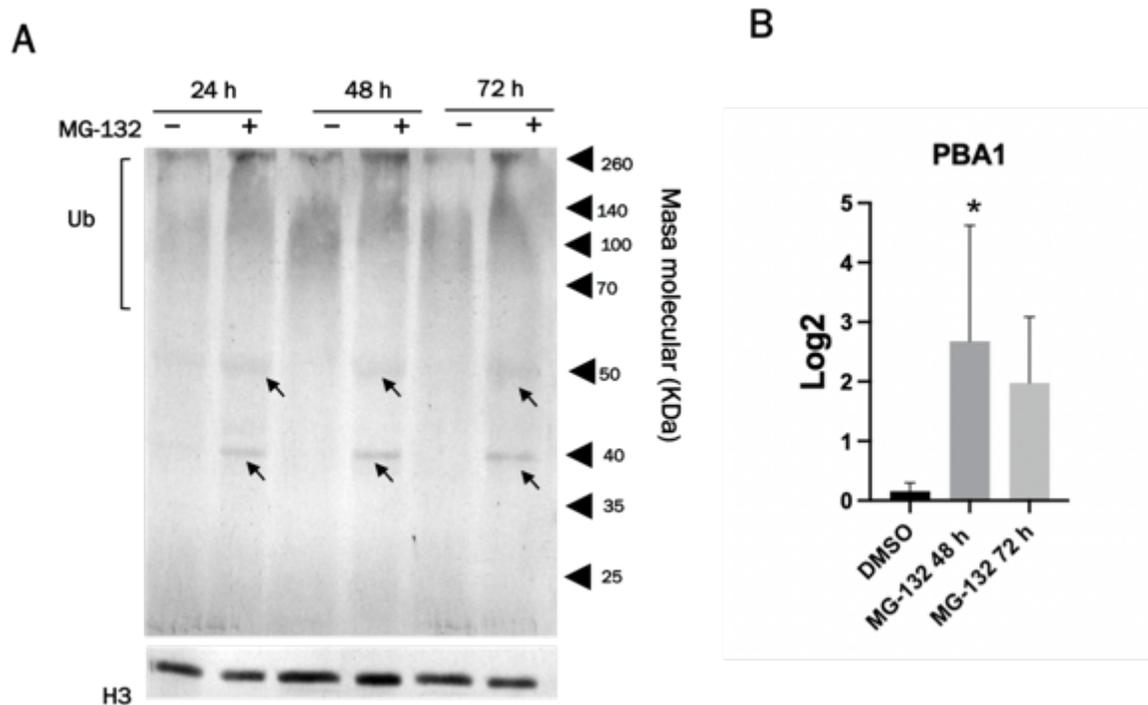


Figura 4.9. Análisis de Western Blot y RT-qPCR en explantes tratados con 40 μ M MG-132 y DMSO. (A) acumulación de proteínas poliubiquitinadas de los explantes tratados con 40 μ M MG-132 y DMSO, a las 24, 48 y 72 horas de exposición con el inhibidor. Las proteínas poliubiquitinadas de alto peso molecular se encuentran señaladas en corchetes. Las proteínas ubiquitinas conjugadas se encuentran señaladas con flechas. (B) RT-qPCR del gen *PBA1* de los explantes tratados con 40 μ M MG-132 y DMSO, a las 48 y 72 horas de exposición con el inhibidor. Asteriscos representan diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos. Tukey $P \leq 0.05$.

4.3.6. Análisis morfológico, histológico y de la movilización de reservas de la inducción de la ES.

Para saber si la inhibición del proteasoma 26S tuvo repercusiones en la progresión de la inducción de la ES en *C. canephora*, se realizó un análisis de la morfología, histología y movilización de reservas de durante el proceso de embriogénesis documentando la formación del embrión globular y su conversión a embrión cotiledonar en el medio de Yasuda modificado.

Para los análisis posteriores que aparecen en este trabajo, se utilizaron explantes previamente expuestos a 40 (M del inhibidor MG-132 y DMSO, en el pretratamiento de la inducción de ES. Las muestras que se usaron fueron tomadas 3 días antes de la inducción de la ES (-3 DBI) y 0, 14, 21, 35, 75 y 108 días después de la Inducción de la ES (DAI).

4.3.6.1. Análisis morfológico e histológico de la ES.

Los experimentos comenzaron en el día -3DBI. En ambos tratamientos, la histología de los explantes durante el día -3DBI presentaron una anatomía bien definida caracterizada por una epidermis adaxial, epidermis abaxial, un mesófilo bien estructurado, comprendido por células parénquimas palizadas y esponjosas (Figura 4.11 A, E). Las células del mesófilo y del parénquima en empalizada se observaron alargadas y cuboides con una relación de núcleo-citoplasma de 0.17 μm (Figura 4.11 A, E). Entre los días 0 y 7 DAI, no se observaron cambios a nivel morfológico e histológico en ningunos de los tratamientos (Figura 4.10 B, F y 4.11 B, F). Durante el día 14 DAI, los explantes presentaron cambios únicamente a nivel histológico en ambos tratamientos (Figura 4.10 C, G y 4.11 C, G). Los cambios observados a los 14 DAI fueron notorios, incluyeron células en citocinesis y con alta actividad mitótica. Esto se evidenció con células y núcleos celulares en las regiones perivasculares y del mesófilo, intensamente teñidas de azul de toluidina (Figura 4.11 C, G). De manera similar, en ambos tratamientos se observaron células desorganizadas. Por otro lado, únicamente en los explantes previamente tratados con DMSO, se observó un mayor número de células vacuoladas con núcleos prominentes. (Figura 4.11 C, G).

Posteriormente, a los 21 DAI, los explantes de ambos tratamientos mostraron cambios a nivel morfológico e histológico (Figura 4.10 D, H y Figura 4.11 D, H). A nivel morfológico, los explantes previamente tratados con DMSO, presentaron una abundante formación de masa proembriogénica en la periferia del explante foliar; mientras que, a nivel histológico, se

observaron, centros meristemáticos de gran tamaño y bien estructurados, compuestos por células más pequeñas que las vecinas, con núcleo prominente y citoplasma denso. Estas células tenían una mayor relación de núcleo-citoplasma con respecto a las células vecinas (Figura 4.11 D).

En explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132, se observó una menor formación de masa proembriónica en la periferia del explante foliar a nivel morfológico en comparación con los explantes previamente tratados con DMSO. (Figura 4.10 H). Por el contrario, se observaron áreas pequeñas, que correspondían al inicio de la formación de centros meristemáticos a nivel histológico. Estas áreas estaban compuestas por células más pequeñas que las vecinas, con núcleo prominente, citoplasma denso y mayor relación de núcleo-citoplasma con respecto a las células vecinas (Figura 4.11 H).

A los 35 DAI, los explantes previamente tratados con DMSO mostraron abundantes estructuras de embriones pre-globulares sobre la masa proembriónica, a nivel morfológico (Figura 3.10 I). De manera similar, se observaron embriones pre-globulares provenientes del crecimiento organizado de las células comprendidas en los centros meristemáticos formados durante a los 21 DAI, a nivel histológico (Figura 4.11 I, J).

Por otro lado, se encontró una menor formación de embriones pre-globulares en los explantes previamente tratados con 40 μ M de MG-132, a nivel morfológico. Los embriones pre-globulares surgen sobre la masa proembriónica previamente formada en la periferia del explante (Figura 4.10 M). A nivel histológico, a los 21 DAI, los explantes previamente tratados con MG-132 mostraron centros meristemáticos similares a los observados en el tratamiento con DMSO (Figura 4.11 M, N).

Posteriormente, a los 49 DAI, se observó un aumento de tamaño en los embriones pre-globulares, a nivel morfológico en el tratamiento con DMSO, (Figura 4.10 J). De manera similar se observó embriones globulares, a nivel histológico. Los embriones globulares observados presentaban un protoderma bien definido (Figura 4.11 K, L).

En los explantes tratados con 40 μ M MG-132, se observó menor formación de embriones globulares en comparación con el tratamiento con DMSO, a nivel morfológico (Figura 3.10 O). Por otra parte, en comparación con los explantes tratados con DMSO, los explantes tratados con inhibidor exhibieron embriones globulares, pero sin protoderma (Figura 4.11 O, P).

A los 75 DAI, los explantes de ambos tratamientos mostraron diferentes estructuras embrionarias: corazón, torpedo y cotiledonar. Predominaban en ambos tratamientos la estructura de embriones cotiledonares tempranos (Figura 4.10 K, O). Los embriones cotiledonares tempranos, de ambos tratamientos, presentaban un procambium bien definido compuesto de células con aspecto circular y cotiledonares elongados (Figura 4.11 Q, S).

A los 108 DAI, los explantes de ambos tratamientos presentaban cotiledonares tardíos (Figura 4.10 L, P y 4.11 R, T). A nivel histológico los embriones cotiledonares tardíos, provenientes de los explantes tratados con DMSO, presentaron un procambium con aspecto alargado compuesto de células alargadas y regiones apicales cotiledonares bien definidas. Por otro lado, a nivel histológico, en el tratamiento con 40 μ M MG-132, los embriones cotiledonares presentaban un procambium bifurcado, compuesto por células alargadas que dieron paso después a la formación de primordios cotiledonares (Figura 4.11 T).

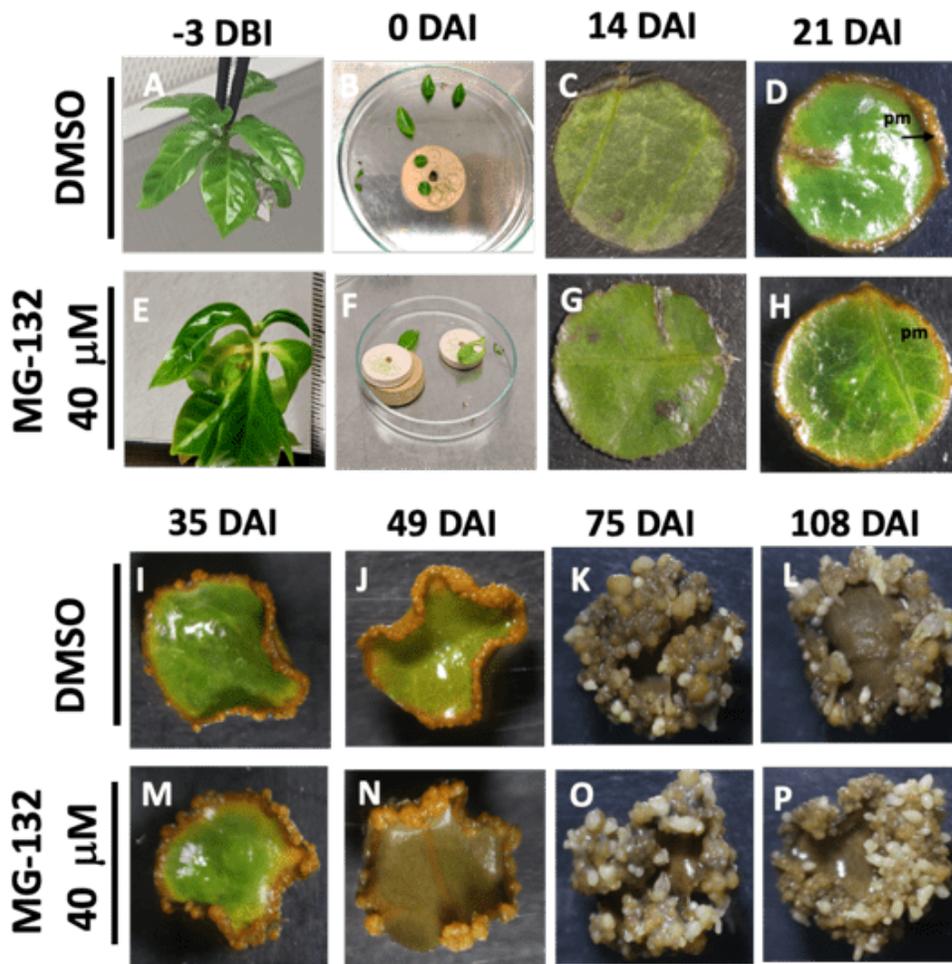


Figura 4.10. Embriogénesis somática en explantes de *C. canephora* tratados con y sin 40 μ M MG-132. (A y E) plantúla de cafeto a los 3 DBI, día en el que se expone el explante con el inhibidor MG-132; (B y F) explantes iniciales; (C y G) explantes a los 14 DAI; (D y H), explantes con formación de masa proembriogénica a los 21 DAI; (I y M) explantes con embriones pre-globulares a los 35 DAI; (J y N) explantes con embriones globulares a los 49 DAI; (K y O) explantes con cotiledonares tempranos y tardíos a los 75 DAI; (L y P) explantes con cotiledonares tardíos a los 108 DAI. DBI: Días previos a la inducción de la ES; DAI: Días después de la inducción de la ES.

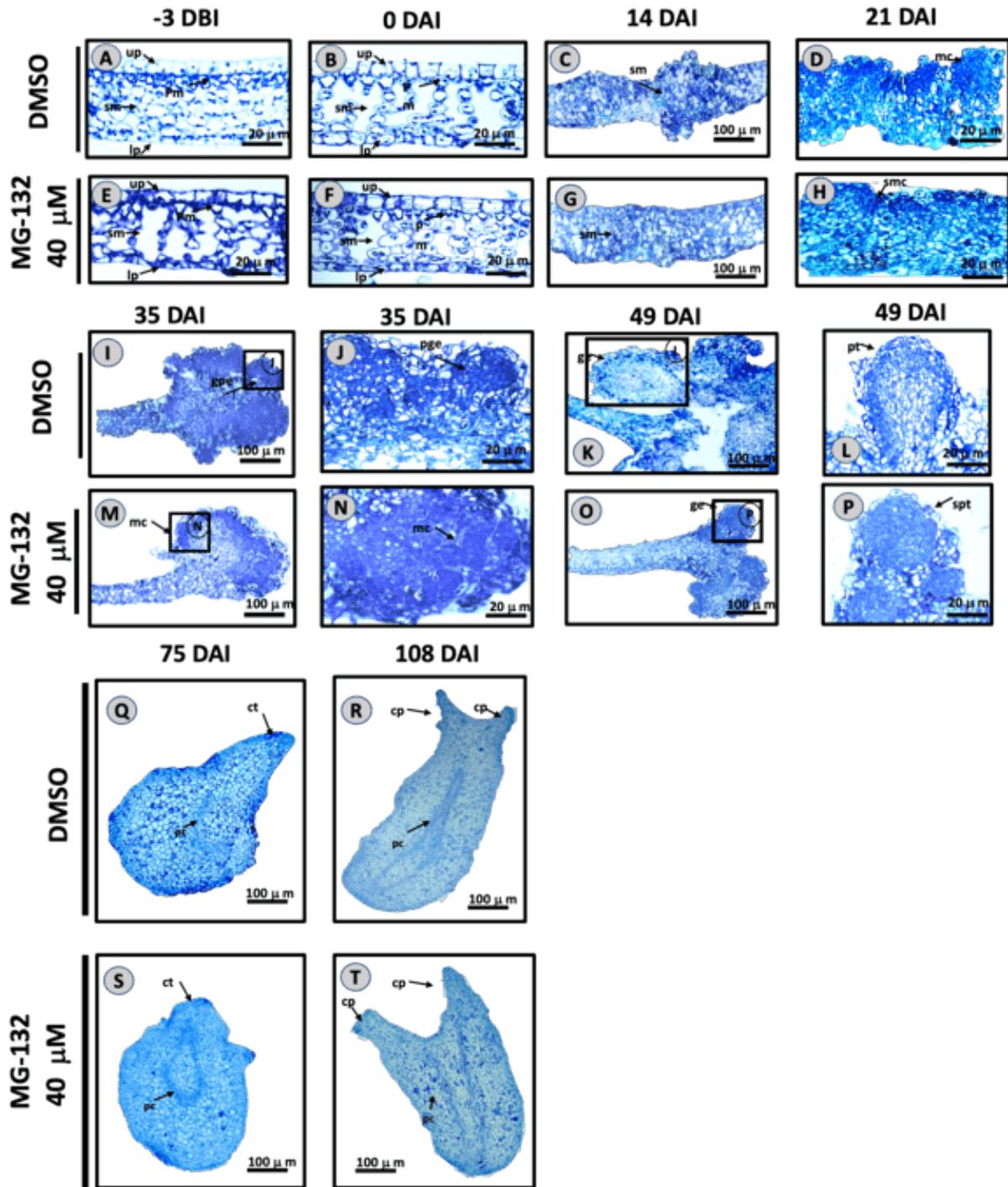


Figura 4.11. Análisis histológico de la ES en explantes de *C. canephora* tratados con y sin 40 μ M MG-132. Secciones transversales de explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 y DMSO, y teñidos con azul de toluidina a los -3DBI, 0, 14, 21, 35, 49. (A y E) hoja de cafeto a los 3 DBI; (B y F) explantes iniciales; (C y G) explantes a los 14 DAI; (D) explante con formación de centros meristemáticos a los 21 DAI; (H) explante con áreas de inicio de formación de centros meristemáticos a los 21 DAI; (I y J) explante con embriones pre-globulares a los 35 DAI; (M y N) explante con formación de centros meristemáticos a los 35

