

POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA EN PLANTAS

**Caracterización de la actividad de WUSCHEL en
*Coffea canephora***

**Tesis que para obtener el grado de
Doctora en Ciencias presenta:**

M. C. Ana Ly Arroyo Herrera

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.

Mérida, Yucatán, México

2008



RECONOCIMIENTO

Este trabajo se desarrollo en la unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C, bajo la dirección del Dr. Enrique Castaño de la Serna, a quien agradezco su infinita paciencia y apoyo.

Se agradece el apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (número de registro 165085) para la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Consuelo García, Dr. Víctor Suárez, Felipe Sánchez, Dr. Manuel Martínez, por su tiempo invertido y sugerencias para el mejoramiento de la tesis.

Al Dr. Luis Carlos Rodríguez Zapata por su apoyo y múltiples sugerencias para el mejoramiento de este trabajo de tesis.

Al Dr. Cesar de los Santos por permitirme utilizar equipo de su laboratorio.

A la I.Q. Angela Ku por su valioso apoyo técnico en la parte experimental de la tesis.

A la Dra. Diana Guillén por su amistad incondicional y en compartir conmigo alegrías y tristezas.

A la Dra. Nina Valadéz, por todos sus consejos y amistad.

A mis compañeros de laboratorio Juan Colli, Julia Cano, Rocío Canché, por todo su apoyo y amistad.

Y a todas aquellas personas que de uno u otra manera hicieron posible la realización de esta tesis. A todos mil gracias.

DEDICATORIA

A Dios por darme la vida y permitirme finalizar otra etapa más en mi vida

A mi Madre por todo tu amor, paciencia y su infinito apoyo durante toda mi vida y en especial durante la realización de este trabajo

A mi Padre por todo tu apoyo, amor y por haberte reencontrado

A Miranda y Jeshua

**A toda mi familia que siempre la llevo en el corazón,
y son lo más importante en mi vida, les dedico este
documento con todo mi amor.**

CONTENIDO

Reconocimiento		i
Agradecimientos		ii
Dedicatoria		iii
Lista de figuras		iv
Lista de cuadros		vi
Resumen		xi
Abstract		xiii
Introducción		xv
CAPÍTULO 1	Antecedentes	1
1.1	La transcripción en eucariotes	1
1.1.2	Regulación transcripcional de la expresión del gen	2
1.2	Proteínas de homeodominio	3
1.3	La embriogénesis en plantas	5
1.3.1	La embriogénesis cigótica	5
1.3.2	La embriogénesis somática	6
1.4	El meristemo apical y su arquitectura	7
1.5	El gen WUSCHEL	10
1.5.1	La región promotora de WUSCHEL	14
1.5.2	La regulación del gen WUSCHEL	15
1.5.3	Regulación de WUSCHEL en el meristemo apical	16
1.5.4	Regulación de WUSCHEL en el meristemo floral	22
1.6	Objetivos	27
1.7	Diseño experimental	29
1.8	Referencias	30
CAPÍTULO 2	Clonación, expresión y purificación de WUSCHEL	35
2.1	Introducción	35
2.2	Materiales y métodos	36
2.2.1	Amplificación por PCR de WUSCHEL	36
2.2.2	Clonación de WUSCHEL en el vector TOPO	36
2.2.3	Subclonación de WUSCHEL en el vector de expresión pET11d (pET11d::6His ::WUS)	37
2.2.4	Expresión y purificación de WUS	37
2.3	Resultados y discusión	38
2.3.1	Clonación de WUSCHEL	38
2.3.2	Subclonación de WUSCHEL	42
2.3.3	Expresión y purificación de WUSCHEL	46

		pag
2.4	Conclusiones	49
2.5	Referencias	50
CAPÍTULO 3	Expression of WUSCHEL in <i>Coffea canephora</i> cause ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis	51
3.1	Abstract	52
3.2	Introduction	53
3.3	Materials and Methods	55
3.3.1	Plan growth and culture conditions	55
3.3.2	Evaluation of somatic embryo production	56
3.3.3	Plasmid binary constructs	56
3.3.4	Coffee plantlets and embryos transformation	57
3.3.5	Histological analysis	57
3.3.6	Genomic DNA extraction and PCR	58
3.3.7	Southern-blot analysis	58
3.3.8	RNA extraction	59
3.3.9	RT-PCR	59
3.4	Results	60
3.4.1	Whole coffee plantlets transformed with WUS show unorganized calli formation	60
3.4.2	Roots from transformed plants grown 17- β -estradiol supplemented media develop meristem like structures	68
3.4.3	Embryogenic cultures obtained from transformed plants show an high increase in somatic embryo formation in the presence of 17- β -estradiol	70
3.5	Discussion	72
3.6	References	75
Capitulo 4	Discusión general	79
Capitulo 5	Perpectivas	85
ANEXO		87

LISTA DE FIGURAS

	pag
1.1 Complejo de pre-iniciación de la transcripción	2
1.2 Esquema representativo de los motivos estructurales de proteínas de homeodominio típicas y atípicas.	5
1.3 Fases embriogénesis cigótica	6
1.4 Fases de la embriogénesis somática	7
1.5 Estructura del meristemo apical	9
1.6 Secuencia de la proteína de WUSCHEL	12
1.7 Patrones de expresión de WUS durante las etapas de la embriogénesis y en el meristemo apical	13
1.8 Arquitectura regulatoria del promotor de WUS	15
1.9 Modelo de mantenimiento de los meristemos apicales	18
1.10 Ruta de transducción de señales del complejo CLV a nivel celular	20
1.11 Terminación del MF vía retroalimentación temporal WUSCHEL-AGAMOUS	23
1.12 Modelo de interacción y regulación de WUSCHEL en el merisemo	25
2.1 Amplificación por PCR de WUSCHEL	40
2.2 Doble digestión de la clona que contiene a WUSCHEL ligado al vector pCR2.1TOPO.	42
2.3 Purificado de WUSCHEL y el vector pET11d.	43

	pag
2.4 Doble digestión del vector pET11d-6His-Wus con las enzimas <i>Nde</i> I y <i>Hind</i> III	45
2.5 Amplificación por PCR de WUSCHEL ligado al vector de expresión pET11d.	46
2.6 Inducción de la expresión de WUSCHEL en células <i>E. coli</i> BL21	48
3.1 Transient transformation of <i>Coffea canephora</i> plantlets	62
3.2 Selection transformed somatic embryos of <i>Coffea canephora</i> with pER10W-35SRed	63
3.3 Histological analysis of 40 day old embryos maintained in Yasuda medium in the presence of 5 μ M 17- β -estradiol	65
3.4 Overexpression of WUS induces secondary embryogenesis in somatic embryos of <i>Coffea canephora</i>	67
3.5 Histological analysis of roots of <i>coffea canephora</i> plants after 40 days exposure to 5 μ M 17- β -estradiol	69
3.6 Somatic embryogenesis induction in cultures from pERW-35SRED transformed leaves.	71

LISTA DE CUADROS

1.2	Alineamiento de secuencia de WUSCHEL de café <i>Arabidopsis</i>	pag 41
-----	--	-----------

ABREVIATURAS

2,4-D	2,4-diclorofenoxiacético
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CLV3	CLAVATA 3
CTAB	Cetil trimetil bromuro de amonio
EDTA	Etilen diamino tetraacético
FTs	Factores transcripcionales
GFP	Proteína verde fluorescente
IPTG	Isopropiltio- β -D-galactosidasa
MA	Meristemo apical
MS	Medio Murasige-Skoog
MR	Meristemo radicular
NaCl	Cloruro de sodio
NAA	Ácido Naftaleno Acético
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena reversa de la polimerasa
STM	SHOOT MERISTEMLES
WUS	WUSCHEL
ZC	Zona Central
ZP	Zona Periférica
ZR	Zona Medular

RESUMEN

El factor de transcripción WUSHEL (WUS) es requerido específicamente para el mantenimiento de la identidad de las células madre en los meristemas apicales y florales, manteniendo así su estructura e integridad funcional. WUS pertenece a la familia de proteínas de homeodominio la cual contiene un dominio típico y su tamaño es de 60 aminoácidos. La expresión de WUS ha sido observada en etapas tempranas de la embriogénesis.

En el presente trabajo se determinó la caracterización de la actividad de WUSCHEL en *Coffea canephora*, así como la caracterización de la sobre expresión de WUS. Para determinar su actividad WUS fue aislado, clonado, expresado y purificando. Se obtuvo un fragmento de 893 pb, el cual fue clonado en un vector de expresión de proteínas recombinantes. Se obtuvo una proteína de entre 28 y 29 kDa la cual fue purificada por afinidad, la cual corresponde a la masa molecular esperada para WUS.

En la sobre-expresión de WUS en *Coffea canephora*, se utilizó un sistema inducible. Las manifestaciones de la sobre-expresión de WUS en plantas de café produjo la formación de callo y en la inducción de embriones somáticos, causó un incremento de éstos en un producción de 400%. Este es el primer reporte de un sistema de inducción de embriogénesis que utiliza a WUS el cual podría ser usado como herramienta para la inducción de embriogénesis en otras especies.

ABSTRACT

The transcription factor WUSHEL (WUS) is required specifically for the maintenance of the stem cell identity in the apical shoot meristem and floral meristem. Maintaining the structure and functional integrity. WUS belongs to the family of homeodominio proteins that it contains a typical domain of 60 amino acids. The expression of WUS begins in the early stages of the embriogénesis.

Presently it was the characterized of the activity of WUSCHEL in *Coffea canephora*, as well as the characterization of expression of WUS. To determine the activity WUS it was isolated, cloned, expressed and purified. The fragment of 893 pb was obtained, which was cloned in an expression vector. A protein was obtained between 28 and 29 kDa which was purified for affinity corresponding to the expected molecular weight of WUS.

The expression of WUS in *Coffea canephora*, was carried out in an inducible system. The effect of the over expression of WUS in coffee produced callus formation and in an induction of somatic embryos with an increment of 400%. This the first report of a system of embryogenesis induction using WUS which can be used as tool for the embryogenesis induction in other species.