DAI; (K y L) explantes con embriones globulares con un protodermo bien definido a los 49 DAI; (O y P) explantes con embriones globulares sin protodermo definido a los 49 DAI; (Q y S) cotiledonares tempranos con cotiledón y procambio bien definido a los 75 DAI; (R) cotiledonares tardíos con procambio alargado e inicio de primordios cotiledonares a los 108 DAI; (T) cotiledonares tardíos con procambio alargado y bifurcado, con primordios cotiledonares bien definidos a los 108 DAI. DBI: Días previos a la inducción de la ES; DAI: Días después de la inducción de la ES; Ep: parénquima esponjoso; le: epidermis baja; mc: centro meristemático; pb: cuerpo proteico; pm: masa proembriogénica; Pp: parénquima empalizada; smc: inicio de centro meristemático; ue: epidermis alta; gpe: embrión pre-globular; ge: embrión globular; pt: protodermo; spt: inicio del protodermo.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el análisis morfológico e histológico, los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 tuvieron una respuesta diferente en el proceso de desdiferenciación con respecto a los no tratados lo que resultó en el atrasó de la formación de los centros merismáticos a los 21 DAI (Figura 4.11 D y H; Figura 4.12). Otras alteraciones incluyeron el alargamiento y bifurcación acelerada del procambium en comparación con los explantes tratados con DMSO. Así como la formación de primordios cotiledonares en los embriones cotiledonares formados a los 108 DAI (Figura 4.11 R, T; Figura 3.12).

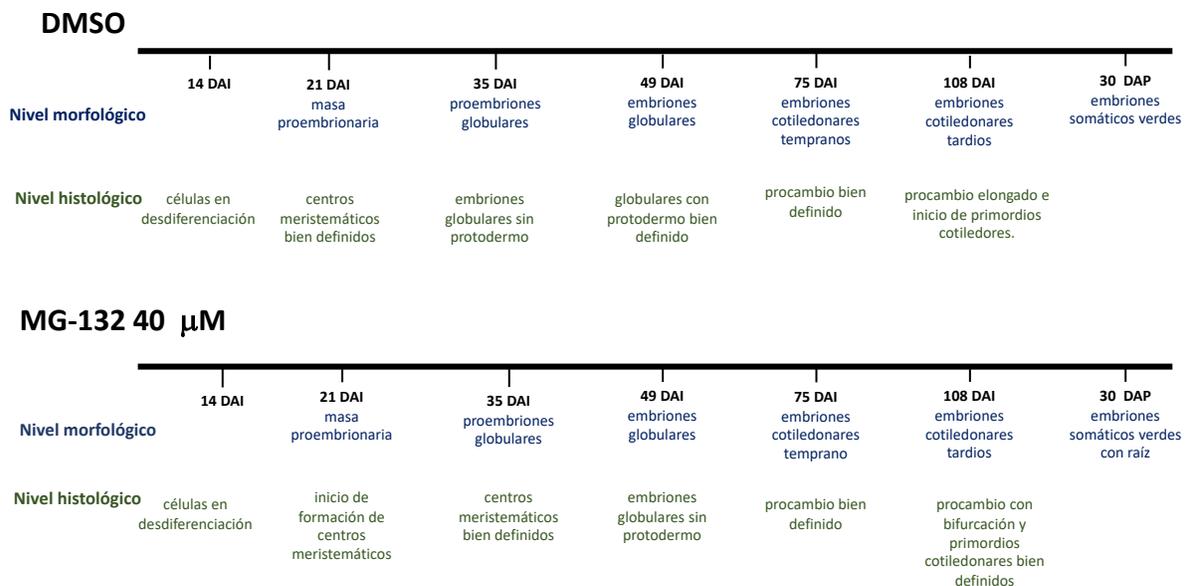


Figura 4.12. Resumen de los cambios morfológicos e histológicos observados en los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 y DMSO durante la inducción de la ES.

4.3.6.2. Movilización de reservas durante inducción de la ES.

En diferentes trabajos se reporta que la desdiferenciación celular de los explantes da lugar a la movilización de reservas como, proteínas, azúcares y lípidos, la formación de embriones globulares y su posterior conversión a embriones cotiledonares. (da Silva et al., 2015; Ferrari et al., 2021; Rocha et al., 2012). Con el fin de saber, si el inhibidor del proteasoma 26S MG-132 colocado en el pretratamiento de la inducción de la ES impacta la movilización de reservas durante la inducción de la ES en *C. canephora*, se procedió a analizar a nivel histoquímico, el progreso de la formación del embrión globular y su conversión a embrión cotiledonar en el medio de Yasuda modificado.

Los explantes previamente tratados con 40 μ M MG y DMSO fueron analizados histoquímicamente utilizando tres distintas tinciones: tinción de PÚS (Periodic Acid-Schiff) para observar la movilización de los azúcares (principalmente almidón); tinción de XP para visualizar la movilización de proteínas totales y SUDAN IV para observar la movilización de lípidos totales.

Los análisis histoquímicos incluyeron muestras tomadas a los -3DBI, es decir, explantes de hojas juveniles bien estructuradas. A los -3DBI, 0 y 7 DAI las pruebas histológicas con PAS, mostraron que los tejidos foliares no contienen gránulos de almidón en ambos tratamientos (Figura 4.13 A, B, E y F). Posteriormente, a los 14 DAI, en ambos tratamientos se observó la presencia de gránulos de almidón (Figura 4.13 C y G). Los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 contenían una mayor cantidad de gránulos de almidón que los explantes tratados con DMSO. (Figura 4.13 C y G).

A los 21 DAI, los explantes tratados con DMSO presentaron estructuras de centros meristemáticos y se observó un incremento de gránulos de almidón con respecto a los 14 DAI para el mismo tratamiento. (Figura 4.13 D y H). Por otro lado, a los 21 DAI los explantes tratados con 40 μ M MG-132 presentaron áreas pequeñas al inicio de formación de centros meristemáticos y se observó una cantidad mayor de gránulos de almidón en comparación con el día 14 DAI para el mismo tratamiento (Figura 4.13 D y H). Entre tratamientos, se observó a los 21 DAI que los explantes tratados con 40 μ M MG-132 contenían una menor cantidad de gránulos de almidón comparado con los explantes tratados con DMSO. Esto se evidenció con una mayor visualización de gránulos en las áreas de centros meristemáticos de los explantes previamente tratados con DMSO (Figura 4.13 D y H).

Posteriormente, al día 35 DAI, los explantes tratados con DMSO, presentaron estructuras de embriones pre-globulares y una disminución de gránulos de almidón con respecto al día 21 DAI para el mismo tratamiento (Figura 4.13 I y J). Por otro lado, los explantes tratados con MG-132, presentaron centros meristemáticos similares a los observados en los explantes tratados con DMSO al día 21 DAI y una disminución de gránulos de almidón con respecto al día 21 DAI para el mismo tratamiento. Entre tratamientos, no se observó diferencia en el nivel de acumulación de gránulos de almidón (Figura 4.13 M y N).

Posteriormente, a los 49 DAI, los explantes sometidos al tratamiento con DMSO y MG-132 presentaron estructuras de embriones globulares, que contenían gránulos de almidón, con protodermo y con ausencia de este, respectivamente. Entre tratamientos, se observó que los explantes tratados con MG-132 contenían una mayor cantidad de gránulos de almidón. Esto se evidenció con una mayor visualización de gránulos en las células que comprendían los embriones globulares (Figura 4.13 K, L O y P).

A los 75 DAI, los explantes de ambos tratamientos presentaban estructuras de embriones cotiledonares tempranos con un procambium bien definido y cotiledonares elongados. Ambos tratamientos, presentaban una acumulación de gránulos de almidón en las células que comprendían la región de cotiledonares y en las células que comprendían la epidermis del embrión. Entre tratamientos, no se observó diferencias visuales en la concentración de gránulos de almidón en las células de las regiones mencionadas anteriormente (Figura 4.13 Q, S).

Después, a los 108 DAI, los explantes de ambos tratamientos presentaban estructuras de cotiledonares tardíos y una disminución en la acumulación de gránulos de almidón con respecto a los 75 DAI, de sus respectivos tratamientos (Figura 4.13 R y T).

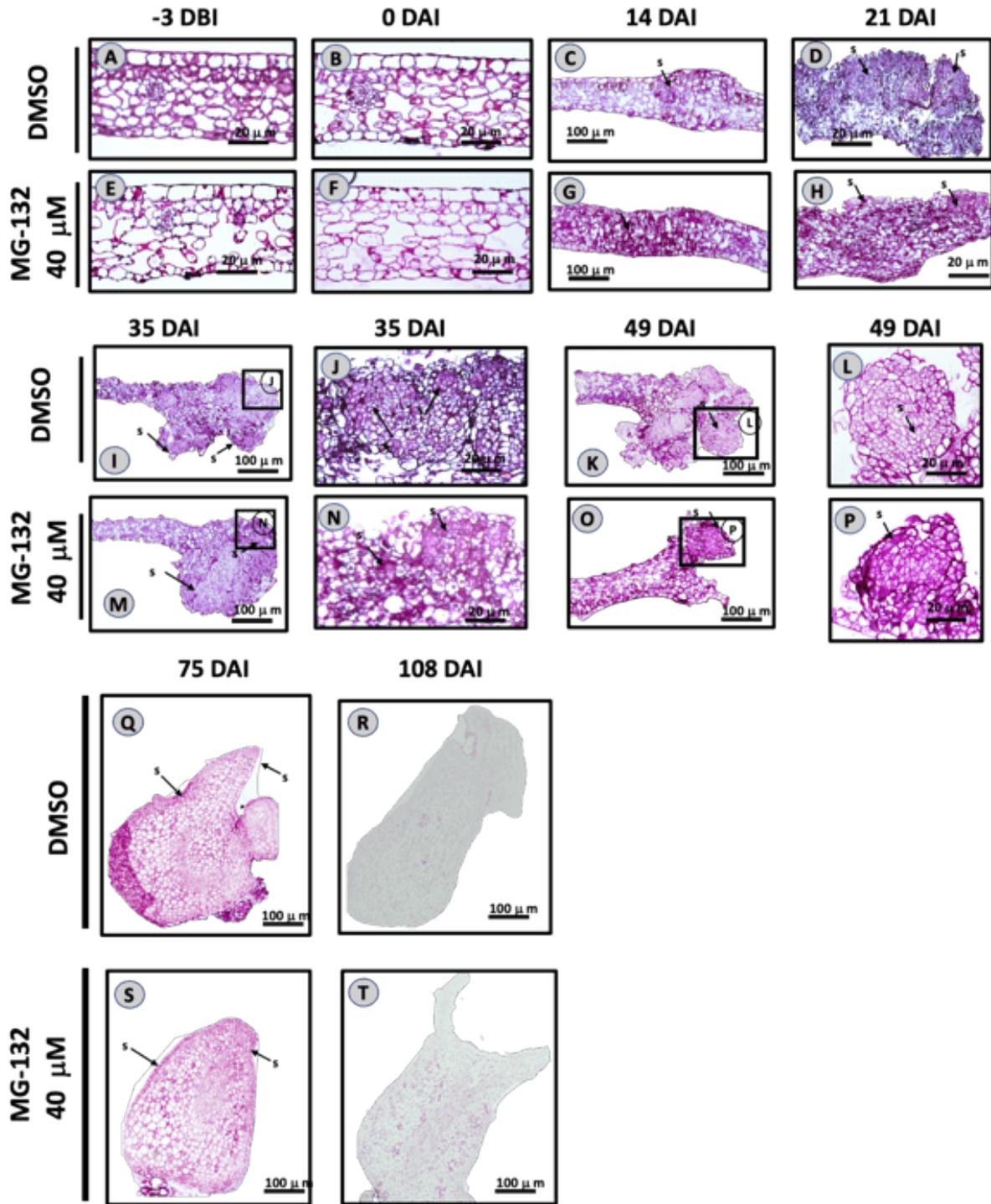


Figura 4.13. Análisis histoquímico de la ES en explantes de *C. canephora* tratados con y sin 40 μM MG-132. Secciones transversales de explantes previamente tratados con 40 μM del inhibidor MG-132 y DMSO, sometidas a Periodic Acid-Schiff (PAS) a los -3DBI, 0, 14, 21, 35, 49 DAI. (A y E) hoja de café a los 3 DBI, día en el que se expone el explante con el inhibidor MG-132; (B y F) explantes iniciales; (C y G) explantes a los 14 DAI; (D) explante con formación de centros meristemáticos a los 21 DAI; (H) explante con áreas de inicio de formación de centros

meristemáticos a los 21 DAI; (I y J) explante con embriones pre-globulares a los 35 DAI; (M y N) explante con formación de centros meristemáticos a los 35 DAI; (K y L) explantes con embriones globulares con un protodermo bien definido a los 49 DAI; (O y P) explantes con embriones globulares sin protodermo definido a los 49 DAI; (Q y S) cotiledonares tempranos con cotiledón y procambio bien definido a los 75 DAI; (R) cotiledonares tardíos con procambio alargado e inicio de primordios cotiledonares a los 108 DAI; (T) cotiledonares tardíos con procambio alargado y bifurcado, con primordios cotiledonares bien definidos a los 108 DAI. DBI: Días previos a la inducción de la ES; DAI: Días después de la inducción de la ES. DBI: Días previos a la inducción de la ES; DAI: Días posteriores a la inducción de la ES; s: áreas con granúlos de almidón.

La tinción de XP de los tejidos foliares a los -3DBI, 0 y 7 DAI no presentaron cuerpos proteicos. Esto fue observado en ambos tratamientos (Figura 3.14 A, B, E y F). Posteriormente, a los 14 DAI, en ambos tratamientos se observó la presencia de pequeños cuerpos proteicos (Figura 4.14 C y G). Sin embargo, los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132, contenían una mayor cantidad de cuerpos proteicos en comparación con los explantes tratados con DMSO (Figura 4.14 C y G).

Posteriormente, a los 21 DAI, los explantes previamente tratados con DMSO mostraron una mayor acumulación de cuerpos proteicos en las áreas de centros meristemáticos en comparación con las demás regiones del tejido. De manera similar, para los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132, se observó una mayor cantidad de cuerpos proteicos en el área de inicio de centros meristemáticos (Figura 4.14 D y H). Los explantes previamente tratados con DMSO mostraron un mayor contenido de cuerpos proteicos en comparación con el tratamiento de 40 μ M MG-132. Esto se evidenció con una mayor acumulación de la tinción de XP en las áreas de centros meristemáticos en el tratamiento de DMSO (Figura 4.14 D y H).

A los 35 DAI, los explantes previamente tratados con DMSO mostraron una menor acumulación de cuerpos proteicos en las áreas de embriones pre-globulares en comparación a los centros meristemáticos formados a los 21 DAI para el mismo tratamiento. Por otro lado, los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 presentaron una mayor acumulación de cuerpos proteicos en las áreas de centros meristemáticos en comparación de las demás regiones del tejido (Figura 4.14 I, J, M y N).

A los 49 DAI, los explantes previamente tratados con DMSO mostraron cuerpos proteicos dispersos en las células que comprenden el embrión globular. Por otra parte, los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 se observó un aumento de cuerpos proteicos en las

células que comprenden los embriones globulares en comparación con las áreas de los centros meristemáticos formados a los 35 DAI en el mismo tratamiento. Entre tratamientos, se observó al a los DAI que los explantes tratados con 40 μ M MG-132 contenían una mayor cantidad de cuerpos proteicos comparado con los explantes tratados con DMSO. Esto se evidenció con una mayor visualización de cuerpos proteicos en las células que comprendían los embriones globulares de los explantes previamente tratados con con 40 μ M MG-132 (Figura 3.14 K, O, L y P).

Posteriormente, a los 75 DAI ambos tratamientos presentaban una mayor acumulación de cuerpos proteicos en las áreas de la epidermis, procambium y cotiledon del embrión cotiledonar temprano. Durante este tiempo, los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 muestran un mayor contenido de cuerpos proteicos en comparación con el tratamiento de DMSO (Figura 4.14 Q y S). Esto se evidenció con una mayor acumulación de la tinción de XP en las áreas de la epidermis, procambium y cotiledon del embrión cotiledonar, en el tratamiento de 40 μ M MG-132 (Figura 4.14 Q y S).

Al día 108 DAI, ambos tratamientos presentaban una menor acumulación de cuerpos proteicos en comparación, al día 75 de sus respectivos tratamientos. Durante este tiempo, los explantes previamente tratados con DMSO no presentaba diferencia en la acumulación de cuerpos proteicos con respecto a los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132 (Figura 4.14 R y T).

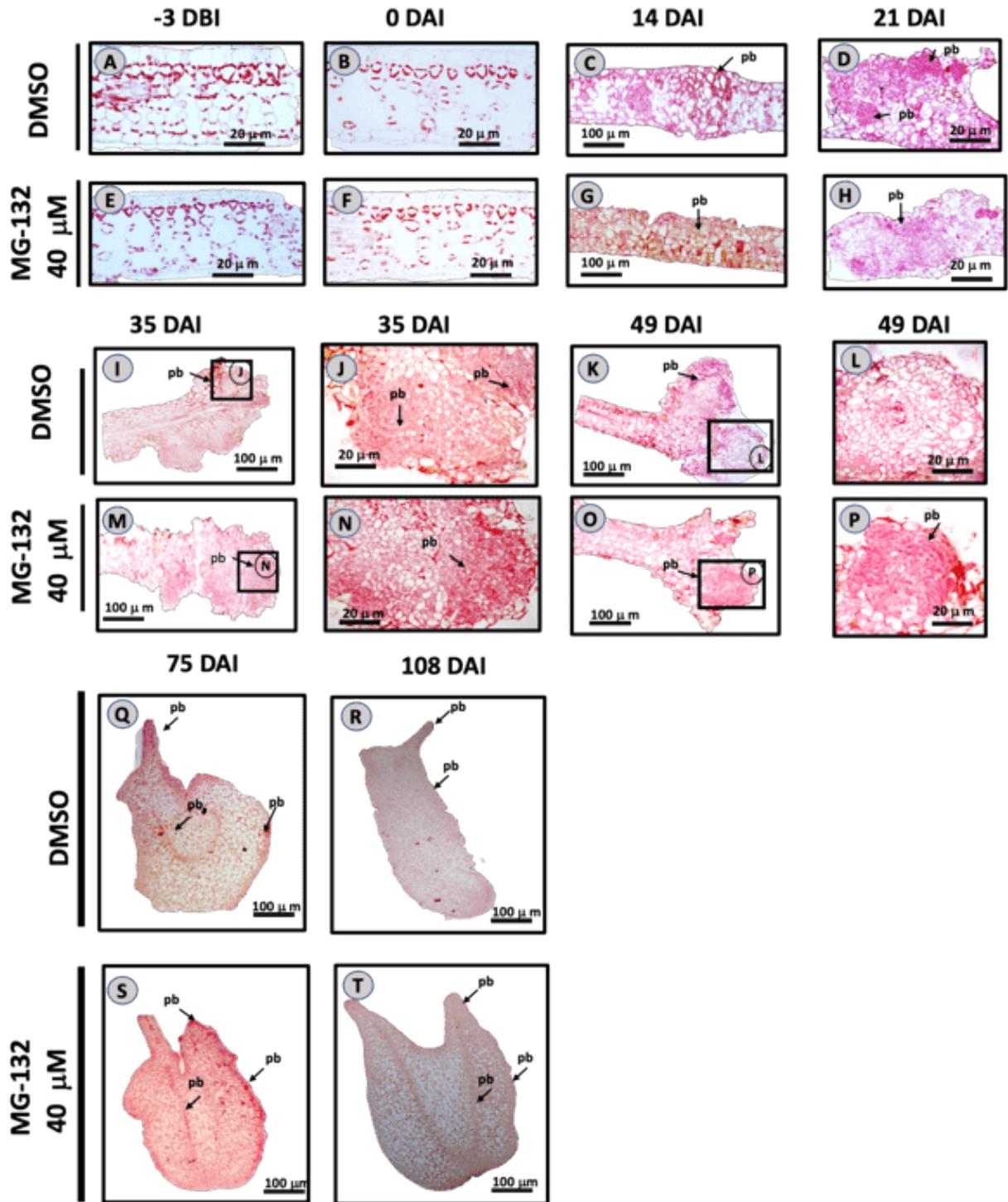


Figura 4.14. Análisis histoquímico de la ES en explantes de *C. canephora* tratados con y sin 40 μM MG-132. Secciones transversales de explantes previamente tratados con 40 μM del inhibidor MG-132 y DMSO, después sometidas a Xilidina Ponceau a los -3DBI, 0, 14, 21, 35, 49 DAI. (A y E) hoja de café a los 3 DBI, día en el que se expone el explante con el inhibidor MG-132; (B y F) explantes iniciales; (C y G) explantes a los 14 DAI; (D) explante con

formación de centros meristemáticos a los 21 DAI; (H) explante con áreas de inicio de formación de centros meristemáticos a los 21 DAI; (I y J) explante con embriones pre-globulares a los 35 DAI; (M y N) explante con formación de centros meristemáticos a los 35 DAI; (K y L) explantes con embriones globulares con un protodermo bien definido a los 49 DAI; (O y P) explantes con embriones globulares sin protermo definido a los 49 DAI; Q y S: cotiledonares tempranos con cotiledon y procambio bien definido a los 75 DAI; (R) cotiledonares tardíos con procambio alargado e inicio de primordios cotiledonares a los 108 DAI; (T) cotiledonares tardíos con procambio alargado y bifurcado, y con primordios cotiledonares bien definidos a los 108 DAI. DBI: Días previos a la inducción de la ES; DAI: Días posteriores a la inducción de la ES; pb: áreas que presentan cuerpos proteicos.

4.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

4.4.1. Impacto del proteasoma 26S en la inducción de la ES y en la germinación de los embriones somáticos cotiledonares.

El inhibidor MG-132 del proteasoma 26S, es un inhibidor reversible, se ha utilizado en *Chlamydomonas reinhardtii* P.A. Dang para el estudio de la fotosíntesis en condiciones de estrés (Mendoza et al., 2020), *Actinidia deliciosa* var. Deliciosa en el desarrollo del tubo polínico (Speranza et al., 2001) y *Brassica napus* L. en el desarrollo de la raíz (Pereksta et al., 2020). Estos trabajos han aplicado el inhibidor durante 3 a 48 horas y han podido observar que al cambiar el tejido de estudio a un medio libre del inhibidor MG-132, los tejidos pueden recuperar la actividad del proteasoma 26S en las primeras 8 horas y seguir su proceso biológico.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la inhibición del proteasoma 26S en el pretratamiento afecta la frecuencia de producción de embriones globulares y la eficiencia de conversión de los embriones globulares a cotiledonares en la inducción de la ES de *C. canephora*. Este efecto se puede observar en la diferencia significativa entre el número de embriones globulares producidos en los diferentes tratamientos, obteniendo para los explantes tratados con diferentes concentraciones del inhibidor MG-132 (20 μ M, 40 μ M, 80 μ M) un menor número de embriones globulares con respecto al testigo. Por otro lado, la relación embriones cotiledonares / globulares fue mayor para los explantes previamente tratados con el inhibidor MG-132 a comparación del testigo, sugiriendo fuertemente que una baja en la actividad del proteasoma 26S esta correlacionada con una eficiente ES. Al mismo tiempo, nuestros hallazgos generados hasta el momento ponen en evidencia el paradigma sobre sí todos los embriones que han alcanzado el

estadio globular, en presencia o ausencia de la actividad del proteasoma 26S, siguen el mismo programa de desarrollo para llegar a ser embriones somáticos cotiledonares.

Por último, los resultados mostraron que las plántulas de los explantes previamente tratados con el inhibidor MG-132, presentaban raíces de mayor longitud con respecto a las plántulas de los explantes testigo. Nosotros sugerimos, que posiblemente algunas proteínas acumuladas por la inhibición del proteasoma 26S en el pretratamiento, pudieron persistir después de que los explantes se transfirieron del medio de Yasuda modificado y libre del inhibidor MG-132 y después de que los embriones cotiledonares se transfirieron al medio MS de propagación libre del inhibidor MG-132. Por lo tanto, contribuir a la capacidad embriogénica y/o participar en la iniciación temprana de la raíz, probablemente a través de un incremento en la sensibilidad a los reguladores de crecimiento que están relacionados con la determinación la identidad de la raíz y el embrión somático como son las auxinas y citocininas.

No obstante, se requieren otros experimentos por realizar para poder concluir y discutir de qué manera la inhibición del proteasoma 26S pudiera estar afectando la ES en café.

4.4.2. Impacto del proteasoma 26S en el origen del embrión somático.

A pesar de los grandes esfuerzos por dilucidar los factores externos y la señal molecular que interviene en el origen del embrión somático, aún hay mucho por estudiar. Grzyb et al., 2019 y Mikula et al., 2020 estudiaron en *Cyathea delgadii* el efecto del tipo de explante (estípite y entrenudo), la longitud y el diámetro de la fronda donante del explante y el tratamiento de estrés (mediante sacarosa y desecación por aire); sobre el origen del embrión somático y la eficiencia de la ES. Sus estudios sugieren que el tipo de explante a utilizar y los factores externos como el estrés durante la inducción de la ES desempeñan un papel importante en el origen del embrión somático (Grzyb and Mikula, 2019; Mikula et al., 2021). Por otro lado, se ha reportado que el proteasoma 26S interviene en la respuesta de estrés en las plantas (Stone, 2019). Nuestros resultados muestran que los explantes expuestos al inhibidor MG-132 desarrollan embriones provenientes de un origen unicelular y multicelular, pero presentaron mayores estructuras características de un origen multicelular en las muestras analizadas en comparación con los explantes expuestos al DMSO.

4.4.3. Impacto del proteasoma 26S en la progresión morfológica, histológica y en la movilización de reservas durante la inducción de la ES.

La capacidad de totipotencia de las células vegetales, es clave para la ES, ya que permite que las células somáticas bajo condiciones óptimas, se desdiferencien, rediferencien y adquiera competencia embriogénica. El proceso de ES, involucra cambios morfológicos en las células vegetales, que resultan en la formación de un embrión somático. Asimismo, el proceso de la ES involucra la movilización de reservas. Por otro lado, se ha reportado ampliamente que la percepción y señalización de las auxinas juegan un papel importante en la regulación molecular y estructural de la adquisición de la totipotencia y, por lo tanto, para el proceso de la ES. También se ha reportado que la vía UPS regula la percepción y señalización de las auxinas e influye en la sensibilidad exógena de las citocininas. El trabajo aquí presentado y discutido es innovador ya que, analiza el efecto de la inhibición del proteasoma 26S en la inducción de la ES de *C. canephora*, a través de la histología e histoquímica.

Los resultados del análisis histológico mostraron que los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132, tuvieron una respuesta diferente en el proceso de desdiferenciación con respecto, al tratamiento con DMSO. Esta respuesta, en los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132, posiblemente resultó, en un atraso de la formación de los centros merismáticos en el día 21 DAI, en comparación, de los explantes previamente tratados con DMSO. Interesantemente, se ha relacionado la competencia embriogénica con la formación de centros meristemáticos (Ferrari et al., 2021). Tomando en cuenta lo anterior, se propone que algunas proteínas acumuladas por la inhibición del proteasoma 26S en el pretratamiento, pudieron persistir después de que los explantes se transfirieron del medio de Yasuda modificado libre del inhibidor MG-132, y por lo tanto, alterar la respuesta embriogénica que se vio reflejada en el retraso de la formación de los centros meristemáticos y el tamaño de estos en la inducción de la ES.

Por otro lado, los resultados de los análisis histoquímicos de los explantes previamente tratados con 40 μ M MG-132, mostraron diferentes patrones de acumulación de gránulos de almidón y cuerpos proteicos, con respecto al tratamiento con DMSO, durante la inducción de la ES. Se propone, que algunas proteínas acumuladas por la inhibición del proteasoma 26S en el pretratamiento, pudieron persistir después de que los explantes se transfirieron del medio de Yasuda modificado libre del inhibidor MG-132 y, por lo tanto, modificar el metabolismo de almidón y proteínas, provocando una alteración en las biomoléculas de reserva, durante la inducción de la ES.