INTRODUCCIÓN

En contraste con los animales, el cuerpo adulto una planta se forma posterior al inicio de la embriogénesis por la continua actividad de los meristemos apicales y radicales.

Dentro de los meristemos se encuentran el grupo de células madre, las cuales son capaces de regenerarse a sí mismas y a la vez producir células para que se diferencien y formen los distintos órganos de las plantas durante su ciclo de vida.

Para la planta es fundamental mantener la identidad de las células madre en el meristemo apical y uno de los genes esenciales para el mantenimiento de esta función, es el factor de transcripción WUSHEL (WUS). Específicamente requerido para el mantenimiento de la identidad de las células madre en los meristemos apicales y florales, permitiendo así el mantenimiento de su estructura e integridad funcional. WUS pertenece a la familia de proteínas de homeodominio que contiene un dominio típico de 180 pb que le confiere unión al ADN. La expresión de WUS empieza en las etapas tempranas de la embriogénesis, permaneciendo así en los meristemos apicales indeterminadamente y en los meristemos florales hasta la etapa 6 de la floración.

Otra característica importante que tiene WUS es cuando se sobre expresa en *Arabidopsis*, resultando la formación de células madre ectópicas o incluso embriones somáticos de tejidos vegetales en alta frecuencia (Zou et al., 2001), sin la presencia de fitohormonas exógenas, por lo que podría tener un significativo impacto en la biotecnología vegetal. Es por esto que el presente trabajo pretende determinar la actividad de WUS en *Coffea canephora*.

Capítulo 1

ANTECEDENTES

1.1 La Transcripción en eucariotes

La transcripción es el proceso por cual se transmite la información contenida en el ácido desoxirribonucleico (ADN) al ácido ribonucleico (ARN), el cual esta conformado por una hebra de cadena sencilla de nucleótidos, con una secuencia idéntica a una de las hebras de ADN. La transcripción inicia cuando la ARN polimerasa se une a una región denominada promotor, localizada al inicio del gen. El promotor rodea el primer par de bases que se transcribe a ARN, llamado sitio de iniciación. Desde este sitio la ARN polimerasa se mueve sobre la hebra molde sintetizando ARN, hasta que alcanza una secuencia designada de terminación. Todo este proceso define la unidad de transcripción y constituye el primer punto de control en la expresión de un gen (Lewin, 2001).

Los promotores contienen combinaciones de secuencias de ADN, que incluyen un elemento central o basal, un elemento proximal al promotor y también elementos distales como enhancers o potenciadores. El elemento central TATA se localiza a 25 pb antes del sitio de inicio de la transcripción, en el sitio de inicio de la transcripción se encuentra un elemento iniciador rico en piridimina. El promotor central constituye el principal blanco para que la ARN polimerasa II se una al ADN y se inicie la transcripción, ensamblándose

posteriormente los factores generales de la transcripción (FTs) IIA, IIB, IID, IIE, IIF, y IIH dándose así la formación del complejo de pre-iniciación (fig. 1.1) (Nikolov and Burley, 1997; Buchanan *et al.*, 2000).

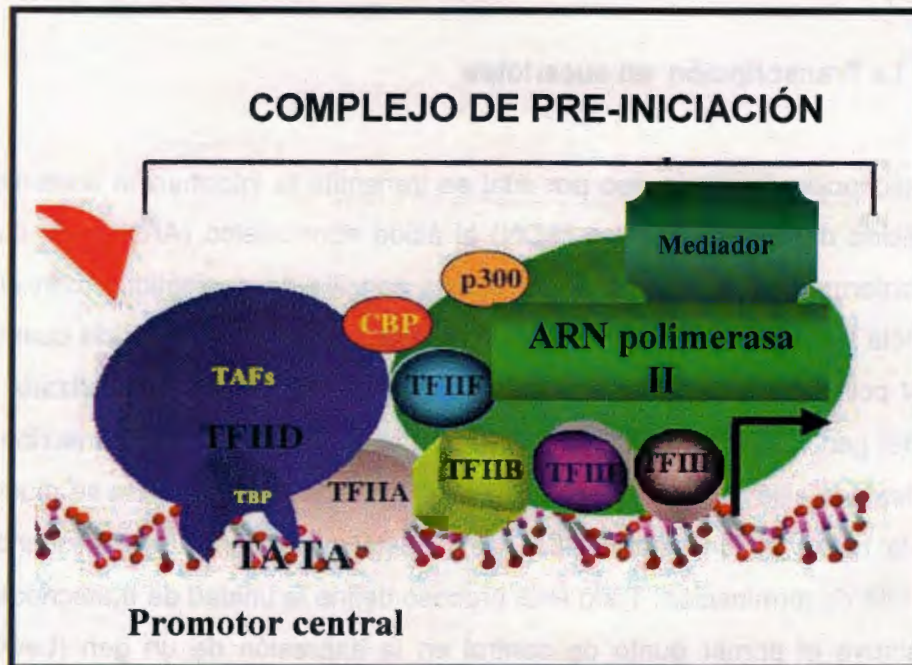


Figura 1.1. Complejo de pre-iniciación de la transcripción (Dikstein R., 2004).

1.1.2 Regulación transcripcional de RNA pol II

La transcripción es un paso clave para el control de la expresión de un gen. La transcripción de los genes eucariotes es un remarcable proceso bioquímico que es regulado a muchos niveles. Análisis bioquímicos y genéticos en varios organismos han revelado la identificación de numerosos factores proteínicos responsables del control transcripcional (Lemon and Tijan, 2000).

Mucha de la información que especifica el programa transcripcional de un gen está codificada en su secuencia de ADN. En la hebra de ADN, existen secuencias que son reguladas en *cis*: como enhancers, regiones proximales al promotor, elemento central del promotor. Por otra parte los factores transcripcionales que actúan en *trans* son los efectores de los programas transcripcionales de genes como los activadores y represores (Kadonaga, 2002). Dentro de los activadores existen proteínas de homeodominio que son reguladores clave de la transcripción.

1.2 Proteínas de Homeodominio

Las proteínas de homeodominio son reguladores que determinan la diferenciación celular y el destino celular en animales y plantas. Las proteínas de homeodominio están involucradas en el control transcripcional de muchos genes importantes del desarrollo. En plantas uno de los eventos importantes en los que se involucran estas proteínas es en el establecimiento de los meristemas apicales.

Las proteínas de homeodominio poseen un motivo estructural de unión al ADN llamado homeodominio u homeobox de aproximadamente 180 pb. La estructura de las proteínas de homeodominio consiste de 60 aminoácidos altamente conservados que codifican para tres hélices conectadas por una vuelta y un plegamiento Beta (Banerjee-Basu et al., 2000).

Análisis comparativos de las estructuras de proteínas de homeodominio en plantas y otros organismos revelan que las proteínas de homeodominio se

categorizan en dos clases: proteínas de homeodominio típicas, estas poseen la estructura original encontrada en *Drosophila*. Y las proteínas de homeodominio atípicas que se caracterizan por tener residuos extras de aminoácidos en la vuelta y el plegamiento entre hélices (Kamiya et al., 2003) (fig.1.2).

En varias especies de plantas, se han aislado en varias proteínas de homeodominio como son las que constituyen la familia de genes denominada KNOX. Las proteínas KNOX son proteínas de homeodominio atípicas de 63 aminoácidos. Estos genes son considerados de control maestro porque ellos regulan el desarrollo y especifican el destino de órganos y tejidos en la embriogénesis, el factor de transcripción WUS se determino como una proteína que pertenece a la familia de proteínas de homeodominio.

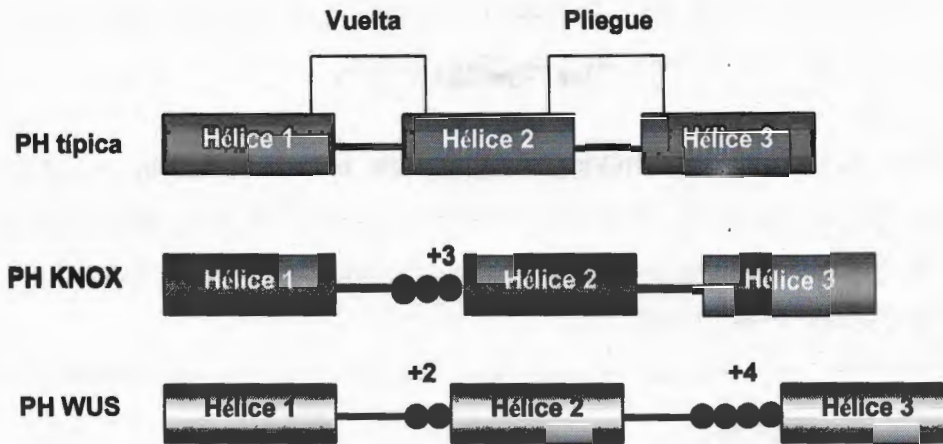


Figura 1.2 Esquema representativo de los motivos estructurales de proteínas de homeodominio típicas y atípicas. PH= proteína de homeodominio.

1.3 Embriogénesis en plantas

1.3.1 Embriogénesis cigótica

La embriogénesis es el punto donde comienza el ciclo de vida tanto en animales, como en plantas. Como en otros organismos eucariotes, la embriogénesis en las plantas se inicia con el cigoto, que es el producto de la fusión de la célula huevo haploide y la célula espermática. En dicotiledóneas, los embriones pasan a través de secuencias estereotípicas de estados característico como: globular, acorazado, torpedo. En las primeras etapas se da la formación del estado globular en el cual el embrión es esférico y está unido al tejido materno por el suspensor. En la formación de los cotiledones la forma esférica cambia a una forma acorazonada. Y finalmente, con la expansión longitudinal de los cotiledones permite al embrión pasar a una fase de torpedo y finalmente a la fase cotiledonar (fig. 1.3). Durante la embriogénesis se establece el meristemo apical (MA) y el meristemo radicular

(MR). A partir del MA se va a formar el cuerpo de la planta posterior a la embriogénesis (Jürgens et al., 1994; Jürgens, 1995).