CAPÍTULO V: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA ES.

5.1. INTRODUCCIÓN

La expresión de los genes *ARF5*, *AHK1*, *LEC1*, *BBM*, *WOX4*, *AGL15* y *FUS3* son clave para que las fases de la ES puedan llevarse de manera exitosa (Gulzar et al., 2020; Moncaleán et al., 2019). *ARF5* (*AUXIN RESPONSE FACTOR 5*) es un gen que codifica un factor de transcripción que interviene en la señalización de las auxinas, su expresión es crucial en la respuesta embriogénica (Wójcikowska y Gaj, 2017b). *ARF5* controla la expresión de los genes *LEC1* y *FUS3*, los cuales pertenecen a la familia de genes *LEAFY COTYLEDON (LEC)* (Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016). *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)* y *FUSCA 3 (FUS3)* se consideran factores de transcripción maestros en la ES, la sobreexpresión de estos dos genes induce la formación espontánea de embriones somáticos sin la necesidad de adicionar reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Horstman et al., 2017b). De manera similar, se ha reportado que *BABY BOOM (BBM)* es un gen clave para la formación del embrión somático, su expresión se ha reportado durante la inducción y el desarrollo del embrión somático y en el meristemo de la raíz, se sugiere que regula la proliferación celular y la morfogénesis en la ES (Horstman et al., 2017b; Khanday et al., 2020; Nic-Can et al., 2013). Por otro lado, *AGAMOUS-LIKE15 (AGL15)* es otro gen que se ha reportado que su expresión constitutiva ectópica promueve la ES, y su mutación (pérdida de función) reduce significativamente la ES (Zheng et al., 2016).

HISTIDINE KINASE 1 (AHK1) es un gen que codifica una proteína histidina cinasa que interviene en la percepción y señalización de las citocininas (Kroll y Brenner, 2020). Se ha reportado que la expresión del gen *AHK1* modula la expresión del gen *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 4 (WOX4)*, el cual interviene en el mantenimiento de células meristemática (Haecker et al., 2004; Ohmori et al., 2013; Su et al., 2009). Su expresión se ha observado durante la inducción de la ES y en el desarrollo de los meristemas apicales (SAM) y radicales (RAM) del embrión somático.

Por otro lado, se ha estudiado la expresión de los genes *ARF5*, *YUC1*, *IPT1*, *BBM*, *LEC1* y *WOX4*, en los primeros días de la inducción de la ES de *C. canephora* y en los estadios de corazón torpeda y cotiledonar, con el fin de entender mejor el proceso de la ES. Quintana-Escobar et al., con el objetivo de comprender el papel de las auxinas en la ES, estudió la expresión de los genes *ARFs* y reportó que la expresión del gen *ARF5* es crucial durante la inducción de la ES, su

expresión incrementa durante los primeros 21 días de la inducción de la ES (Figura 5.1 A) (Quintana-Escobar et al., 2019). De manera similar, Uc-Chuc et al., que estudiaron los genes *YUCs*, encontraron que el gen *YUC1* estaba altamente expresado en el día 0 de la inducción de la ES y su expresión decreció durante los siguientes días de la inducción de la ES (Figura 4.1 B) (Uc-Chuc et al., 2020). Avilez-Montalvo et al., con el objetivo de conocer el papel de las citocininas en la ES, estudió el comportamiento de los genes relacionados a la síntesis y señalización de las citocininas y reportó que el gen *IPT1* aumenta su expresión bruscamente durante los primeros minutos de la inducción de la ES y luego vuelve al mismo nivel que se expresa en el pretratamiento de la ES (Figura 5.1 C) (Avilez-Montalvo et al., 2022).

Nic-Can et al., con el fin de conocer el papel de la metilación de histonas en la ES, observaron el comportamiento de los genes *BBM*, *LEC1* y *WOX4*, descubrieron que estos genes estaban ausentes o se expresaban en niveles bajos al día 0 de la inducción de la ES. Pero, la expresión de *BBM* y *LEC1* incrementaba en los días 21 después de la inducción de la ES y en los estadios de globular, corazón y cotiledonar. Al contrario de *BBM* y *LEC1*, el gen *WOX4* aumenta su expresión en la etapa de pretratamiento de la ES y en los días 7, 14 y 21 después de la inducción de la ES. En los estadios de globular, corazón y cotiledonar es muy baja su expresión con respecto a los tiempos antes mencionado (Figura 5.1 D, E y F) (Nic-Can et al., 2013).

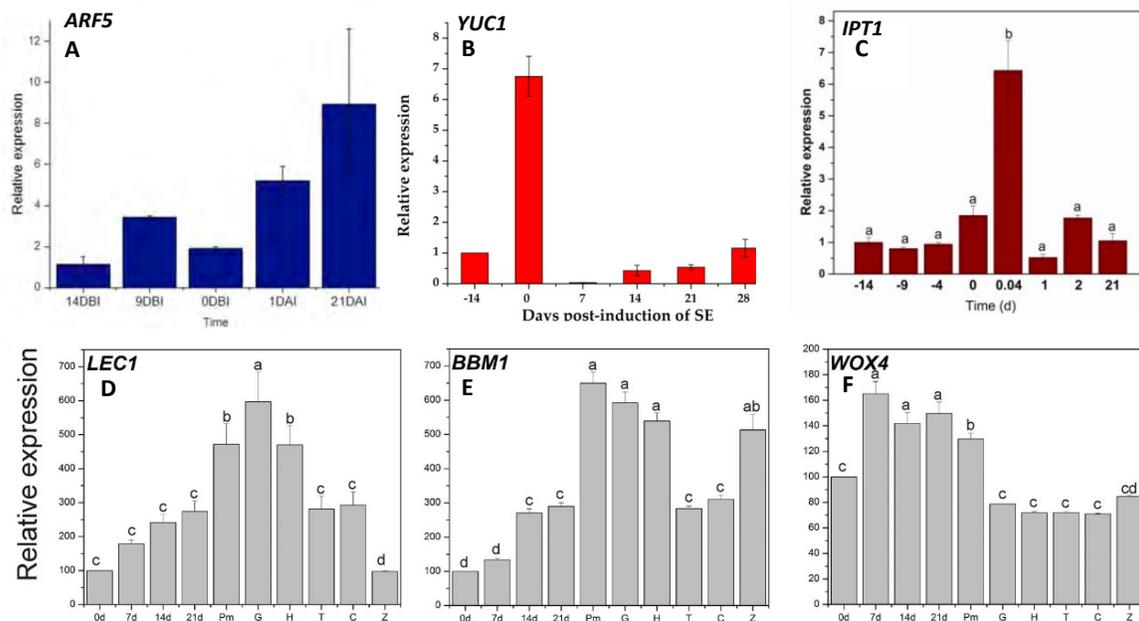


Figura 5.1. Expresión de los genes *ARF5*, *YUC1*, *IPT1*, *LEC1*, *BBM1*, *WOX4* durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (A) expresión del gen *ARF5* reportado por Quintana-

Escobar et al., 2019 durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (B) expresión del gen *YUC1* reportado por Uc-Chuc et al., 2020 durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (C) expresión del gen *IPT1* reportado por Avilez-Montalvo et al., 2022 durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (D) expresión del gen *LEC1* reportado por Nic-Can et al., 2013 durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (E) expresión del gen *BBM1* reportado por Nic-Can et al., 2013 durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (F) expresión del gen *WOX4* reportado por Nic-Can et al., 2013 durante la inducción de la ES en *C. canephora*. 14 DBI, -14: 14 días antes de la inducción de la ES; DAI: días después de la inducción de la ES; DBI: días antes de la inducción de la ES; -9, -14: 9 y 14 días antes de la inducción de la ES; G: globular; H: corazón; T: torpedo; C: cotiledonar; Z: embrión cigótico; Pm: masa proembriónica; 0d, 7d y 14d: 0, 7 y 14 días después de la inducción de la ES.

Considerando que la ES implica una compleja diferenciación celular regulada a nivel molecular por el patrón de expresión de los genes *ARF5*, *AHK1*, *LEC1*, *BBM*, *WOX4*, *AGL15* y *FUS3*, y que en el capítulo anterior se demostró que el proteasoma 26S podría tener un papel en dicha diferenciación celular; en este trabajo se inhibió el proteasoma 26S utilizando el inhibidor reversible MG-132 durante el pretratamiento para la inducción de la ES en *C. canephora* y se analizó la expresión de los genes relacionados con la regulación molecular de la ES, con el fin de comprender el papel del proteasoma 26S en la regulación molecular de la ES.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Preparación del material vegetal, inducción de la ES y germinación de los embriones.

Las plantas de *C. canephora*, se propagaron en condiciones de 25 ± 2 °C, bajo fotoperiodo 16 / 8h ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), en medio Murashige & Skoog (Phyto Technology Laboratories, M524) ajustado a pH 5.8 y suplementado con: tiamina-HCl 29.6 μM (Sigma, T3902), *Myo*-inositol 550 μM (Sigma, I5125), cisteína 0.15 μM (Sigma, C8277), sacarosa 87.64 mM (Sigma, S539) y 0.25% (p/v) Goma gellan (PhytoTechnology Laboratories, G434). Para la inducción de la ES, las plántulas se transfirieron al mismo medio suplementado con ácido naftalenacético 0.54 μM (NAA; Sigma, N1145) y kinetina 2.32 μM (KIN; Sigma, K0753) por 14 días, en las mismas condiciones de temperatura y fotoperiodo. Posteriormente, se tomaron las primeras hojas de las plántulas para cortar los explantes con sacabocados en un tamaño de 0.25 cm², después colocados en medio líquido Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985), en presencia de 5 μM de Benciladenina (BA; PhytoTechnology Laboratories, B800) y se cultivaron a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 55 rpm durante 108 días.

Los embriones cotiledonares producidos en el medio de Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985) se transfirieron al medio de propagación.

5.2.2. Tratamiento con el inhibidor del proteasoma 26S MG-132

Para la inhibición del proteasoma 26S, el inhibidor reversible MG-132 (abcam, ab141003) se añadió al medio de pretratamiento a la concentración de 40 μM . La concentración fue seleccionada con base al análisis de dosis respuesta del inhibidor durante la formación de embriones globulares y la germinación del embrión somático cotiledonar (Ver 4.3.1 y 4.3.3). De manera similar a lo descrito el capítulo IV, en el apartado 4.2.2. La adición de MG-132 se realizó tres días antes de pasar al medio de Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985) (tiempo -3). Pasado el tiempo -3, se continuó con el proceso de inducción de la ES en *C. canephora* sin el uso del inhibidor (Figura 5.2). Como testigo se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO). Se tomaron muestras los días -3, 0, 3, 21, 49 y 108.

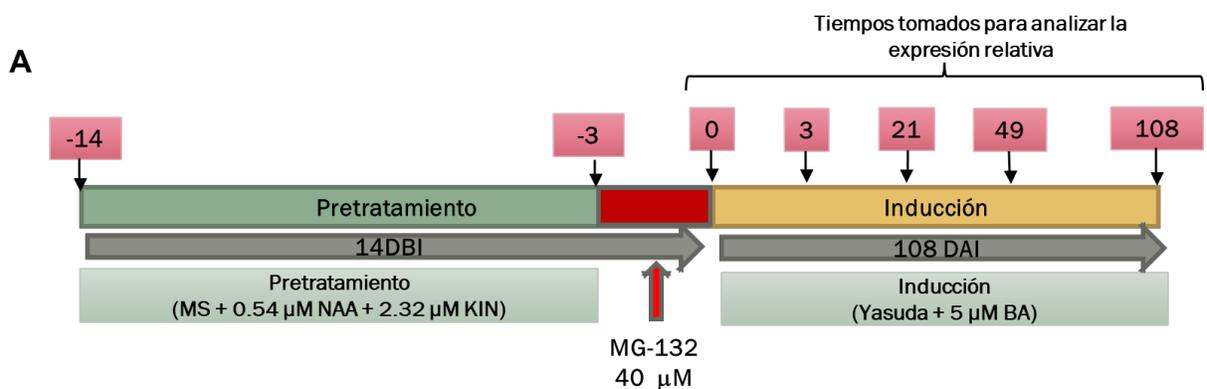


Figura 5.2. Esquema experimental para la toma de muestras durante la ES en *C. canephora*. (A) proceso de la inducción de la ES en *C. canephora*. 14 DBI: 14 días antes de la inducción de la ES, 108 DAI: 108 días después de la inducción de la ES.

5.2.3. Extracción de ARN, síntesis de ADNc y análisis de expresión relativa de genes involucrado en la ES por Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real (RT-qPCR).

Para la extracción del ARN total de las muestras, se empleó el método de Trizol descrito por Chomczynski (1993). Después, se realizó mediante electroforesis, la verificación de la calidad del ARN total, observando la presencia de las bandas de las unidades ribosomales 28S y 18S en un gel de agarosa al 1%. Se evaluó la calidad del ARN midiendo las relaciones de absorbancia A260/A280 y A260/A230 con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EE.UU.). Posteriormente, se procedió a realizar la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total empleando la enzima ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega), se empleó la metodología de la enzima antes mencionada. Brevemente, se añadió un 1 µg de ARN total de la muestra con 0.5 µg del oligo dT18 y la cantidad de agua estéril necesaria para un volumen final de 15 µL en tubos de 0.2 mL, los tubos se calentaron en baño maría a 70°C por 5 minutos. Después, inmediatamente se colocaron en hielo. Posteriormente se adicionaron los siguientes reactivos, parte del kit ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega), 5 µL del buffer M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) 5X, 1.25 µL de mix de dNTPs 10 mM, 100 unidades de M-MLV reversa transcriptasa y agua estéril necesaria para un volumen de 25 µL. Los tubos se incubaron a 37 °C por una hora.

Después de la síntesis de las muestras de ADNc se inició el proceso de estandarización de las cantidades de cada muestra para la PCR cuantitativa (qPCR) y la validación del gen de referencia endógeno. Para ello se empleó el gen Actina 2 (ACT2) (número de accesión: Cc07_g17400) como gen de control endógeno. Se realizaron curvas estándar de las diluciones seriales por triplicado (1, 1/10 y 1/100) a partir de 1000 ng de la muestra de ADNc. Se generó una gráfica de los valores de los ciclos de umbral (CTs) promedio obtenidos contra el logaritmo de las cantidades de ADNc usadas anteriormente, con ello se elaboró una regresión lineal de los puntos obtenidos. Se analizaron los valores de la pendiente de la ecuación obtenida y el coeficiente de correlación. Se realizó este protocolo para validar y calcular la eficiencia de la reacción, con todos los genes empleados en este trabajo.

Para todas las curvas se utilizó el termociclador de PCR en tiempo real Rotor Q MDx (QIAGEN), con el siguiente programa: período de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min; 40 ciclos a 95 °C durante 15 s con 30 s de hibridación a 61 °C.