En plantas el proceso de embriogénesis puede ser recapitulado en otras células diferentes al cigoto, como los embriones somáticos originados de las células somáticas desarrolladas *in Vitro*, valiéndose de la totipotencialidad celular (Mordhorst et al., 1997).



Figura 1.3 Fases de la embriogénesis cigótica (Zimmerman, 2003).

1.3.2 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso a través del cual se desarrollan o diferencian embriones a partir de células somáticas (Zimmerman, 1993). Los embriones somáticos pasan a través de la misma secuencia de estados de la embriogénesis en comparación con su contraparte que es la embriogénesis cigótica (fig. 1.4). Existen muchas similitudes en morfología, citología en la embriogénesis cigótica y somática (Zimmerman, 1993; Mordhorst et al., 1997). Durante el desarrollo de la embriogénesis se requiere de diversas fitohormonas para que el proceso se lleve a cabo adecuadamente. Una de las fitohormonas utilizadas es el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), es un elemento químico sintético que es usado como un análogo de auxinas. La

embriogénesis somática esta mediada por una cascada de señales disparadas por el 2,4-D (Zimmerman, 1993).

La embriogénesis somática provee un modelo importante para el estudio de embriogénesis cigótica y eventos regulatorios que se desarrollan durante esta etapa de la planta. También puede ser una alternativa más eficiente para la propagación masiva de plantas. Las ventajas que tiene este proceso son: el control de condiciones de cultivo, la facilidad de observación del proceso, la disponibilidad del tejido y los altos rendimientos de la producción de embriones, dependiendo la especie de planta con la que se trabaje. Todas estas características antes mencionadas hacen de la embriogénesis somática sea un sistema ideal para realizar estudios a niveles bioquímicos y moleculares (Quiroz, 2002).

Otro de los principales intereses en la embriogénesis somática es la identificación de genes que intervienen en este proceso y en el establecimiento del meristemo de la planta que son partes fundamentales para el crecimiento y desarrollo de esta.

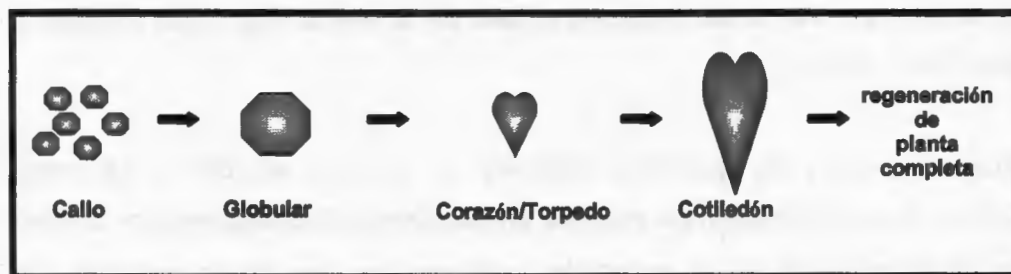


Figura1.4 Fases de la embriogénesis somática (Zimmerman, 2003).

1.4 El meristemo apical y su arquitectura

Los meristemos de las plantas son centros de división celular e iniciación de órganos. Las estructuras aéreas de la planta son generadas por los meristemos apicales (Furner y Pumfrey, 1992). Los meristemos apicales son establecidos durante la embriogénesis, después de la iniciación de los cotiledones (Barton y Poethig, 1993), posterior al crecimiento de los meristemos apicales, se producen las hojas, meristemos axiales y meristemos florales, dando lugar al cuerpo de la planta (Clark et al., 1997).

Análisis histológicos en varias especies de angiospermas sugieren que meristemo apical se divide conceptualmente en varias zonas: zona central, zona periférica y la zona rib. La zona central (ZC) esta localizada en la parte central del meristemo y esta caracterizada por su baja tasa de división celular, además es la zona donde se mantiene la integridad meristemática y el mantenimiento de las células madre (Laux et al., 1996). La zona periférica (ZP) rodea a la ZC, su tasa de división celular es más rápida y los órganos laterales se derivan de ésta zona. La zona rib o zona medular (ZR) produce las células que van a dar volumen al tallo de la planta (Fig 1.5B) (Flecher y Meyerowitz, 2000).

Estudios previos de quimeras estables en plantas anuales y perennes sugieren que los meristemos apicales de las plantas dicotiledóneas se dividen perpendicularmente en la superficie, originándose tres capas celulares. La capa L1 se divide anticlinalmente para formar la epidermis, la capa L2 produce el tejido sub-epidérmico, se divide periclinalmente en el meristemo y

anticlinalmente en las hojas primordiales para dar lugar a la capa de la palizada, la capa del mesófilo esponjoso en el centro de las hojas y todos los mesófilos del margen de la hoja. Finalmente la capa L3 que si divide en todos los planos la cual va a formar parte de la médula del tallo y tejidos interiores de los órganos. Además el desarrollo y diferenciación de estas tres capas coordina el mantenimiento y forma del meristemo, dándose el intercambio de señales celulares (Fig. 1.5 A) (Funer y Pumfrey, 1992; Heacker y Laux, 2001).

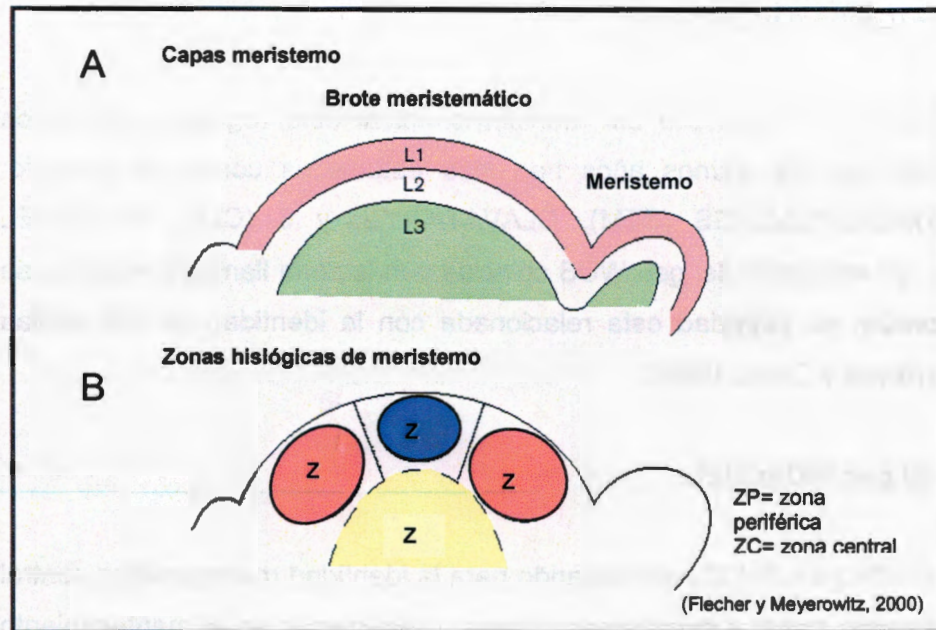


Figura 1.5 Estructura del meristemo apical. A. Diagrama del meristemo apical de *Arabidopsis* mostrando las distintas capas de la L1-L3. B. Diagrama del meristemo apical mostrando las zonas histológicas.

El desarrollo de los meristemos laterales es producido por el meristemo apical. Los meristemos florales y apicales son homólogos con respecto a las células madre, y sus conductas son reguladas por conjunto de genes que se traslapan, porque muchas mutaciones afectan a ambos de una manera similar. Sin embargo, los meristemos florales y el meristemo apical difieren fundamentalmente con respecto a la extensión temporal de su actividad: el meristemo apical es indeterminado por ej.: los meristemos apicales pueden producir órganos continuamente, los meristemos florales son determinados y su actividad es terminada cuando el total de órganos florales han sido iniciados (Lenhard et al., 2001).

El crecimiento y desarrollo del meristemo apical esta regulado por varios genes que en los últimos años han sido estudiados como por ejemplo: SHOOTMERISTEMLESS (STM), CLAVATA 1,2, y 3 (CLV), WUSCHEL (WUS). La expresión del gen WUS coincide con la zona llamada el centro de organización, su actividad esta relacionada con la identidad de las células madre (Kayes y Clark, 1998).

1.5 El gen WUSCHEL

El gen WUSCHEL (WUS) es requerido para la identidad meristemática central del meristemo apical y meristemos florales, interviniendo en el mantenimiento de su estructura e integridad funcional. La función de este gen fue determinada mediante mutantes con pérdida de función. Las plantas mutantes *wus* mostraron severos defectos en el desarrollo: el meristemo apical mostro defectos, con terminación prematura del meristemo apical y meristemos

florales, como consecuencia se produjeron pocos órganos, presentado un arreglo desorganizado de hojas y brotes. Así, debido a las características antes mencionadas a estos mutantes se le dio el nombre *wuschel* en alemán, que significa "suave y desordenado" (Laux *et al.*, 1996; Flecher y Meyerowitz, 2000; Carles y Flecher, 2003)

Mediante el aislamiento y clonación de WUS se determinó que su secuencia codifica para una proteína de 291 aminoácidos perteneciente a la familia de homeodominio u homobox (Fig. 1.6), esta secuencia revelo dos dominios funcionales: una región de homeodominio de 60 aminoácidos y una región de un dominio ácido, que esta conformado por una α -hélice anfipática similar a dominios de transactivación de reguladores transcripcionales (Ptashne, 1988; Meyer *et al.*, 1998,). La proteína de homeodominio de WUSCHEL es "atípica" y su estructura esta conformada por: una hélice-vuelta-hélice-pliegue-hélice con dos residuos de aminoácidos en la vuelta y cuatro residuos de aminoácidos en el giro (Kamiya *et al.*, 2003). Además mediante experimentos de localización celular, se determinó que la localización de WUS se da en el núcleo de la célula, siendo estos resultados consistentes con su rol como regulador transcripcional (Meyer *et al.*, 1998).