Para amplificar los genes a analizar en este trabajo en la reacción de cadena polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) se utilizó 0.8 mM de los cebadores, 10 µL de QuantiNova Probe PCR Master Mix 2x (QIAGEN) y 100 ng de ADNc en un volumen final de 20 µL. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador de PCR en tiempo real Rotor Q MDx (QIAGEN), con el siguiente programa: período de desnaturalización inicial a 95 °C durante 2 min; 40 ciclos a 95 °C durante 15 s con 30 s de hibridación a la temperatura específica de los cebadores (Cuadro 5.1). Los resultados de RT-qPCR se analizaron mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Se utilizaron tres réplicas biológicas para la expresión génica relativa y el experimento se realizó por duplicado técnico. Como se mencionó anteriormente, el gen de la actina se usó como estándar interno del gen de interés.

Cuadro 5.1. Secuencias de los cebadores específicos para los genes analizados mediante RT-qPCR en tiempo real.

Gen	Cebador	Tm °C	Amplicon (pb)
<i>AHK1</i>	AHK1F: GGATTCTCCGCTGCTTTCTG	61	232
Cc07_g10990	AHK1R: CATCATGAGCTTTGGTCCCG		
<i>WOX4</i>	WOX4F: TTGCACGTGGATTTTGGGAG	61	176
Cc07_g10660	WOX4R: GTCGTCTGAGGATCCAAGCT		
LEC1	LEC1F: TTCACTTGCCTCATCACCT	61	155
Cc09_g00330	LEC1R: GTCATTAGCCACCACAGCAG		
BBM	BBMF: TACGAGAAGGAGGTGGAGGA	61	211
Cc06_g13190	BBMR: CTGCTTCCTCTTGTGTGCTG		
AGL15	AGL15F: GTTCTTTGCGATGCTGAGGT	61	151
Cc02_g28980	AGL15R: GCTCACGCTGATGTTCAACT		
FUS3	FUS3F: TCTGGACATGGAGCTCAAGG	61	221

Cc07_g01190	FUS3R: TGTCCTCCTACCCTCGAGAA		
ARF5	F-ARF5: CAGCGAGCAGGTTTCAGTTT	61	155
Cc10t01900.1	R-ARF5: GTTGAAGGCTCATTTGGGCA		
YUC1	F-YUC1: CCTGGCTCAAGGGTTGTGAT	61	179
Cc11t01360.1	R-YUC1: CATTACGTCCATTGACCCGC		
IPT1	F-IPT1: CACATCATTTCCTGGGCGAG	61	173
Cc11t10030.1	R-IPT1: CTCCGAGTTAAACCGCTTCG		
ACT2	F-ACT 2: AGCAACTGGGATGACATGGA	61	233
Cc07t17400.1	R-ACT 2: TCCAGCACAATACCAGTCGT		

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Expresión de genes involucrados en la inducción de la ES.

Se determinó la expresión de los genes *YUC1*, *IPT1*, *ARF5*, *AHK1*, *LEC1*, *BBM*, *WOX4*, *AGL15* y *FUS3* en los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 de ES, utilizando explantes pretratados con y sin MG-132.

Primero se verificó la calidad de la extracción de ARN en geles de agarosa al 1%. Se observaron las bandas de las unidades ribosomales 28S y 18S mediante el equipo ChemiDoc™ Imaging Systems - Bio-Rad ChemiDoc™ MP (Figura 5.3).

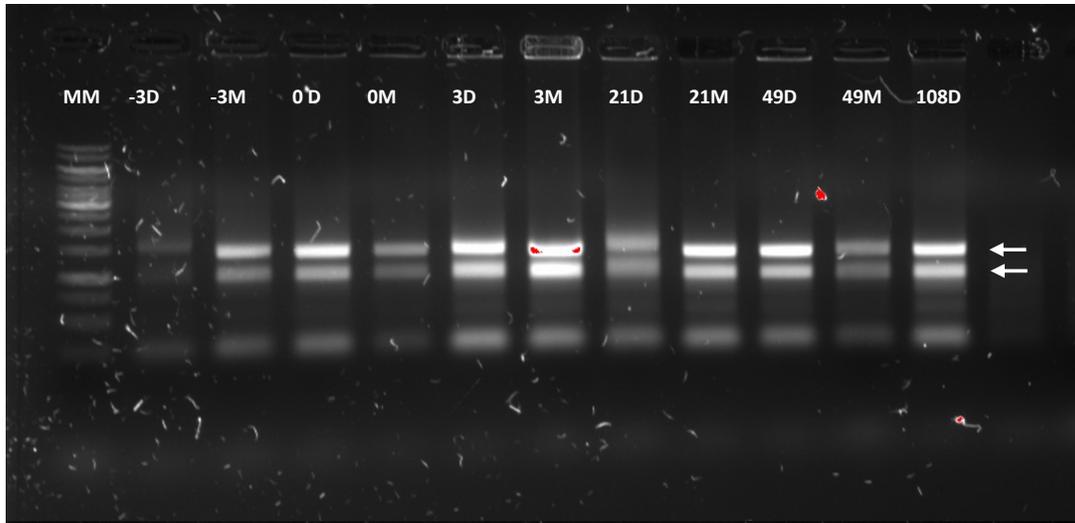


Figura 5.3. Verificación de la calidad del ARN total. (A) Extracciones de ARN total de las muestras a los -3 DB, a los 0, 3, 21, 49 y 108 DAI. MM: Marcado molecular 1Kb; D: explante previamente tratado con DMSO; M: explante previamente tratado con MG-132. Las flechas señalan las bandas de las unidades ribosomales 28S y 18S.

Posteriormente, para la validación de los oligos y cálculo de la eficiencia de las reacciones, se determinaron los valores de CTs de diferentes diluciones de ADNc de una muestra. Se elaboró una gráfica de los valores de los ciclos de umbral (CTs) obtenidos contra el logaritmo de las cantidades de ADNc usadas (Figura 5.4). Se realizó la regresión lineal de los puntos obtenidos y se analizaron los valores de la pendiente de la ecuación obtenida y el coeficiente de correlación. Esta validación y cálculo de eficiencia de reacción se realizó para los genes *ARF5*, *AHK1*, *LEC1*, *BBM*, *WOX4*, *AGL15*, *FUS3*, *YUC1* e *IPT1*.

Muestra	Ct 1	Ct 2	Promedio Ct	Cantidad de la muestra	Log (cantidad de la muestra)
A	13.97	13.83	13.9	1.0000	0.00
B	16.53	16.01	16.27	0.1000	-1.00
C	20.53	21.2	20.865	0.0100	-2.00

Factor de dilución

Pendiente -3.4825
 R^2 0.9671
 Eficiencia (%) **93.71**

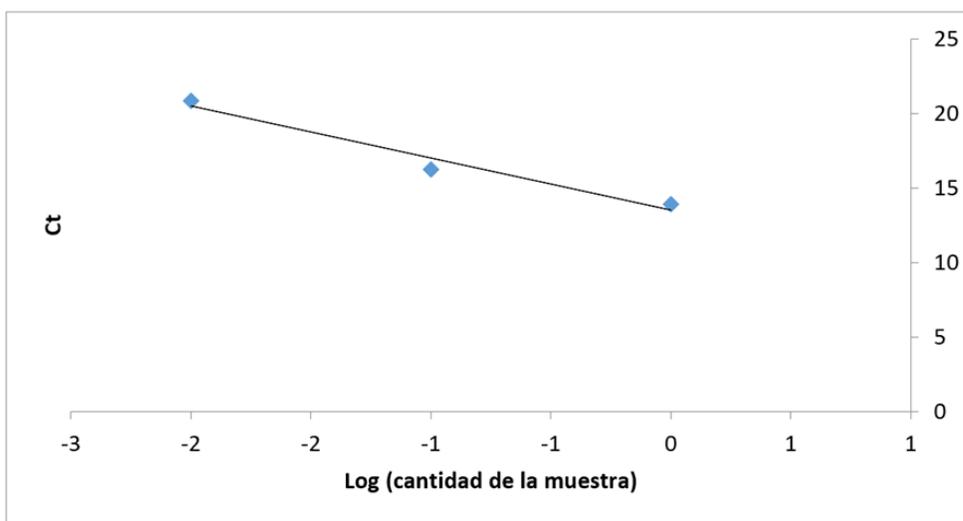


Figura 5.4. Validación del oligo ACT2 y cálculo de la eficiencia de reacción. (A) se realizó una curva estándar, se utilizó como primer punto una muestra de ADNc. A partir de ahí, se realizó una serie de diluciones, 1:10 y una 1:100. En este trabajo se utilizaron 3 puntos para la curva estándar (1, 1:10, 1:100). Se promedió los valores de Ct de las réplicas técnicas, se utilizaron dos réplicas técnicas. Después, se determinó el valor logarítmico del promedio de los Cts. (B) se obtuvo la pendiente de regresión a partir de los valores logarítmicos y los valores medios de Ct. Por último, se calculó la eficiencia de los cebadores en forma de porcentaje con la siguiente ecuación: Eficiencia (%) = $\left(\frac{-1}{10^{\text{slope}-1}}\right) \times 100$.

A continuación, se describe la cuantificación relativa de la expresión de los genes *ARF5*, *AHK1*, *LEC1*, *BBM*, *WOX4*, *AGL15*, *FUS3*, *YUC1* e *IPT1*, durante la ES.

WOX4

WOX4 promueve el mantenimiento de los centros meristemáticos y la diferenciación del procambium vascular (Endrizzi et al., 1996; Ohmori et al., 2013; Su et al., 2009). Se ha observado en los primeros días de la inducción de la ES la expresión del gen es mayor que durante el desarrollo del embrión somático (estadios de globular, corazón, torpedo y cotiledonar) (Nic-Can et al., 2013). En los explantes previamente tratados con DMSO se observó que en los días 0 y 3 DAI la expresión de *WOX4* fue a en niveles bajos. Durante el día 21 DAI se observó una inhibición de la expresión del gen. Al día 49 DAI hubo un incremento significativo de la expresión del gen. Pero, al día 108 DAI la expresión del gen volvió a inhibirse (Figura 5.5 A). En los explantes tratados con MG-132, a los días 0, 3, 21 DAI la expresión del gen se mantuvo inhibida mientras que en los días 49 y 108 DAI la expresión del gen incrementó-(Figura 5.5 A).

LEC1

LEC1 su expresión es crucial para que se lleve a cabo el proceso de la ES. Su expresión se ha observado durante la rediferenciación celular y desarrollo del embrión somático en la ES (Horstman et al., 2017b). En los explantes previamente tratados con DMSO se observó que a los días 0 y 3 DAI hubo una alta expresión del gen. Al día 21 DAI, la expresión del gen fue menor con respecto a los días 0 y 3 DAI. Por otro lado, al día 49 y 108 DAI se observó una inhibición de la expresión del gen (Figura 5.5 B).

En los explantes previamente tratados con MG-132, los días 3 y 108 DAI hubo una alta expresión del gen, 13.38 y 8.84 veces más, respectivamente, con respecto a los días 0, 21 y 49 DAI. Al día 21 y 49 DAI se observó una inhibición de la expresión del gen (Figura 5.5 B).

BBM1

La expresión *BBM1* se ha observado mayormente durante la inducción de la ES. Se considera que su expresión es clave para la proliferación celular y morfogénesis en la ES (Horstman et al., 2017b). Se evaluó la expresión relativa del gen *BBM1* mediante ensayos de RT-PCR durante la inducción de la ES (los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 DAI) de los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. En los explantes previamente tratados con DMSO se observó una expresión muy tenue del gen a los días 0 y 3 DAI. Al día 21 DAI hubo una disminución en la expresión del gen. Por otro lado, al día 49 DAI hubo un aumento significativo de la expresión del gen, 5.0 veces más, con respecto a los días 0 y 3 DAI. Al 108 DAI se observó una expresión del gen muy similar al día 0 DAI (Figura 5.5 C).

En los explantes previamente tratados con MG-132, al día 0 DAI se observó una inhibición del gen DAI. A los días 3, 21, 49 y 108 DAI se observó un aumento en la expresión del gen, 3.47, 1.32, 2.55 y 2.65 veces más, respectivamente, en comparación al día 0 DAI. El día 3 DAI fue el que tuvo una mayor expresión del gen, 3.47 veces más con respecto a los demás días (Figura 5.5 C).

FUS3

La expresión *FUS3* es constante durante la inducción de la ES. Se considera que su expresión es esencial para la inducción de la ES (Horstman et al., 2017b). Se evaluó la expresión relativa del gen *FUS3* mediante ensayos de RT-PCR durante la inducción de la ES (los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 DAI) de los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. En los explantes previamente tratados con DMSO se observó una expresión del gen a lo largo de la inducción de la ES, siendo los días 3 y 108 DAI los días con mayor expresión del gen, 4.37 y 4.55 veces más, respectivamente, con respecto a los demás días (Figura 5.5 D).

En los explantes previamente tratados con MG-132, al día 0 DAI se observó una expresión muy tenue del gen. Por otro lado, la expresión del gen se observó a lo largo de los días 3, 21, 49 y 108 DAI, siendo los días 3 y 108 DAI los días con mayor expresión del gen, 5.66 y 4.21 veces más, respectivamente, con respecto a los demás días (Figura 5.5 D).

AGL15

La expresión de *AGL15* interviene en la regulación de auxinas y por ello, su expresión es requerida en los inicios de la inducción de la ES. También se ha reportado que su expresión promueve la formación del meristemo apical. Se evaluó la expresión relativa del gen *AGL15* mediante ensayos de RT-PCR durante la inducción de la ES (los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 DAI) de los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. En los explantes previamente tratados con DMSO, al día 0 y 3 DAI se observó una alta expresión del gen 2.44 y 5.27 veces más, respectivamente, con respecto a los demás días. A los días 21 y 49 DAI se observó una represión del gen. Al día 108 DAI, se observó un aumento en la expresión del gen (Figura 5.5 E).

En los explantes previamente tratados con MG-132, al día 0 DAI se observó una expresión muy tenue del gen. Por otro lado, a los días 3, 21, 49 y 108 DAI, se observó un incremento en la expresión del gen, siendo el día 3 DAI con mayor expresión del gen, 9.86 veces más, con respecto al día 0 DAI (Figura 5.5 E).

ARF5

La expresión de *ARF5* se ha reportado a los inicios de la inducción de la ES. Se considera que su expresión es clave para la desdiferenciación y rediferenciación celular de la ES (Li et al., 2016; Quintana-Escobar et al., 2019). También se ha reportado que su expresión promueve la formación del eje embrionario y del meristemo apical (Li et al., 2016). Se evaluó la expresión relativa del gen *ARF5* mediante ensayos de RT-PCR durante la inducción de la ES (los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 DAI) de los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. En los explantes previamente tratados con DMSO, a los días 0 y 3 DAI se observó una alta expresión del gen. A los días 21 y 49 DAI se observó una inhibición del gen. Al día 108 DAI, se observó una expresión tenue del gen (Figura 5.5 F).

En los explantes previamente tratados con MG-132, a los días 0, 3, 21 y 49 DAI se observó un incremento de la expresión del gen, siendo los días 3 y 21 DAI, los días con mayor expresión del gen. Al día 108, se observó una reducción de la expresión del gen (Figura 5.5-F).

AHK1

La expresión de *AHK1* se ha reportado en la maduración de la ES en condiciones de estrés (Valencia-Lozano et al., 2021). Sin embargo, su papel y regulación durante la ES aún no está claro. También se ha reportado su expresión durante la formación del meristemo apical y radical. Se evaluó la expresión relativa del gen *AHK1* mediante ensayos de RT-PCR durante la inducción de la ES (los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 DAI) de los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. En los explantes previamente tratados con DMSO, a los días 0, 3 y 108 DAI, se observó una expresión alta del gen. Al día 21 DAI hubo una inhibición de la expresión del gen. Al día 49 DAI, la expresión del gen fue tenue (Figura 5.5 G).

En los explantes previamente tratados con MG-132, al día 0 DAI la expresión del gen se inhibió. Por el contrario, a los días 3, 21, 49 y 108 DAI, la expresión del gen fue alta en comparación al día 0 DAI, siendo el día 3 DAI con mayor expresión del gen (Figura 5.5 G).

IPT1

La expresión de *IPT1* se ha reportado durante la inducción y desarrollo temprano de la ES (Avilez-Montalvo et al., 2022). Se evaluó la expresión relativa del gen *IPT1* mediante ensayos de RT-PCR durante la inducción de la ES (los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 DAI) de los explantes

previamente tratados con DMSO y MG-132. En los explantes previamente tratados con DMSO, durante la inducción de la ES se observó una inhibición en la expresión del gen (Figura 5.5 H).

En los explantes previamente tratados con MG-132 se observó una expresión muy baja del gen durante los días 0 y 3 DAI. A los días 21 y 49 DAI, se observó un aumento en la expresión del gen. Por otro lado, al día 108 DAI se observó una inhibición de expresión la expresión del gen (Figura 5.5 H).

YUC1

La expresión de *YUC1* se ha reportado durante la inducción y desarrollo de la ES. Su expresión se considera crucial para la desdiferenciación y rediferenciación celular en la ES (Cao et al., 2019; Uc-Chuc et al., 2020). Se evaluó la expresión relativa del gen *YUC1* mediante ensayos de RT-PCR durante la inducción de la ES (los tiempos 0, 3, 21, 49 y 108 DAI) de los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. En los explantes previamente tratados con DMSO, a los días 0 y 3 DAI se observó una expresión tenue del gen. Por el contrario, a los días 21, 49 y 108 DAI se observó una inhibición en la expresión del gen (Figura 5.5 I).

En los explantes previamente tratados con MG-132, al día 0 DAI se observó una represión del gen. A los días 3, 49 y 108 DAI se observó un incremento en la expresión del gen. Por otro lado, A los 21 DAI se observó una inhibición de la expresión del gen (Figura 5.5 I).

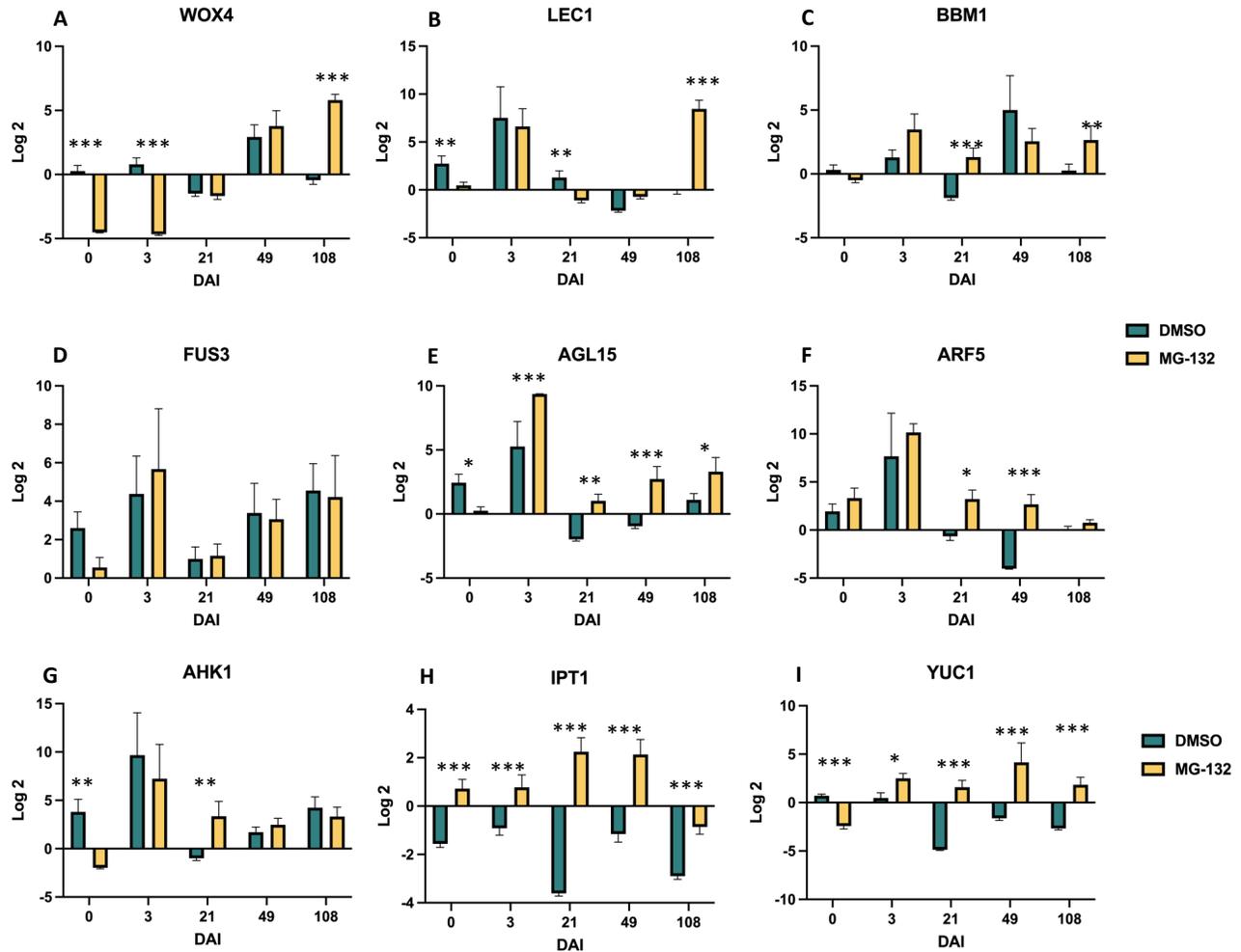


Figura 5.5. Expresión de los genes *WOX4*, *LEC1*, *BBM1*, *FUS3*, *AGL15*, *ARF5*, *AHK1*, *IPT1* y *YUC1* durante la inducción de la ES en *C. canephora*. (A) expresión del gen *WOX4*. (B) expresión del gen *LEC1*. (C) expresión del gen *BBM1*. (D) expresión del gen *FUS3*. (E) expresión del gen *AGL15* (F) expresión del gen *ARF5*. (G) expresión del gen *AHK1*, en los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. (H) expresión del gen *IPT1*, en los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. (I) expresión del gen *YUC1*, en los explantes previamente tratados con DMSO y MG-132. Los asteriscos denotan diferencias significativas entre tratamientos para determinado día de cultivo. Šídák's $P \leq 0.05$. 0, 3, 21, 49 y 108 DAI: 0, 3, 21, 49 y 108 días posteriores a la inducción de la ES; Barras verde marino: explantes previamente tratados con DMSO; Barras amarillo mostaza: explantes previamente tratados con MG-132. Los asteriscos denotan diferencias estadísticas

5.4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

5.4.1. Expresión de genes involucrados en la inducción de la ES.

Los resultados obtenidos sugieren que el proteasoma 26S está involucrado en la regulación de la expresión de los genes relacionados a la síntesis y señalización de auxinas y citocininas; y a la inducción de la ES de *C. canephora*.

WOX4

WOX4 promueve el mantenimiento de los centros meristemáticos y la diferenciación del procambium vascular (Endrizzi et al., 1996; Ohmori et al., 2013; Su et al., 2009). Se ha observado que la expresión del gen es mayor los primeros días de la inducción de la ES en comparación con los días correspondiente al desarrollo del embrión somático (estadios de globular, corazón, torpedo y cotiledonar) (Awada et al., 2023; Nic-Can et al., 2013) Estos trabajos sugieren que la expresión del gen *WOX4* en el inicio de la inducción de la ES es clave para las posteriores etapas de la ES. Encontramos que la expresión del gen *WOX4* se modificó en los explantes previamente tratados con MG-132, reprimido al inicio de la ES, pero inducido cuando el embrión llega a su estadio cotiledonar. Este patrón de expresión explica en parte el retraso de la formación de los centros meristemáticos y el desarrollo de las raíces prematuras en los embriones observados.

LEC1

LEC1 su expresión es crucial para que se lleve a cabo el proceso de la ES. Su expresión se ha observado durante la rediferenciación celular y desarrollo del embrión somático en la ES (Horstman et al., 2017b). Por otro lado, también se ha observado su expresión en los estadios de globular, corazón, torpedo y cotiledonar. Se considera que su expresión es mayor en etapas de desdiferenciación del embrión, en los primeros días de la inducción de la ES y en los días donde hay formación de centros meristemáticos (Gaj et al., 2005; Nic-Can et al., 2013). Nosotros sugerimos que disminución de la expresión del gen *LEC1* el día 21 DAI, en los explantes previamente tratados con MG-132, pudiera explicar el retraso de la formación de los centros meristemáticos y la reducción en la producción de embriones globulares. Por otro lado, sugerimos que el aumento de la expresión del gen *LEC1*, al día 108 DAI en los explantes previamente tratados con MG-132, posiblemente esté relacionado con el desarrollo prominente de los cotiledonares. Se ha reportado que el gen *LEC1* interviene en el desarrollo de cotiledonares (Horstman et al., 2017b).

BBM1

La expresión *BBM1* se ha observado durante la inducción de la ES. Se ha reportado que su expresión incrementa en los estadios de globular y corazón de la ES (Nic-Can et al., 2013). Se considera que su expresión es clave para la proliferación celular y morfogénesis en la ES, se ha observado su expresión en etapas de diferenciación celular en callos (Awada et al., 2023). De acuerdo con lo anterior, sugerimos que inhibición de la expresión del gen *BBM1* a los días 21 podría explicar el atraso de la formación de centros meristemáticos en los explantes previamente tratados con MG-132. De igual forma, el incremento de la expresión del gen *BBM1* a los 108 DAI en los explantes previamente tratados con MG-132 podría explicar el desarrollo prematuro de los cotiledonares.

FUS3

Se ha reportado que la expresión del gen *FUS3* es tenue durante la inducción de la ES e incrementa durante el desarrollo del embrión somático (Awada et al., 2023; Valencia-Lozano et al., 2021). Interesantemente, entre tratamientos, el patrón de expresión del gen fue muy similar en toda la inducción de la ES. Esto deja en evidencia la importancia de la expresión del gen *FUS3* para la que se lleve a cabo la inducción de la ES. Por otro lado, estos datos sugieren que la inhibición del proteasoma 26S en el pretratamiento de la inducción de la ES en *C. canephora*, no afectó su expresión durante la inducción de la ES.

AGL15

AGL15 interviene en la regulación de producción de auxinas como el AIA. Y su expresión alta y constante puede producir una reducción o aumento de concentración del AIA. Se ha reportado que al inicio de la inducción de la ES la célula contiene una alta concentración de auxinas y esta decrece durante los días de la inducción de la ES (Uc-Chuc et al., 2020; Zheng et al., 2016). También se ha reportado que su expresión promueve la formación del meristemo apical (Montiel et al., 202). Awada et al., reportaron que la expresión del gen *AGL15* en la embriogénesis somática indirecta de *C. arabica*, era tenue los primeros días de la ES y su expresión aumentaba en la diferenciación de callos y embriones globulares.

Por ello, sugerimos que la expresión tenue del gen *AGL15* al día 0 DAI, en los explantes previamente MG-132 con respecto a los explantes previamente tratados con DMSO y la alta expresión del gen *AGL15* a los días 3, 21, 49 y 108 DAI en los explantes previamente tratados con MG-132; pudo inferir en la concentración de auxinas endógenas y ocasionó un retraso en la formación de centros meristemáticos y una reducción en la formación de embriones globulares.

ARF5

ARF5 es un factor de transcripción que permite la expresión de genes relacionados a la auxinas durante la ES. Por ello, su expresión en los primeros días de la inducción de la ES es crucial para activar diferentes genes (Quintana-Escobar et al., 2019). Sin embargo, también es requerido una disminución de su expresión durante la inducción de la ES para permitir esta regulación molecular de los genes involucrados en la ES (Awada et al., 2019). De acuerdo con lo anterior, sugerimos que el incremento de la expresión del gen *ARF5* a los días 21 y 49 DAI, en los explantes previamente tratados con MG-132, ocasionó un cambio en el patrón de expresión de genes relacionados a las ES como *BBM1* y *LEC1* y generó una modificación en los tiempos de formación de los centros meristemáticos y, por lo tanto, en el tiempo y número de la formación de embriones globulares.

AHK1

La expresión de *AHK1* se ha reportado en la maduración de la ES en condiciones de estrés (Valencia-Lozano et al., 2021). Sin embargo, su papel y regulación durante la ES aún no está claro. Por otro lado, la expresión de *AHK1* es requerida para la percepción de las citocininas (Kroll & Brenner, 2020). Se ha reportado que las citocininas juegan un balance crucial con las auxinas en la ES (Márquez-López Ana O Quintana-Escobar Víctor M Loyola-Vargas, 2019). De acuerdo con lo anterior, nosotros sugerimos que el cambio de expresión de gen *AHK1* al día 0 y 21 DAI, en los explantes previamente tratados con MG-132 ocasionó un cambio en el balance de auxinas y citocininas durante la inducción de la ES y generó un cambio en los tiempos de inicio de formación de los centros meristemáticos y embriones globulares.

IPT1

La expresión de *IPT1* se ha reportado durante la inducción y desarrollo temprano de la ES (Avilez-Montalvo et al., 2022). La expresión del gen *IPT1* está relacionada a la producción endógena de citocininas en la célula. La concentración de citocininas afecta la concentración de auxinas en la célula (Su et al., 2011). Por ello, cualquier variación de la expresión del gen *IPT1* en la ES, repercutirá en el balance requerido de auxinas y citocininas y en consecuencia en la diferenciación de la célula. Por otro lado, se ha reportado que las citocininas juegan un papel esencial en el mantenimiento de centros meristemático y división celular (Bajguz & Piotrowska, 2009; Chapman & Estelle, 2009; Rupp et al., 1999). De acuerdo con lo anterior, sugerimos que el incremento de expresión presentado los días 0, 3, 21 y 49 DAI en los explantes previamente

tratados con MG-132, pudo modificar el tiempo de la formación de centros meristemáticos y formación de embriones globulares en la inducción de la ES en *C. canephora*.

YUC1

La expresión de *YUC1* se ha reportado los primeros días de la inducción de la ES en *C. canephora* y en la rediferenciación celular de la ES en *C. arabica* (Awada et al., 2019, 2023; Uc-Chuc et al., 2020). La expresión del gen *YUC1* está estrechamente relacionada con la síntesis de auxinas en la célula (Cao et al., 2019). Por ello, se sugiere que una expresión alta del gen sugeriría una alta síntesis de auxinas (Cao et al., 2019). La síntesis de auxinas es crucial al inicio de la inducción de la ES (Uc-Chuc et al., 2020). De acuerdo con lo anterior, sugerimos que la inhibición de la expresión del gen *YUC1*, presentada los días 0 y 21 DAI de la inducción de la ES, en los explantes previamente tratados con MG-132, ocasionó un retraso en la formación de los centros meristemáticos y producción de embriones globulares somáticos.