M E P P Q H Q H H H	H Q A D Q E S G N N	N N K S G S G G Y T	30
C R Q T S T R W T P	T T E Q I K I L K E	L Y Y N N A I R S P	60
T A D Q I Q K I T A	R L R Q F G K I E G	K N V F Y W F Q N H	90
K A R E R Q K K R F	N G T N M T P S S	S P N S V M H A A N	120
D H Y H P L L H H H	H G V P M Q R P A N	S V N V K L N Q D H	150
H L Y H H N K P Y P	S F N N G N L N H A	S S G T E C G V V N	180
A S N G Y M S S H V	Y G S M E Q D C S M	N Y N N V G G G W A	210
N M D H H Y S S A P	Y N F F D R A K P L	F G L E G H Q D E E	240
E C G G D A Y L E H	R R T L P L F P M H	G E D H I N G G S G	270
A I W K Y G Q S E V	R P C A S L E L R L	K	291

Figura 1.6 Secuencia de la proteína de WUSCHEL. La proteína fue deducida del marco de lectura del ADNc de WUS. La región que corresponde a la proteína de homeodominio está señalada con línea recta y la línea punteada determina el dominio ácido.

En el interés de la determinación de los patrones de expresión de WUS durante las etapas embriónicas, se realizaron experimentos de hibridación *in situ* durante la embriogénesis, precisando que el inicio de la expresión de WUS empieza durante la etapa de división de 16 células, conservándose durante las distintas etapas de la embriogénesis, finalmente la expresión se confina en el centro del meristemo apical (Fig 1.7B) (Meyer et al., 1998).

Con respecto a los dominios de expresión de WUS en el meristemo apical, se definió su expresión en un nuevo dominio funcional del meristemo apical, dándose su expresión en un pequeño grupo de células que se encuentran justo debajo de las células madre, con estos resultados propusieron un modelo en el cual WUS se expresa y actúan como un centro de organización

(OC) que especifica el destino de la capa de células vecinas como son las células madre, las cuales se encuentran por encima del centro de organización (Fig. 1.7A) (Meyer et al., 1998; Schoof et al., 2000).

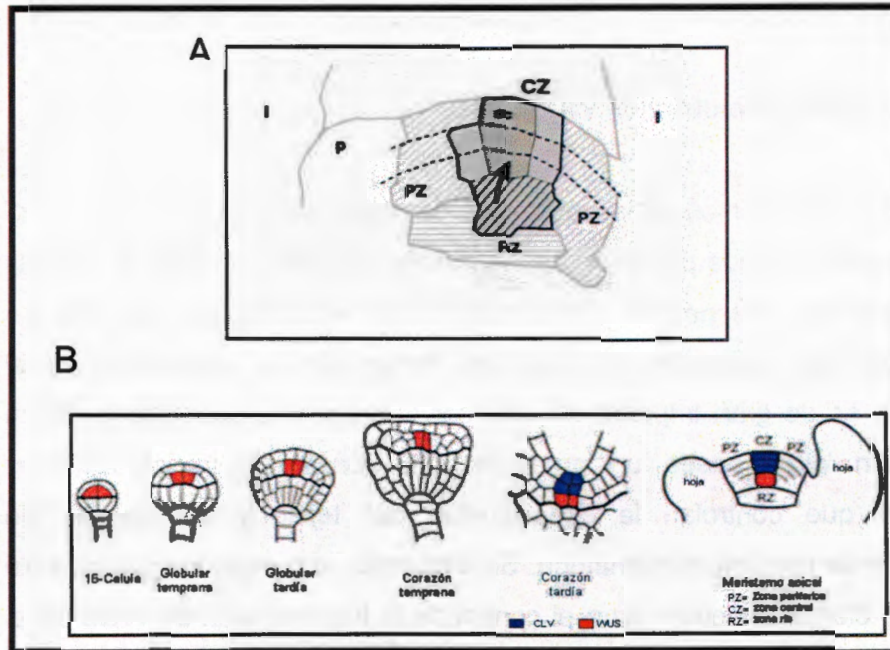


Figura 1.7 Patrones de expresión dinámica de WUS durante las etapas embriogénicas y en el meristemo apical. A. Modelo del rol de WUS en el meristemo apical. La expresión de WUS se da en un pequeño grupo de células en la parte inferior de la zona central (CZ, zona sombreada), por debajo de las células madre debajo de las capas L1, L2 y L3 (sc:centro de organización, zona gris oscura) y por arriba de la zona rib (RZ). La expresión de WUS es requerida para la especificación de las células madre (fecha). l:hoja; p:hoja primordial; PZ:zona periférica. B. Expresión de WUS durante las etapas embriogénicas. La expresión de WUS (rojo) se inicia en la etapa de 16 células, CLV inicia su expresión en la etapa tardía acorazonada (azul) (Laux et al., 2004).

Durante el desarrollo floral, WUS se expresa durante la la iniciación del meristemo floral y hasta las últimas etapas de la floración, pero es regulado cuando aparece el primordio del carpelo en el centro del meristemo, esto

ocurre después de la etapa 6 de la floración. Lo que sugiere que el centro de organización y las células madre son mantenidas hasta que exista un número suficiente de células para formar por completo los órganos florales, después la expresión de WUS es terminada y las células entran en diferenciación (Lenhard et al., 2001).

1.5.1 La región promotora de WUSCHEL

La regulación de dominios transcripcionales de genes regulatorios juega un rol importante para muchos procesos del desarrollo. De esta manera, el análisis del control transcripcional es crucial para tener una visualización de los mecanismos que gobiernan los patrones temporales y espaciales en el desarrollo y es de gran importancia conocer las regiones promotoras de un gen. El gen WUS posee un promotor que consta de varias regiones regulatorias que controlan la especificidad del tejido y los niveles de transcripción de manera combinatoria. Sin embargo, una región regulatoria de 57 pb es el elemento central para el control de la transcripción de WUS en el meristemo apical y floral. Dentro de esta región regulatoria existen dos secuencias motivo cortas denominadas RE1 de 10 pb y RE2 de 6 pb respectivamente, estos elementos son altamente conservados en la familia de Brassicaceae, soportando un rol central en la transcripción (fig. 1.8) (Bäule y Laux, 2005). Es importante mencionar, hasta el momento no se ha identificado un regulador directo de la transcripción de WUSCHEL.

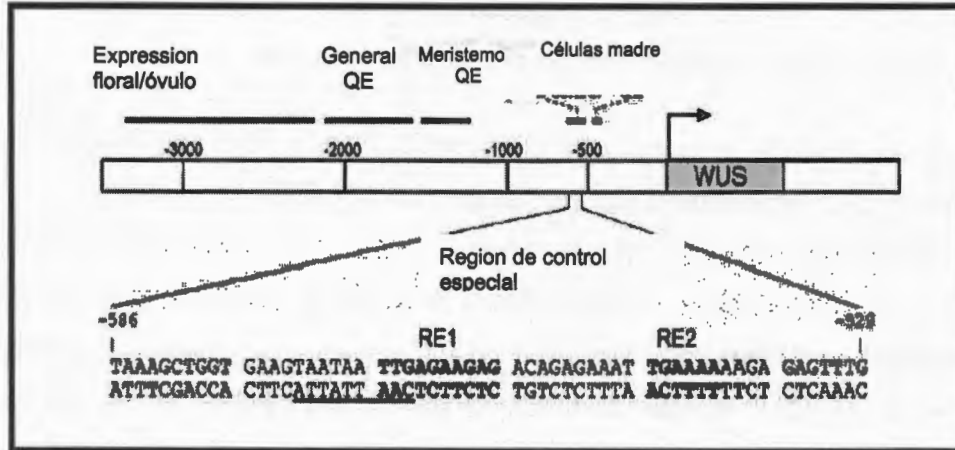


Figura 1.8. Arquitectura regulatoria del promotor de WUS. Abajo, la región espacial de 57 pb es esencial para la actividad del promotor en las células madre del meristemo de inflorescencia y el meristemo apical (RE1 y RE2), las secuencias resaltadas en negritas. Las regiones subrayadas son los sitios predecidos para sitios de unión de proteínas de homeodominio. QE, elemento cuantitativo requerido para aumentar los niveles de expresión.

1.5.2 Regulación del gen WUSCHEL

Como ya se había mencionado la función de WUS es mantener la identidad de las células madre de los meristemos apicales y florales, interviniendo en el mantenimiento de su estructura e integridad funcional (Laux et al., 1996). También análisis genéticos revelaron que WUS interactúa con varios reguladores del meristemo apical y meristemo floral, sugiriendo que WUS integra la información temporal y de posición de estos genes (Laux et al., 1996; Laux y Schoof, 1997; Mayer, et al., 1998).

1.5.3 Regulación de WUSCHEL en el meristemo apical

Algunos de los genes que se sabe que interactúan y regulan la actividad de WUS en el meristemo apical son los genes CLAVATA (CLV 1, CLV2, CLV3), promoviendo la progresión de las células madre del meristemo hacia la iniciación de los órganos y estos genes son requeridos para prevenir la acumulación de células indiferenciadas en los meristemas apicales y florales. Estudios en *Arabidopsis* con mutantes recesivos con pérdida de función de los tres *loci* de *clv*, demuestran la formación de un meristemo fasciado o alargado (Clark et al., 1993; Clark et al., 1995; Kayes y Clark, 1998).

El fenotipo de estos mutantes poseen defectos que afectaron específicamente el desarrollo de meristemas, ya que presentan un ensanchamiento progresivo, empezando durante la embriogénesis. Consecuentemente, se tornan más dramáticos con el tiempo: el alargamiento vegetativo del meristemo apical genera un tallo fasciado (alargado), el meristemo de la inflorescencia produce muchos meristemas extras y los meristemas florales producen muchos órganos florales extras. En los mutantes *clv1* en los meristemas florales frecuentemente forman muchos carpelos extras, dando una forma de club o agrupamiento que forma el gineceo (Clark et al., 1993; Clark et al., 1995; Kayes y Clark, 1998). Los mutantes *clavata* recibieron su nombre en base a ésta característica, porque *clavatus* proveniente del latín que significa: en forma de agrupación. El número celular se incrementa en el meristemo apical y en el meristemo floral en los mutantes *clavata* (Clark et al., 1993; Clark et al., 1995; Kayes y Clark, 1998). Estudios genéticos han demostrado que CLV1, CLV2 y CLV3 actúan en la misma ruta para limitar la expansión de la

población de células madre indiferenciadas en el meristemo apical y meristemo floral (Schoff et al., 2000; Kayes y Clark, 1998). Además, en intentos para esclarecer como se mantiene la estabilidad y la población de células madre en el meristemo, se determinaron las interacciones que existen entre los genes WUS y CLV. Mediante ensayos de dobles mutantes y combinando mutantes de *wus* con *clv1* y *clv3*.

La propuesta es que los genes CLV actúan por regulación negativa de WUS. Resultados muestran que WUS es expresado en un dominio alargado en mutantes *clv1*, indicando que los genes CLV actúan como un regulador negativo de WUS a nivel transcripcional. En experimentos de dobles mutantes combinados y plantas transgénicas indican que la expresión del gen WUS es suficiente para inducir la identidad de las células madre en el meristemo apical y la correcta expresión de CLV3 que es un marcador de las células madre. En base a estos resultados proponen un modelo el cual el tamaño de la población de las células madre es mantenida en el meristemo apical activo por una retroalimentación negativa (feed back loop negativo, en inglés) entre las células madre y el centro de organización mediada por las actividades de WUS y los genes CLV [Fig. 1.9; (Carles y Flecher, 2003)].

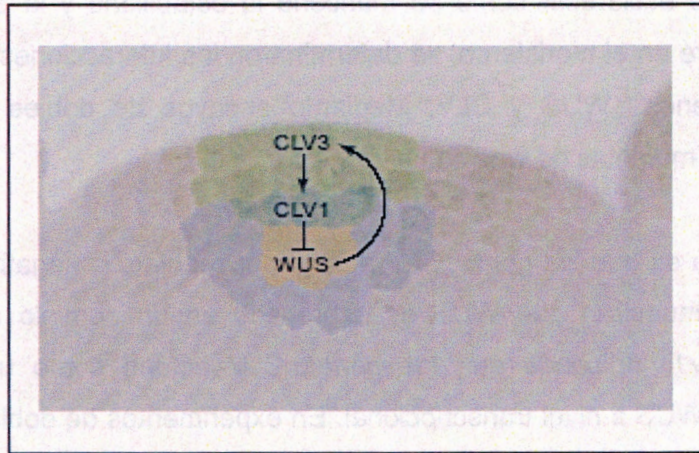


Figura 1.9 Modelo de mantenimiento de los meristemos apicales. La identidad de las células madre es especificada por señalización (rojo) del centro de organización (rojo) que requiere la actividad de WUS. Las células madre (azul) restringen el rango de expresión de WUS vía de señalización dada por CLV3 (verde) y CLV1 (azul oscuro). CZ, zona central; PZ, zona periférica; RP, zona rib.

La clonación de los genes CLV permitió identificarlos como componentes de una ruta de señalización extracelular. CLV1 y CLV2 codifican para un receptor de cinasa (receptor-like kinase RLK) y un receptor de protein-cinasa (receptor-like protein RLP) respectivamente (Clark et al., 1997; Jeong et al., 1999). CLV1 contiene una región extracelular que consiste de 21 repeticiones ricas en leucina (LRRs), una región transmembranal y un dominio intracelular de cinasa serina/treonina. CLV2 contiene 20 LRRs y un dominio transmembranal, pero a diferencia de CLV1, tiene una cola corta citoplasmática carente de cualquier dominio de señalización. CLV3 codifica para un ligando de 96 aminoácidos (Flecher et al., 1999). Junto con el análisis de las secuencias CLV, los dominios de expresión y fenotipos mutantes conducen a una propuesta que los factores CLV actúan en una ruta de señalización célula-

célula que se extiende entre las capas celulares en la zona central del meristemo apical (Fig. 1.9).

Los receptores LRRs de CLV1 y CLV2 pueden formar un heterodímero a través de la formación de enlaces disulfuro (SS) entre las pares de cisteínas conservadas que flanquean los dominios LRRs. La unión de CLV3 a CLV1 y CLV2 promueve el ensamblaje del complejo multimérico de 450 kDa. Dos componentes intermediarios downstream del complejo de señalización de CLV son asociados con una proteína fosfatasa asociada a cinasas (KAPP) (Stone et al., 1994) y una GTPasa Rho-like (Rop) (Li et al., 2001). Estas proteínas interactúan directamente con CLV1 en el complejo de señalización activo de 450 kDa (Trotochaud et al., 1999). La función KAPP *in vivo* como un regulador negativo de la ruta de CLV a través de la fosforilación directa de CLV1, previniendo los componentes “corriente abajo” del receptor de la señal de CLV1 (Stone et al., 1998). La GTPasa Rop es propuesta para traducir la señal del complejo receptor hacia el núcleo vía cinasas (Trotochaud et al., 1999). Sin embargo, no se sabe a ciencia cierta como la señal alcanza el núcleo del complejo de señalización.

Un nuevo componente celular identificado en la ruta de señalización de CLV es PORTERGEIST (POL). Mutantes en POL son supresores de fenotipos mutantes *clv* y evidencias genéticas colocan a POL como un regulador corriente abajo de la ruta de transducción de CLV (Yu et al., 2000). En mutantes *pol*, los mutantes *wus* son semidominantes y no son más epistáticos a los mutantes *clv1* (Yu et al., 2003), sugiriendo que POL puede funcionar corriente abajo de los genes CLV a través de dos rutas; una donde WUS es dependiente y otra donde WUS es independiente. Debido a que el efecto de

pol se puede observar solo cuando esta asociado con otros mutantes, por eso ha sido nombrado “el fantasma ruidoso”. POL codifica para una proteína fosfatasa tipo 2C de localización nuclear (PP2C) que se expresa ampliamente a través de la planta y se predice que actúa en múltiples rutas de señalización (Yu et al., 2003). Aún las funciones de POL en el meristemo apical no son claras como un inhibidor directo de la transducción de señalización CLV o si es un regulador positivo de WUS que reprimido por la ruta CLV (fig 1.10).

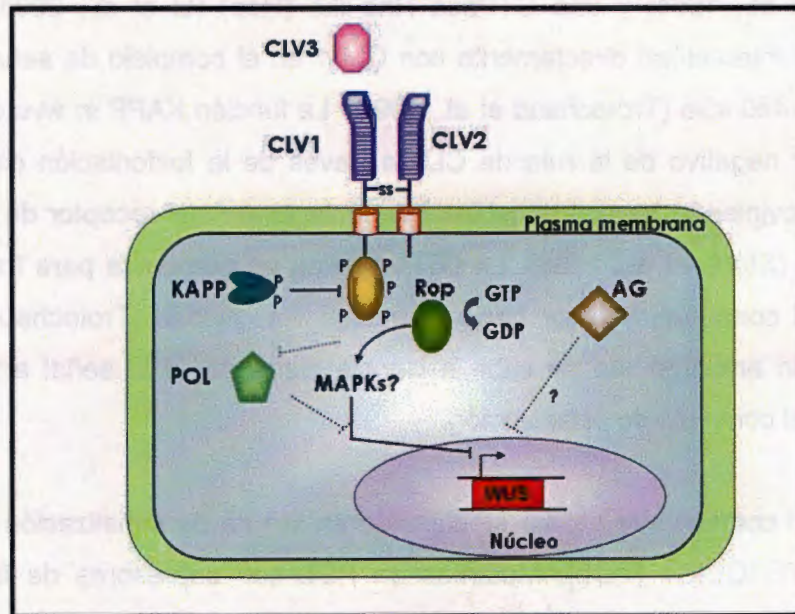


Figura 1.10 Ruta de transducción de señales del complejo CLV a nivel celular.

En la regulación del meristemo apical están involucradas varias rutas de señalización, una de estas rutas es la desencadenada por fitohormonas tales como las auxinas y citocininas, las cuales son importantes en la regulación del meristemo (Leyser, 2003). Existen evidencias de un mecanismo ligado entre el canal de señalización CLV/WUS y el control hormonal. Como se sabe WUS es un regulador positivo del grupo de células madre en los meristemos apicales y florales. También está involucrado directamente en la represión de varios genes REGULADORES-RESPUESTA EN ARABIDOPSIS (Los ARR5, ARR6, ARR7, ARR15), dichos genes actúan negativamente en la ruta de señalización de citocininas por retroalimentación negativa (Kiba et al., 2003; To et al., 2004). Los resultados reportados hasta el momento sugieren que los genes ARR pueden influenciar negativamente en el tamaño del meristemo y que la represión efectuada por WUS puede ser necesaria para que el meristemo funcione adecuadamente (fig. 1.10) (Leibfried et al., 2005)

Por otra parte, otro de los elementos que intervienen en la regulación de WUS son los complejos de remodelación de la cromatina ATPasa SNF2 ya que estos juegan un rol importante en asegurar apropiadamente el desarrollo en eucariotes controlando la accesibilidad de las regiones del ADN reguladas *in cis* por los factores de transcripción y la maquinaria transcripcional. Sin embargo, los blancos biológicos controlados por esta ATPasa son desconocidos. Usando análisis genéticos y moleculares se identificó a WUS como un blanco biológicamente importante de las ATPasas clase-SNF2 SPLAYED (SYD) en el meristemo apical de *Arabidopsis*. SYD es reclutado por el promotor de WUS que está involucrado en la regulación del mantenimiento de células madre en el meristemo apical vía directa del control transcripcional de estos reguladores maestros (fig. 1.10) (Kwom et al., 2005).

1.5.4 Regulación de WUSCHEL en meristemo floral

El meristemo floral (MF) constituye un caso particular en la actividad de las células madre que se apagan para completar la morfogénesis. El MF de manera secuencial produce pétalos, sépalos y estambres, el remanente de células madre meristemáticas que se encuentran en el centro del MF se diferencian y forman los carpelos.

Uno de los factores involucrados en el meristemo floral es el factor de transcripción AGAMOUS (AG) con dominio MADS, tiene la función de especificar la identidad de órganos florales, es también requerido para la terminación del MF (Yanofsky et al., 1990). Cuando se inicia el desarrollo de las flores, WUS activa la transcripción de AG, conduciendo a su propio terminación o fallo transcripcional: AG es mas tarde el interruptor de apagado de la actividad del centro de organización por represión de la expresión de WUS, el resultado es la diferenciación de las últimas células meristemáticas (Laux et al., 1996; Lenhard et al., 2001).