Aún faltan experimentos por realizar para poder concluir y discutir de qué manera la inhibición del proteasoma 26S pudiera estar afectando la ES en café.

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN GENERAL

6.1. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar de que la embriogénesis somática (ES) se ha estudiado ampliamente, el proceso aún no está claro. Se han realizado estudios para optimizar la inducción de la ES y han implicado análisis a nivel transcriptómico, proteómico, metabolómico e histológico. En este trabajo analizamos la ES de *C. canephora* a nivel morfológico y molecular mediante herramientas bioinformáticas, histológicas y proteómicas. Además, visualizamos el impacto del proteasoma 26S en la ES de *C. canephora* mediante el uso de inhibidor del proteasoma 26S. A nivel genómico identificamos los genes que codifican a subunidades que comprende el proteasoma 26S en *C. canephora*. Por otro lado, después de inhibir el proteasoma 26S en el pretratamiento del protocolo de la ES, se llevó a cabo la ES y se encontró que el proteasoma 26S participa en el proceso de diferenciación celular, en la formación de embriones globulares, en desarrollo del procambium y la raíz durante la germinación del embrión. Y durante el pretratamiento de la ES de *C. canephora*, encontramos que la subunidad del proteasoma 26S RPN12 se acumula al alza de forma dependiente de las auxinas y las citocinina (Figura 3.2). En *A. thaliana*, la mutante *rpn12* muestra fenotipos asociados a hiposensibilidad a auxinas y citocininas, estabilización de proteínas ubiquitinadas y agrandamiento y proliferación celular (Kurepa et al. 2009; Smalle et al. 2002). Estos resultados sugieren que el proteasoma 26S juega un papel en las etapas previas a la diferenciación celular durante la inducción de la ES, posiblemente modificando la sensibilidad a las auxinas y las citocininas en las plantas. Se ha reportado que la auxinas exógenas inducen la síntesis de auxinas endógena en los explantes de *C. canephora* (Ayil-Gutiérrez et al., 2013).

Los explantes previamente tratados con el inhibidor MG-132, en la inducción de la ES generaron un menor número de embriones globulares, pero tuvieron una mayor tasa de conversión de globular a cotiledonar. Sugiriendo que el proteasoma 26S interviene en la formación de embriones globulares y en la regulación de la acumulación de proteínas relacionadas a la diferenciación y desarrollo de los embriones como por ejemplo, proteínas relacionadas al transporte y síntesis de las auxinas. Por otro lado, estos explantes muestran la expresión de los genes *WOX4*, *LEC1* reprimida durante la inducción de la embriogénesis somática. Se ha reportado que los genes *WOX4* y *LEC1* están relacionados con el mantenimiento de las células meristemáticas y la rediferenciación celular (Endrizzi et al., 1996; Ohmori et al., 2013; Su et al., 2009). De igual forma, los explantes presentaron al alza la expresión del gen *ITP1* y a la baja la expresión del gen *YUC1*,

sugiriendo que hubo un cambio a nivel molecular que pudo afectar las concentraciones de auxinas y citocininas, y por ende el desarrollo de los centros meristemáticos. Se ha reportado que las auxinas regulan la división celular mediante su interacción con las ciclinas (CDKA) bloqueadoras KRP en plantas (Perrot-Rechenmann, 2010).

En la etapa de desarrollo del embrión encontramos que los genes *WOX4* y *YUC1* están regulados al alza en los explantes previamente tratados con el inhibidor MG132. *WOX4* interviene en la formación y desarrollo del procambium. Trabajos recientes sugieren una estrecha relación entre la acumulación de las auxinas, su transporte y el factor de transcripción *WOX4* para el desarrollo del procambium, los haces vasculares y la raíz (Suer et al., 2011). De acuerdo con lo anterior nosotros sugerimos que esta sobreexpresión de los genes *WOX4* y *YUC11* influyeron en la temprana formación del procambium y elongación de la raíz. Muy posiblemente a nivel de proteico se acumularon las proteínas YUC1 y PIN1 relacionadas a la síntesis y el transporte de las auxinas, respectivamente.

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

7.1 CONCLUSIONES GENERALES

1. Mediante proteómica se demostró que el proteasoma 26S participa en la primera etapa del protocolo de la ES, ya que se encontró la subunidad del proteasoma 26S RPN12. De acuerdo con lo anterior, sugerimos que la ubiquitinación podría ser una nueva vía en la regulación de la competencia embriogénica en *C. canephora*.
2. Proponemos que el proteasoma 26S participa en el desarrollo de embriones globulares, al regular la formación de centros meristemáticos, y en la conversión de los estadios del embrión, mediante la regulación de proteínas que intervienen en la bifurcación del procambio y el desarrollo de la raíz. Esto es debido a que la intervención temporal de la función del proteasoma 26S durante el pretratamiento impactó negativamente la inducción de la ES de *C. canephora* retrasando la formación de los centros meristemáticos y reduciendo de la frecuencia de embriones globulares pero, mejoró la eficiencia de la conversión de los embriones globulares a cotiledonares, la bifurcación temprana del procambio y afectó de manera positiva el desarrollo de la raíz de los embriones somáticos.
3. Sugerimos que el proteasoma 26S participa en la regulación molecular de la ES mediante sus efectos en la expresión de los genes asociados a la biosíntesis de las auxinas y citocininas en la inducción de la ES de *C. canephora*. Debido a que la intervención temporal de su función en el pretratamiento impactó positivamente en la expresión de genes asociados a la biosíntesis de las auxinas y citocininas en la inducción de la ES de *C. canephora*.

7.2 PERSPECTIVAS

- Mediante estudios proteómicos utilizando espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS) conocer las proteínas poliubiquitinadas que se acumulan durante la inhibición temporal del proteosoma 26S en el pretratamiento de la ES de *C. canephora*, con el fin de identificar las proteínas reguladas por la vía UPS y comprender mejor el papel del proteosoma 26S en la ES.

- Estudiar a nivel de metaboloma, empleando espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC-MS) la concentración de auxinas y citoquininas; para enriquecer la comprensión de la función del proteasoma 26S en la regulación de PGR en la ES.
- Emplear herramientas de ingeniería genética, como CRISPR-Cas9, para mutar genes que codifican a proteínas subunidades del proteasoma 26S en explantes de hojas, los cuales se emplearán posteriormente para inducir la ES. Esto permitirá dilucidar el papel del proteasoma 26S en la ES.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J. (2004). The Proteasome in Cell-Cycle Regulation. *Proteasome Inhibitors in Cancer Therapy*, 1, 77–84.
- Aguilar-Hernández, V., Loyola-Vargas, V. M. (2018). Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1–17.
- Almeida, A. M., Parreira, J. R., Santos, R., Duque, A. S., Francisco, R., Tomé, D. F. A., Ricardo, C. P., Coelho, A. V., Fevereiro, P. (2012). A proteomics study of the induction of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* using 2DE and MALDI-TOF/TOF. *Physiologia Plantarum*, 146, 236–249.
- Armenta-Medina, A., Gillmor, C. S., Gao, P., Mora-Macias, J., Kochian, L. v, Xiang, D., Datla, R. (2020). Developmental and genomic architecture of plant embryogenesis: from model plant to crops. *Plant Communications*, 2, 100136–100147.
- Avilez-Montalvo, J. R., Quintana-Escobar, A. O., Méndez-Hernández, H. A., Aguilar-Hernández, V., Brito-Argáez, L., Galaz-Ávalos, R. M., Uc-Chuc, M. A., Loyola-Vargas, V. M. (2022). Auxin-Cytokinin cross talk in somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. *Plants*, 11, 1–21.
- Awada, R., Campa, C., Gibault, E., Déchamp, E., Georget, F., Lepelley, M., Abdallah, C., Erban, A., Martinez-Seidel, F., Kopka, J., Legendre, L., Lérant, S., Conéjéro, G., Verdeil, J. L., Cruzillat, D., Breton, D., Bertrand, B., Etienne, H. (2019). Unravelling the metabolic and hormonal machinery during key steps of somatic embryogenesis: A case study in coffee. *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1–29.
- Awada, R., Lepelley, M., Breton, D., Charpagne, A., Campa, C., Berry, V., Georget, F., Breitler, J.-C., Lérant, S., Djerrab, D., Martinez-Seidel, F., Descombes, P., Cruzillat, D., Bertrand, B., Etienne, H. (2023). Global transcriptome profiling reveals differential regulatory, metabolic and hormonal networks during somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *BMC Genomics*, 24, 1–19.
- Ayil-Gutiérrez, B., Galaz-Ávalos, R., Peña-Cabrera, E., Loyola-Vargas, V. (2013). Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8, e26998–e26998.
- Bajguz, A., Piotrowska, A. (2009). Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, 70, 957–969.
- Ban, Z., Estelle, M. (2021). CUL3 E3 ligases in plant development and environmental response. *Nature Plants*, 7, 6–16.
- Baudin Sylvie, Hansen Susanne, Brettschneider Reinhold, Hecht ValeÂrieF.G., Dresselhaus Thomas, LoÈrz Horst, Dumas Christian, Rogowsky PeterM. (2000). Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the SERK gene family. *Planta*, 13, 1–10.
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C. M., Van Lammeren, A. A. M., Miki, B. L. A., Custers, J. B. M., Van Lookeren Campagne, M. M. (2002). Ectopic

- expression of *BABY BOOM* triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell*, 14, 1737–1749.
- Brand, A., Quimbaya, M., Tohme, J., Chavarriaga-Aguirre, P. (2019). Arabidopsis *LEC1* and *LEC2* orthologous genes are key regulators of somatic embryogenesis in *Cassava*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–14.
 - Brukhin, V., Gheyselinck, J., Gagliardini, V., Genschik, P., Grossniklaus, U. (2005). The RPN1 subunit of the 26S proteasome in Arabidopsis is essential for embryogenesis. *Plant Cell*, 17, 2723–2737.
 - Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., Cheng, J. (2019). The roles of auxin biosynthesis YUCCA gene family in plants. In *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 1–19.
 - Chapman, E. J., Estelle, M. (2009). Cytokinin and auxin intersection in root meristems. *Genome Biology*, 10, 210.
 - Chen, B., Maas, L., Figueiredo, D., Zhong, Y., Reis, R., Li, M., Horstman, A., Riksen, T., Weemen, M., Liu, H., Siemons, C., Chen, S., Angenent, G. C., Boutilier, K. (2022). *BABY BOOM* regulates early embryo and endosperm development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119, 1–12.
 - Chen, D., Frezza, M., Schmitt, S., Kanwar, J., Dou, Q. P. (2011). Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Current Cancer Drug Targets*, 11, 239–253.
 - Chomczynski, P. (1993). A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, 532–536.
 - Ciehanover, A., Hod, Y., Hershko, A. (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 81, 1100–1105.
 - Clague, M. J., Urbé, S. (2010). Ubiquitin: same molecule, different degradation pathways. *Cell*, 143, 682–685.
 - Coux, O., Tanaka, K., Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annual Review of Biochemistry*, 65, 801–847.
 - da Silva, G. M., da Cruz, A. C. F., Otoni, W. C., Pereira, T. N. S., Rocha, D. I., da Silva, M. L. (2015). Histochemical evaluation of induction of somatic embryogenesis in *Passiflora edulis* Sims (*Passifloraceae*). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 51, 539–545.
 - Das, S., Weijers, D., Borst, J. W. (2021). Auxin response by the numbers. In *Trends in Plant Science*, 26, 442–451.
 - del Pozo, J. C., Manzano, C. (2014). Auxin and the ubiquitin pathway. Two players—one target: the cell cycle in action. *Journal of Experimental Botany*, 65, 2617–2632.
 - Deng, W., Luo, K., Li, Z., Yang, Y. (2009). A novel method for induction of plant regeneration via somatic embryogenesis. *Plant Science*, 177, 43–48.

- dos Santos, A. L. W., Elbl, P., Navarro, B. V., de Oliveira, L. F., Salvato, F., Balbuena, T. S., Floh, E. I. S. (2016). Quantitative proteomic analysis of *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze cell lines with contrasting embryogenic potential. *Journal of Proteomics*, 130, 180–189.
- Duve, C. D. E., Gianetto, R., Appelmans, F., Wattiaux, R. (1953). Enzymic content of the mitochondria fraction. *Nature*, 172, 1143–1144.
- Elhiti, M., Stasolla, C. (2022). Transduction of signals during somatic embryogenesis. In *Plants*, 11, 1–16.
- Elhiti, M., Stasolla, C., Wang, A. (2013). Molecular regulation of plant somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49, 631–642.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, a, Levin, J. Z., Laux, T. (1996). The *SHOOT MERISTEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZWILLE*. In *The Plant journal: for cell and molecular biology*, 10, 967–979.
- Etlinger, J. D., Goldberg, A. L. (1977). A soluble ATP-dependent proteolytic system responsible for the degradation of abnormal proteins in reticulocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74, 54–58.
- Fehér, A. (2015). Somatic embryogenesis - stress-induced remodeling of plant cell fate. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849, 385–402.
- Fehér, A. (2019). Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? In *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–11.
- Fehér, A., Pasternak, T. P., Dudits, D. (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74, 201–228.
- Ferrari, I. F., Marques, G. A., Junior, W. L. S., Biazotti, B. B., Pena Passos, M., de Almeida, J. A. S., Mondego, J. M. C., Mayer, J. L. S. (2021). Comparative ontogenesis of *Coffea arabica* L. somatic embryos reveals the efficiency of regeneration modulated by the explant source and the embryogenesis pathway. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 57, 796–810.
- Figueroa, P., Gusmaroli, G., Serino, G., Habashi, J., Ma, L., Shen, Y., Feng, S., Bostick, M., Callis, J., Hellmann, H., Xing, W. D. (2005). Arabidopsis has two redundant cullin3 proteins that are essential for embryo development and that interact with *RBX1* and *BTB* proteins to form multisubunit E3 ubiquitin ligase complexes in vivo. *Plant Cell*, 17, 1180–1195.
- Fricker, L. D. (2020). Proteasome Inhibitor Drugs. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 6; 457–476.
- Gaj, M. D., Zhang, S., Harada, J. J., Lemaux, P. G. (2005). Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta*, 222, 977–988.
- Gallois, J. L., Guyon-Debast, A., Lecureuil, A., Vezon, D., Carpentier, V., Bonhomme, S., Guerche, P. (2009). The arabidopsis proteasome *RPT5* subunits are essential for gametophyte development and show accession-dependent redundancy. *Plant Cell*, 21, 442–459.