Para la activación de AG, WUS requiere la presencia de un tercer elemento (Lenhard et al., 2001), el factor de transcripción LEAFY (LFY) (fig. 1.11) que funciona para especificar la identidad del MF. De este manera, se ha propuesto un modelo donde WUS y LFY se unen por separado a una secuencia de enhancer adyacente en el segundo intrón de AG, dándose así su activación en el estadio 3 del desarrollo floral (Lohmann et al., 2001). La expresión de WUSCHEL por otra parte es inhibida por AG en el estadio 6 de la floración, justo cuando los carpelos se han formado, la expresión de WUS

termina y por consiguiente las células madre se desarrollan en flores, seguidas por la diferenciación del gineceo (Xu et al., 2005).

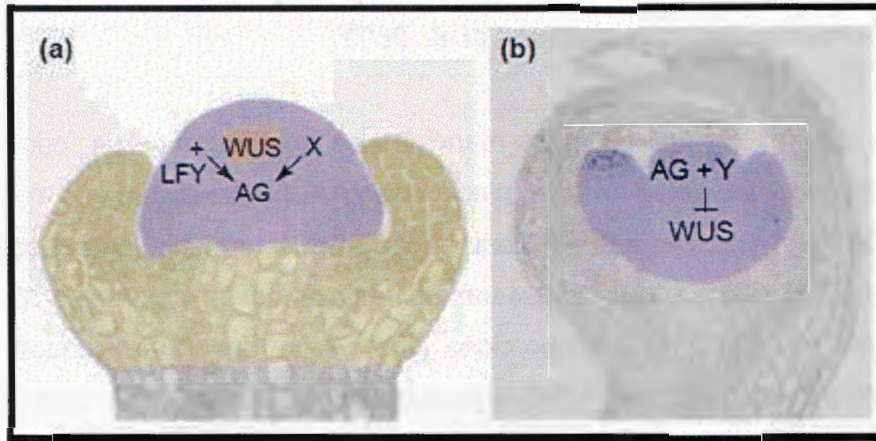


Figura 1.11 Terminación del MF vía retroalimentación temporal WUSCHEL-AGAMOUS. (a). En los primeros estadios de la floración, se inicia la expresión de AGAMOUS (AG) en el centro del MF y es mediada por WUSCHEL (WUS) y LEAFY (LFY). Porque el dominio de expresión de AG (azul) es más amplio que el dominio de expresión de WUS (anaranjado) y porque LFY se expresa a través del MF (dominios amarillo y azul), también se debe considerar la posibilidad que otro factor (X) u otros factores estén involucrados en la activación de AG. (b). Cuando se inicia el carpelo, AG y al menos otro factor (Y), reprimen la expresión de WUS para dar por terminado la actividad de las células madre. Entonces, las últimas células meristemáticas son consumidas en la formación del gineceo.

Otros de los factores involucrados en la regulación de WUS en el meristemo floral es el gen de la acetiltransferasa AtGCN5 el cual ha mostrado que puede ser requerido para propiciar actividad al MF y actuar como regulador de la ruta WUS-AG (Bertrand et al., 2003). Esto se determinó mediante plantas que contienen una inserción de T-DNA en el bromodominio del gen AtGCN5, el resultado de esta inserción es la transformación de los órganos florales, y la conversión del meristemo de inflorescencia en una flor terminal. Estos fenotipos correlacionan con la relación de la transcripción de WUS y AG en el

MF, la expansión de los dominios de expresión de WUS y AG dentro del MF, y la inducción ectópica de AG en el ápice de la inflorescencia. Estos datos revelan un importante rol de la modelación de la cromatina en la regulación en los niveles y dominios de expresión de componentes clave de la retroalimentación temporal (Bertrand et al., 2003).

En base a todos los antecedentes mencionados anteriormente de todos los elementos que intervienen en la regulación de WUS o interactúan con el en la regulación del meristemo apical y floral se ha propuesto el siguiente modelos de regulación (Fig. 1.12). En resumen, este modelo de regulación e interacción con WUS nos proporciona una visión general de todos los elementos que interactúa con WUS, comenzando por la interacción de WUS el factor de transcripción LFY que juntos van a activar la transcripción del factor de transcripción AG, este a su vez va actuar en la represión de WUS. El gen de la acetil transferasa GNC5, que interviene en la regulación de WU y AG. Otro de los elementos que participa en la regulación de WUS es el complejo de remodelación de la cromatina SYD que es reclutado por el promotor de WUS. Finalmente, WUS esta involucrado en represión de los genes ARR.

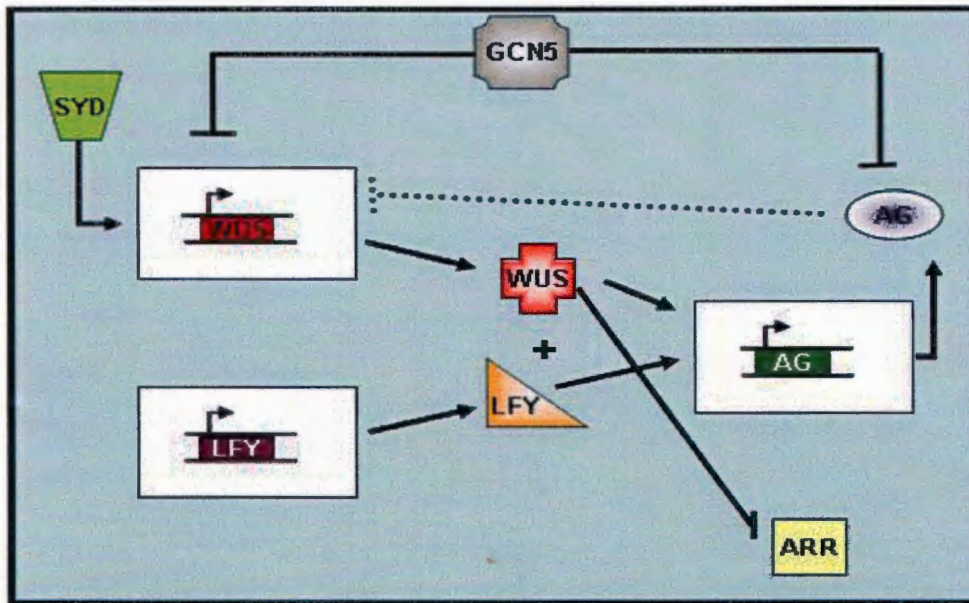


Figura 1.12. Modelo de interacción y regulación de WUSCHEL en el meristemo. WUSCHEL (WUS), LEAFY (LFY), AGAMOUS (AG), gen de acetil transferasa GCN5, ATPasas clase SPLAYED (SYD), genes de respuesta en *Arabidopsis* (ARR)



1.6 OBJETIVOS

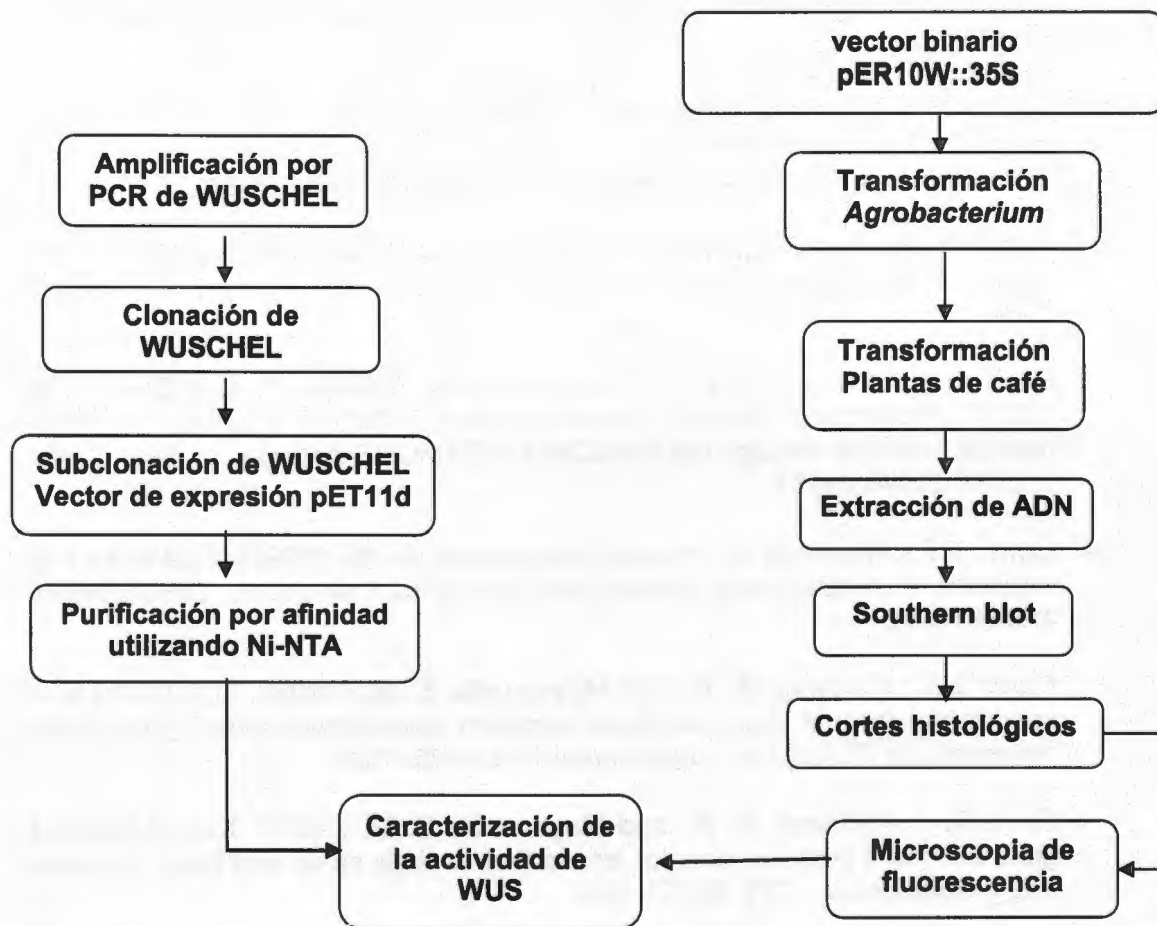
OBJETIVO GENERAL

Describir la actividad ectópica de WUSCHEL en *Coffea canephora*

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Realizar el aislamiento, expresión y purificación del factor de transcripción WUSCHEL en *Coffea canephora*
2. Transformación de *Coffea canephora* con el gen heterólogo WUSCHEL.
3. Caracterizar la sobre-expresión de WUSCHEL en *Coffea canephora*.

1.7 Diseño experimental



1.8 REFERENCIAS

Buchanan B. B., Gruissem W. and Jones R. L. (2000). Biochemistry & Molecular Biology of Plants , Capítulo 3 USA, American Society of Plant Physiologists.

Barton M. K. and Poethig R. S. (1993). Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development*, **119**:823-831.

Bäyle I. and Laux T. (2005). Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. *The Plant Cell*, **17**:2271-2280.

Bertrand, C. Bergouniox C., Domenichini S., Delaure M. and Zhou D. X. (2003). *Arabidopsis* histone acetyltransferase AtGCN5 regulates the floral meristem activity through the WUSCHEL/AGAMOUS pathway. *J. Biol. Chem.* **278(30)**:28246-28251.

Clark S.E., Running M. P. and Meyerowitz E. M. (1993). CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development In *Arabidopsis*. *Development*, **119**:397-418.

Clark S.E., Running M. P. and Meyerowitz E. M. (1995). CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same precesses as CLAVATA1. *Development*, **121**:2057-2067

Clark S. E. Williams R. W. and Meyerowitz E. M. (1997). The CLAVATA1 gene encode a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell*, **89**:575-585.

Furner I. J., and Pumfrey J. E. (1992). Cell fate in the shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **115**:755-764.

Fletcher J. C. Brand U., Running M. P., Simon R. Meyerowitz E. M. (1999). Signaling of cell fate decisions by CLAVATA3 in *Arabidopsis* shoot meristemos. *Science*, **283**:1911-1914.

Fletcher J. C. and Meyerowitz E. M. (2000). Cell signaling within the shoot meristem. *Curren Opinion in Plant Biology*, 3:23-30.

Heacker A. and Laux T. (2001). Cell-cell signaling in the shoot meristem. *Current Opinion in Plant Biology*, 4:441-446.

Heacker A., Bross-Hardt R., Geiges B., Sarkar An., Breuninger., Herrmann M. and Laux T. (2003). Expression dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131:657-668.

Jeong S., Trotochaud A. E., and Clark S. E. (1999). The *Arabidopsis* CLAVATA2 gene encode a receptor-like protein required for the stability of the CLAVATA1 receptor-like kinase. *The Plant Cell*, 11:1925-1933.

Jürgens G., Torres-Ruiz R. A., and Berleth T. (1994). Embryonic pattern formation in flowering plants. *Ann. Rev. Genet.* 28:353-371.

Jürgens G. (1995). Axis formation in plant embryogenesis: cues and clues. *Cell*, 81:467-470.

Kamiya N., Nagasaki H., Morikami A., Sato Y., and Matsuoka M. (2003). Isolation and characterization of a rice WUSCHEL-type homeobox gene that is specifically expressed in the central cells of a quiescent center in the root apical meristem. *The Plant Journal*, 35:429-441.

Kayes J. M. and Clark S. E. (1998). CLAVATA2, a regulator of meristem and organ development in *Arabidopsis*. *Development*, 125:3843-3851.

Kiba T., Yamada H., Sato S., Kato T., Tabata S., Yamashino T., and Mizino T. (2003). The type-A response regulator, ARR15, acts as a negative regulator in the cytokinin-mediated signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 44(8):868-874.

Kwon C. S., Chen C., and Wagner D. (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 19:992-1003.

Laux T., Mayer K. F., Bergen J., and Jürgens G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development.*, **122**:87-96.

Laux T., and Schoof H. (1997). Maintaining the shoot meristem-the role of CLAVATA1. *Trends Plant Science*, **2**:325-327.

Laux T., Würschum T. and Breuning H. (2004). Genetic regulation of embryonic pattern formation. *The Plant Cell*, suplemento 16:S190-S202.

Leibfried A., To J. P. C., Busch W., Stehling S., Kehle A., Demar M., Kieber J. J. and Lohmann J. U. (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature*, **438**:1172-1175.

Lemon B. and Tijan R. (2000). Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes & Development*, **14**:2551-2569.

Lenhard M., Bohnert A., Jürgens and Laux T. (2001). Termination of stem cell maintenance in *Arabidopsis* floral meristem by interactions between WUSCHEL and AGAMOUS. *Cell*, **105**:805-814.

Lewin, B. (2001). Genes VII, Capítulo 5. Madrid España, Marbán Libros.

Leyser, O. (2003). Regulation of shoot branching by auxin. *Trends Plant Sci.*, **8**:541-545.

Li H. (2001). The Rop GTPase switch control multiple development processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **126**:670-684.

Lohmann J. U., Hong R. L., Hobe M., Busch M. A. Parcy F., Simon R., and Weigel D. (2001). A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, **105**:793-803.

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

Mordhorst A. P., Toonen M. A., de Vries S. C. (1997). Plant embryogenesis. *Crit. Rev. Plant Sci*, **16**:535-576.

Ptashne, M. (1998). How eukaryotic transcriptional activators work. *Nature*, **35**:683-689.

Quiroz-Figueroa F. R., Fuentes-Cerda C. F. J., Rojas-Herrera R., and Loyola-Vargas V. M. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis system of *Coffea arabia*. *Plant Cell Rep.*, **20**:1141-1149.

Schoof H., Lenhard M., Haecker A., Mayer K. F., Jürgens G., and Laux T. (2000). The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the CLAVATA and WUSCHEL genes. *Cell*, **100**:635-644.

Stone J. M., (1994). Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase. *Science*, **266**:793-795.

Stone J. M., Trotochaud A. E., Walker J. C. and Clark S. E. (1998). Control of meristem development by CLAVATA1 receptor kinase and kinase-associated protein phosphatase interactions. *Plant Physiology*, **117**:1227-1225.

To J. P. C., Haberer G., Ferreira F. J., Deruère J., Mason M. G., Schaller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., and Kieber J. (2004). Type-A *Arabidopsis* response regulators are partially redundant negative regulators of cytokinin signaling. *The Plant Cell*, **16**:658-671.

Trotochaud A. E. Hao T., Wu G., Yang Z., and Clark S. E. (1999). The CLAVATA1 receptor-like kinase requires CLAVATA3 for its assembly into a signaling complex that includes KAPP and Rho-related protein. *Plant Cell*, **15**:1198-1211.

Xu Y. Y., Wang X. M., Li J., Li J. H., Wu J. S., Walker J. C., Xu Z. H. and Chong K., (2005). Activation of the WUS gene induce ectopic initiation of floral meristemes on mature stem surface in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology*, **57**:773-784.

Yanofsky M. F. (1990). The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene AGAMOUS resembles transcription factor. *Nature*, **346**:35-39.

Yu L. P. (2000). POLTERGEIST functions to regulate meristem development downstream of the CLAVATA loci. *Development*, **127**:1661-1670.

Yu L. P., Miller A. K. and Clark S. E. (2003). POLTERGEIST encodes a protein phosphatase 2C that regulates the CLAVATA pathways controlling stem identity at *Arabidopsis* shoot and floral meristems. *Curr. Biol.*, **13**:179-188.

Zimmerman J. L. (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *The plant Cell*, **5**:1411-1423.

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

CAPITULO 2

Clonación, expresión y purificación de WUSCHEL

2.1 Introducción

Un hecho que constituyó uno de los avances más espectaculares de los últimos tiempos en la ciencia fue el desarrollo de técnicas de biología molecular que nos permiten la manipulación de genes, mediante aislamiento, clonación, secuenciación y expresión de proteínas recombinantes. Estos son los primeros pasos para la caracterización del factor de transcripción WUSCHEL en café.

Una poderosa herramienta y de gran utilidad en la expresión de proteínas recombinantes es el vector inducible pET11d. Este sistema esta basado en el sistema del promotor T7 originalmente desarrollado por Studier y colaboradores en 1990. Este sistema utiliza el promotor de bacteriofago T7 para controlar la expresión del gen deseado y utiliza a *E. coli* como cepa hospedera.

Otras de las ventajas que posee este sistema de expresión de proteínas recombinantes es que posee unas etiquetas en su región que codifica para una región de seis histidinas, las cuales son etiquetas utilizadas para la purificación por afinidad.

Debido a que en todos los estudios que se han realizado en WUSCHEL, se ha tomado como modelo a *Arabidopsis thaliana*, es por ello nuestro interés en caracterizar a WUSCHEL en *Coffea canephora*.

2.2 MATERIALES Y METODOS

2.2.1 Amplificación por PCR de WUSCHEL

Se utilizaron los oligonucleotidos *wusNde I* 5'- ACATATGGAGCCGCCACAG -3' y *WusHind III* 5'- GGAAGCTTCTAGTTCAGACGTAGC-3', utilizado las siguientes condiciones de amplificación: 95°C x 30seg, 52°C x 5min, 72°C x 3min (1X)/ 95°C x 1 min, 52°C x 1 min, 72°C x 1min (30X)/ 72°C x 10 min/ 4.0 °C

2.2.2 Clonación de WUSCHEL en el vector TOPO

La clonación del fragmento amplificado de WUSCHEL se realizo con la ayuda del kit TA Cloning® (Invitrogen). En la clonación se utilizo el vector pCR® 2.1-TOPO®, incubando el vector y el fragmento de WUSCHEL durante 30 min a temperatura ambiente. Se utilizaron células competentes DH5α, transformándolas por choque térmico a 42°C por 90 segundos. Las células fueron plaqueadas en medio LB-agar (Anexo 1), utilizando como agente selectivo 100 mg/ml de ampicilina. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C durante toda la noche. La transformación de las clona seleccionadas fueron sometidas a una extracción del vector o "miniprep" por medio de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001).