- Gemperline, D. C., Marshall, R. S., Lee, K. H., Zhao, Q., Hu, W., McLoughlin, F., Scalf, M., Smith, L. M., Vierstra, R. D. (2019). Proteomic analysis of affinity-purified 26S proteasomes identifies a suite of assembly chaperones in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 294, 17570–17592.
- Gladman, N. P., Marshall, R. S., Lee, K. H., Vierstra, R. D. (2016). The proteasome stress regulon is controlled by a pair of NAC transcription factors in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 28, 1279–1296.
- Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A. S., Archer, C. R., Huber, R., Powell, T. K., Lindow, S., Kaiser, M., Dudler, R. (2008). A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. *Nature*, 452, 755–758.
- Grzyb, M., Mikula, A. (2019). Explant type and stress treatment determine the uni- and multicellular origin of somatic embryos in the tree fern *Cyathea delgadii* Sternb. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 136, 221–230.
- Gulzar, B., Mujib, A., Malik, M. Q., Sayeed, R., Mamgain, J., and Ejaz, B. (2020). Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 18, 1–15.
- Haecker, A., Groß-Hardt, R., Geiges, B., Sarkar, A., Breuninger, H., Herrmann, M., Laux, T. (2004). Expression dynamics of *WOX* genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131, 657–668.
- Hanania, U., Velcheva, M., Sahar, N., Flaishman, M., Or, E., Dgani, O., Perl, A. (2009). Suppression and overexpression of ubiquitin extension protein S27a affects cell proliferation and in vitro regeneration in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Science*, 176, 566–574.
- Heringer, A. S., Reis, R. S., Passamani, L. Z., de Souza-Filho, G. A., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2017). Comparative proteomics analysis of the effect of combined red and blue lights on sugarcane somatic embryogenesis. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39, 1– 14.
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J. M., Angenent, G. C., Boutilier, K. (2017). The *BABY BOOM* Transcription Factor Activates the *LEC1-ABI3-FUS3-LEC2* network to induce somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 175, 848–857.
- Igamberdiev A. U. y Kleczkowski L. A. (2018). The glycerate and phosphorylated pathways of serine synthesis in plants: the branches of plant glycolysis linking carbon and nitrogen metabolism. In *Frontiers in Plant Science*, 9, 1-12.
- Ji, J., Strable, J., Shimizu, R., Koenig, D., Sinha, N., Scanlon, M. J. (2010). *WOX4* promotes procambial development. *Plant Physiology*, 152, 1346–1356.
- Joshi, S., Paul, P., Hartman, J. M., Perry, S. E. (2022). *AGL15* promotion of somatic embryogenesis: role and molecular mechanism. In *Frontiers in Plant Science*, 13, 1–17.
- Khan, M. L., Stewart, A. K. (2011). Carfilzomib: a novel second-generation proteasome inhibitor. *Future Oncology*, 7, 607–612.
- Khanday, I., Santos-Medellin, C., Sundaresan, V. (2020). Rice embryogenic trigger *BABY BOOM1* promotes somatic embryogenesis by upregulation of auxin biosynthesis genes. *BioRxiv*, 1, 1–18.

- Kroll, C. K., Brenner, W. G. (2020). Cytokinin signaling downstream of the His-Asp Phosphorelay network: cytokinin-regulated genes and their functions. In *Frontiers in Plant Science*, 11, 1–18.
- Kumaravel, M., Uma, S., Backiyarani, S., Saraswathi, M. S., Vaganan, M. M., Muthusamy, M., Sajith, K. P. (2017). Differential proteome analysis during early somatic embryogenesis in *Musa spp.* AAA cv. Grand Naine. *Plant Cell Reports*, 36, 163–178.
- Kurepa, J., Li, Y., and Smalle, J. A. (2013). Proteasome-dependent proteolysis has a critical role in fine-tuning the feedback inhibition of cytokinin signaling. *Plant Signaling and Behavior*, 8, e23474-1–e23474-3.
- Kurepa, J., Smalle, J. A. (2008). Structure, function and regulation of plant proteasomes. *Biochimie*, 90, 324–335.
- Ledwoń, A., Gaj, M. D. (2011). *LEAFY COTYLEDON1*, *FUSCA3* expression and auxin treatment in relation to somatic embryogenesis induction in Arabidopsis. *Plant Growth Regulation*, 65, 157–167.
- Lee, D. H., Goldberg, A. L. (1998). Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists. *Trends in Cell Biology*, 8, 397–403.
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., Zhang, J. Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1–7.
- Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25, 402–408.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M. A. L., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J. (1998). Arabidopsis *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative Cells. *Cell*, 93, 1195–1205.
- Loyola-Vargas, V. M., Ochoa-Alejo, N. (2016). Somatic embryogenesis: Fundamental aspects and applications. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*, 1–506.
- Lyngved, R., Renaut, J., Hausman, J. F., Iversen, T. H., Hvoslef-Eide, A. K. (2008). Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 353–369.
- Márquez-López R., Quintana-Escobar A.O., Víctor M Loyola-Vargas, R. E. (2019). Cytokinins, the cinderella of plant growth regulators. *Phytochemistry Reviews*, 18, 1387–1408.
- Marshall, R. S., Vierstra, R. D. (2019). Dynamic regulation of the 26S proteasome: From synthesis to degradation. In *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6, 1–31.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C., Loyola-Vargas, V. M. (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. In *Frontiers in Plant Science*, 10, 1–15.
- Mendoza, F., Berry, C., Prestigiacomo, L., Van Hoewyk, D. (2020). Proteasome inhibition rapidly exacerbates photoinhibition and impedes recovery during high light stress in *Chlamydomonas reinhardtii*. *BMC Plant Biology*, 20, 1–10.

- Meng, L., Mohan, R., Kwok, B. H., Elofsson, M., Sin, N., Crews, C. M. (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10403–10408.
- Mikula, A., Tomaszewicz, W., Dziurka, M., Kaźmierczak, A., Grzyb, M., Sobczak, M., Zdańkowski, P., Rybczyński, J. (2021). The origin of the *Cyathea delgadii* sternb. Somatic embryos is determined by the developmental state of donor tissue and mutual balance of selected metabolites. *Cells*, 10, 1–23.
- Montiel, G., Gaudet, M., Laurans, F., Rozenberg, P., Simon, M., Gantet, P., Jay-Allemand, C., Breton, C. (2020). Overexpression of MADS-box Gene *AGAMOUS-LIKE 12* Activates Root Development in *Juglans* sp. and *Arabidopsis thaliana*. *PLANTS*, 9, 1–19.
- Moon, J., Parry, G., Estelle, M. (2004). The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. In *Plant Cell*, 16, 3181–3195.
- Negi, S., Santisree, P., Kharshiing, E. V., Sharma, R. (2010). Inhibition of the ubiquitin-proteasome pathway alters cellular levels of nitric oxide in tomato seedlings. *Molecular Plant*, 3, 854–869.
- Nelson, C. J., Li, L., Millar, A. H. (2014). Quantitative analysis of protein turnover in plants. In *Proteomics*, 14, 579–592.
- Ng, W. (2020). *Protein degradation is one of two switches that control gene expression*.
- Nic-Can, G. I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V. M., Rojas-Herrera, R., and De-la-Peña, C. (2013). New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*.
- Ohmori, Y., Tanaka, W., Kojima, M., Sakakibara, H., Hirano, H. Y. (2013). *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* is involved in meristem maintenance and is negatively regulated by the *CLE* gene *FCP1* in Rice. *The Plant Cell*, 25, 229–241.
- Ōmura, S., Crump, A. (2019). Lactacystin: first-in-class proteasome inhibitor still excelling and an exemplar for future antibiotic research. *The Journal of Antibiotics*, 72, 189–201.
- Palma, J. M., Sandalio, L. M., Javier Corpas, F., Romero-Puertas, M. C., McCarthy, I., del Río, L. A. (2002). Plant proteases, protein degradation, and oxidative stress: role of peroxisomes. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40, 521–530.
- Pereksta, D., King, D., Saki, F., Maroli, A., Leonard, E., Suseela, V., May, S., Castellanos Uribe, M., Tharayil, N., Van Hoewyk, D. (2020). Proteasome inhibition in *Brassica napus* roots increases amino acid synthesis to offset reduced proteolysis. *Plant and Cell Physiology*, 61, 1028–1040.
- Quintana-Escobar, A. O., Nic-Can, G. I., Galaz Avalos, R. M., Loyola-Vargas, V. M., Gongora-Castillo, E. (2019). Transcriptome analysis of the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora* and the participation of *ARF* and *Aux/IAA* genes. *PeerJ*, 2019, 1–23.
- Quiroz-Figueroa, F. R., Monforte-González, M., Galaz-Avalos, R. M., Loyola-Vargas, V. M. (2006). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Methods in Molecular Biology*, 318, 111–117.

- Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Avalos, R. M., Loyola-Vargas, V. M. (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285–301.
- Radoeva, T., Weijers, D. (2014). A roadmap to embryo identity in plants. *Trends in Plant Science*, 19, 709–716.
- Ramalho, J. C., DaMatta, F. M., Rodrigues, A. P., Scotti-Campos, P., Pais, I., Batista-Santos, P., Partelli, F. L., Ribeiro, A., Lidon, F. C., Leitão, A. E. (2014). Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26, 5–18.
- Reis, R. S., Vale, E. de M., Heringer, A. S., Santa-Catarina, C., Silveira, V. (2016). Putrescine induces somatic embryo development and proteomic changes in embryogenic callus of sugarcane. *Journal of Proteomics*, 130, 170–179.
- Rocha, D. I., Vieira, L. M., Tanaka, F. A. O., da Silva, L. C., Otoni, W. C. (2012). Somatic embryogenesis of a wild passion fruit species *Passiflora cincinnata* Masters: Histocytological and histochemical evidences. *Protoplasma*, 249, 747–758.
- Rupp, H. M., Frank, M., Werner, T., Strnad, M., Schmülling, T. (1999). Increased steady state mRNA levels of the *STM* and *KNAT1* homeobox genes in cytokinin overproducing *Arabidopsis thaliana* indicate a role for cytokinins in the shoot apical meristem. *Plant Journal*, 18, 557–563.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4, 406–425.
- Sassa, H., Oguchi, S., Inoue, T., Hirano, H. (2000). Primary structural features of the 20S proteasome subunits of rice (*Oryza sativa*). *Gene*, 250, 61–66.
- Sharifi, G., Ebrahimzadeh, H., Ghareyazie, B., Gharechahi, J., Vatankhah, E. (2012). Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). *Proteome Science*, 10, 1–15.
- Sheng, X., Hu, Z., Lü, H., Wang, X., Baluška, F., Šamaj, J., Lin, J. (2006). Roles of the ubiquitin/proteasome pathway in pollen tube growth with emphasis on MG132-induced alterations in ultrastructure, cytoskeleton, and cell wall components. *Plant Physiology*, 141, 1578–1590.
- Shibahara, T., Kawasaki, H., Hirano, H. (2002). Identification of the 19S regulatory particle subunits from the rice 26S proteasome. *European Journal of Biochemistry*, 269, 1474–1483.
- Smalle, J., Kurepa, J., Yang, P., Babiychuk, E., Kushnir, S., Durski, A., Vierstra, R. D. (2002). Cytokinin growth responses in *Arabidopsis* involve the 26S proteasome subunit RPN12. *Plant Cell*, 14, 17–32.
- Speranza, A., Scoccianti, V., Crinelli, R., Calzoni, G. L., Magnani, M. (2001). Inhibition of proteasome activity strongly affects kiwifruit pollen germination. Involvement of the Ubiquitin/Proteasome pathway as a major regulator. *Plant Physiology*, 126, 1150–1161.

- Steiner, N., Santa-Catarina, C., Guerra, M. P., Cutri, L., Dornelas, M. C., Floh, E. I. S. (2012). A gymnosperm homolog of *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE-1 (SERK1)* is expressed during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 109, 41–50.
- Stone, S. L., Kwong, L. W., Yee, K. M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., Harada, J. J. (2001). *LEAFY COTYLEDON 2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98, 11806–11811.
- Su, Ying H, Zhao, X. Y., Liu, Y. B., Zhang, C. L., O'Neill, S. D., Zhang, X. S. (2009). Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59, 448–460.
- Su, Ying Hua, Liu, Y. B., Zhang, X. S. (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4, 616–625.
- Sun, L., Wu, Y., Zou, H., Su, S., Li, S., Shan, X., Xi, J., Yuan, Y. (2013). Comparative proteomic analysis of the H99 inbred maize (*Zea mays* L.) line in embryogenic and non-embryogenic callus during somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113, 103–119.
- Tanaka, K. (2009). The proteasome: overview of structure and functions. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and Biological Sciences*, 85, 12–36.
- Terzi, M., Loschiavo, F. (1990). Somatic embryogenesis. *Developments in Crop Science*, 19, 54–66.
- Timm S., Florian A., Arrivault S., Stitt M., Fernie A., R. y Bauwe H. (2012). Glycine decarboxylase controls photosynthesis and plant growth, *FEBS letters*, 586, 3692-3697.
- Uc-Chuc, M. A., Pérez-Hernández, C., Galaz-ávalos, R. M., Brito-Argaez, L., Aguilar-Hernández, V., Loyola-Vargas, V. M. (2020). YUCCA-mediated biosynthesis of the auxin IAA is required during the somatic embryogenic induction process in *Coffea canephora*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–23.
- Valencia-Lozano, E., Ibarra, J. E., Herrera-Ubaldo, H., De Folter, S., and Cabrera-Ponce, J. L. (2021). Osmotic stress-induced somatic embryo maturation of coffee *Coffea arabica* L., shoot and root apical meristems development and robustness. *Scientific Reports*, 11, 9661.
- Vierstra, R. D. (1993). Protein degradation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 44, 385–410.
- Vierstra, R. D. (2009). The ubiquitin–26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10, 385–397.
- Wilk, S., Orlowski, M. (1980). Cation-Sensitive Neutral Endopeptidase: isolation and specificity of the bovine pituitary enzyme. In *Journal of Neurochemistry*, 35, 1172-1182.
- Willims, E., Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Annals of Botany*, 57, 443–462.
- Winkelmann, T. (2016). Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds., *Methods in Molecular Biology*, 1359, 25–46.

- Wójcik, A. M., Wójcikowska, B., Gaj, M. D. (2020). Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. In *International Journal of Molecular Sciences*, 21, 1–19.
- Wójcikowska, B., Gaj, M. D. (2017a). Expression profiling of *AUXIN RESPONSE FACTOR* genes during somatic embryogenesis induction in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 36, 843–858.
- Yasuda, T., Fujii, Y., and Yamaguchi, T. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, 26, 595–597.
- Zhang, J., Ma, H., Chen, S., Ji, M., Perl, A., Kovacs, L., Chen, S. (2009). Stress response proteins' differential expression in embryogenic and non-embryogenic callus of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon-A proteomic approach. *Plant Science*, 177, 103–113.
- Zhao, F. Y., Hu, F., Zhang, S. Y., Wang, K., Zhang, C. R., Liu, T. (2013). MAPKs regulate root growth by influencing auxin signaling and cell cycle-related gene expression in cadmium-stressed rice. *Environmental Science and Pollution Research*, 20, 5449–5460.
- Zheng, Q., Zheng, Y., Ji, H., Burnie, W., Perry, S. E. (2016). Gene regulation by the *AGL15* transcription factor reveals hormone interactions in somatic embryogenesis. *Plant Physiology*, 172, 2374–2387.