2.2.3 Subclonación de WUSCHEL en el vector de expresión pET11 (pET11d::6His ::WUS)

Para la subclonación de WUSCHEL en el vector de expresión se realizó en primera instancia una doble digestión del vector de clonación pCR® 2.1-TOPO® (Invitrogen) que contiene el fragmento de WUSCHEL. Para la doble digestión se utilizaron las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*, igualmente el vector de expresión pET11d fue sometido al mismo proceso de restricción. Los vectores sometidos al proceso de digestión fueron resueltos en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. El fragmento correspondiente al que correspondía a WUSCHEL y el fragmento del vector de expresión fueron cortados y purificados. Ya purificado el vector y el fragmento, se ligaron utilizando T4 ADN ligasa (Invitrogen) la reacción de ligación se incubó a 4°C durante toda la noche, después de este proceso se generó el vector denominado pET11d-6His-WUS. Posterior a la ligación se realizó la transformación de células *E. coli* DH5α.

2.2.4 Expresión y purificación de WUS

Para la expresión de la proteína recombinante se utilizó la cepa de *E. coli* BL21. La cepa fue inoculada en 3 ml de LB con 100 mg/ml de ampicilina y 25 mg/ml de cloranfenicol, el cultivo bacteriano se incubó a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, del cultivo bacteriano de toda la noche se inocularon 500 ml de medio LB (100 mg/ml ampicilina y 25 mg/ml cloranfenicol), incubando a 37°C dejando crecer hasta una O.D.=0.4. Alcanzada la absorbancia requerida, se adicionó IPTG (Isopropil tiogalactosido) como inductor a una concentración final de 1mM. La inducción se llevó a cabo

durante cinco horas a 37°C. Después de la inducción las células fueron cosechadas por centrifugación a 5,000 rpm por 10 min a 4°C.

La pastilla celular fue resuspendida en buffer de lisis (Anexo 1) y sonicada 5 veces durante un 1 minuto. Centrifugada a 5,000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenante recuperado se sometió al proceso de purificación. Para la purificación se utilizó la resina Ni-NTA (QIAGEN), fueron incubados 100 µl de resina con el extracto celular durante 30 min a 4°C y en agitación. Se procedió a lavar tres veces la resina con el buffer BC100 (Anexo 1) y guardando una alícuota. El paso siguiente fue la elusión de la proteína recombinante, utilizando 100 µl de Buffer de elusión (Anexo 1), este proceso se realizó tres veces. Para verificar la purificación se corrió un gel de poliacrilamida SDS-PAGE al 12% (Anexo 1).

2.3 RESULTADOS Y DISCUSION

2.3.1 Clonación y secuenciación de WUSCHEL

Para la clonación de WUSCHEL se utilizaron los iniciadores *wusNdeI* y *WusHindIII* para su amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se utilizó como plantilla para la amplificación el vector pER10w.

El resultado de la amplificación por PCR de WUSCHEL fue una banda de 893 pb, siendo del tamaño de fragmento esperado como se observa en la figura

2.1. Posteriormente el fragmento fue cortado del gel de agarosa y purificado. El siguiente paso fue clonar el fragmento en el vector pCR® 2.1 TOPO® de Invitrogen y transformado en *E. coli* DH5α.

Las células que se sometieron a transformación fueron plaqueadas en medio LB agar con ampicilina (100 mg/ml) como agente de selección. De las clonas seleccionadas se realizó la extracción de ADN plasmídico, siguiendo el método de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001), para corroborar si éstas estaban transformadas con el vector deseado (figura 2.1).

Para corroborar la ligación de WUS en el vector pCR® 2.1-TOPO® de Invitrogen las clonas elegidas fueron sometidas a digestión utilizando la enzima de restricción *Eco* R1, ya que sitios de corte de esta enzima flanquea los sitios de clonación del vector antes mencionado. Como resultado de la digestión se observó el fragmento de tamaño esperado de aproximadamente 876pb (figura 2.2). Al constructo obtenido se denominó WUS-TOPO.

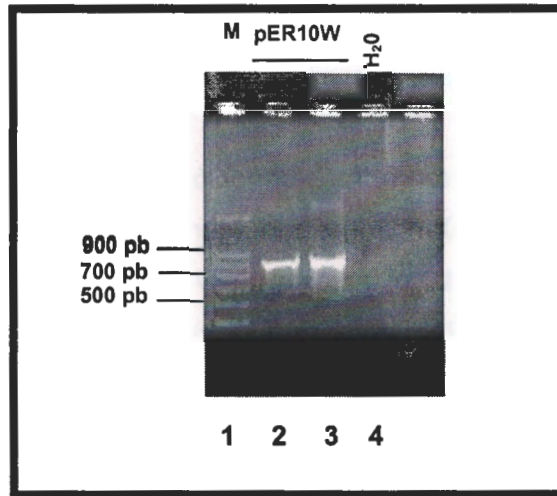


Figura 2.1. Amplificación por PCR de WUSCHEL. Carril 1: marcador molecular de 100 pb, carril 2 y 3 amplificación de WUSCHEL utilizando como templado el vector pER10w, carril 4: se utilizo agua como control para verificación de los oliginucleotidos. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Para corroborar la identidad de la clonas se mandaron a secuenciar determinando que la secuencia obtenida posee un tamaño de 893 pb. Se realizó un alineamiento con la secuencia de WUSCHEL de *Arabidopsis* que se encuentra en el GenBank (AJ012310). Para el alineamiento se utilizó el software ClustalW2 disponible en Internet (www.ebi.ac.uk/tools/clustaw2/index.html), arrojando un porcentaje de identidad del 98% (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1 Alineamiento de secuencia de WUSCHEL de café y *Arabidopsis*

WUS clona de WUS	ATGGAGCCGTACGAGCATCAGCATCATCATCATCAAGCCGACCAAGAAAGCGGCAACAAC	60
WUS <i>Arabidopsis</i>	ATGGAGCCGCCACAGCATCAGCATCATCATCATCAAGCCGACCAAGAAAGCGGCAACAAC	60
WUS clona de WUS	AACAACAAGTCCGGCTCTGGTGGTTACACGTGTGCCAGACCAGCAGAGGTGGACACCG	120
WUS <i>Arabidopsis</i>	AACAACAAGTCCGGCTCTGGTGGTTACACGTGTGCCAGACCAGCAGAGGTGGACACCG	120
WUS clona de WUS	ACGACGGAGCAAATCAAATCCTCAAAGAACTTTACTACAAACATGCAATCCGGTCACCA	180
WUS <i>Arabidopsis</i>	ACGACGGAGCAAATCAAATCCTCAAAGAACTTTACTACAAACATGCAATCCGGTCACCA	180
WUS clona de WUS	ACAGCCGATCAGATCCAGAAGATCACTGCAAGGCTGAGACAGTTCGGAAAGATTGAGGGC	240
WUS <i>Arabidopsis</i>	ACAGCCGATCAGATCCAGAAGATCACTGCAAGGCTGAGACAGTTCGGAAAGATTGAGGGC	240
WUS clona de WUS	AAGAAGTCTTTTACTGGTCCAGAACCATAAGGCTCGTGAGCGTCAGAAGAAGAGATT	300
WUS <i>Arabidopsis</i>	AAGAAGTCTTTTACTGGTCCAGAACCATAAGGCTCGTGAGCGTCAGAAGAAGAGATT	300
WUS clona de WUS	AACGGAACAACATGACCACCCATCTTCATCACCCAACTCGGTATGATGGCGCTAAC	360
WUS <i>Arabidopsis</i>	AACGGAACAACATGACCACCCATCTTCATCACCCAACTCGGTATGATGGCGCTAAC	360
WUS clona de WUS	GATCATTATCATCCTCTACTTCACCATCATCACGGTGTCCCATGCAGAGACCTGCTAAT	420
WUS <i>Arabidopsis</i>	GATCATTATCATCCTCTACTTCACCATCATCACGGTGTCCCATGCAGAGACCTGCTAAT	420
WUS clona de WUS	TCCGTCAACGTAAACTTAACCAAGACCATCATCTCTATCATATAACAAGCCATATCCC	480
WUS <i>Arabidopsis</i>	TCCGTCAACGTAAACTTAACCAAGACCATCATCTCTATCATATAACAAGCCATATCCC	480
WUS clona de WUS	AGCTTCAATAACGGGAATTTAAATCATGCAAGCTCAGGTACTGAATGTGGTGTGTTAAT	540
WUS <i>Arabidopsis</i>	AGCTTCAATAACGGGAATTTAAATCATGCAAGCTCAGGTACTGAATGTGGTGTGTTAAT	540
WUS clona de WUS	GCTTCTAATGGCTACATGAGTAGCCATGTCTATGGATCTATGGAACAGACTGTTCTATG	600
WUS <i>Arabidopsis</i>	GCTTCTAATGGCTACATGAGTAGCCATGTCTATGGATCTATGGAACAGACTGTTCTATG	600
WUS clona de WUS	AATTACAACAACGTAGGTGGAGGATGGGCAACATGGATCATCTACTCATCTGCACCT	660
WUS <i>Arabidopsis</i>	AATTACAACAACGTAGGTGGAGGATGGGCAACATGGATCATCTACTCATCTGCACCT	660
WUS clona de WUS	TACAACTTCTTCGATAGAGCAAAGCCTCTGTTGGTCTAGAAGGTCATCAAGACGAAGAA	720
WUS <i>Arabidopsis</i>	TACAACTTCTTCGATAGAGCAAAGCCTCTGTTGGTCTAGAAGGTCATCAAGACGAAGAA	720
WUS clona de WUS	GAATGTGGTGGCGATGCTTATCTGGAACATCGACGTACGCTTCCTCTCTCCCTATGCAC	780
WUS <i>Arabidopsis</i>	GAATGTGGTGGCGATGCTTATCTGGAACATCGACGTACGCTTCCTCTCTCCCTATGCAC	780
WUS clona de WUS	GAGTCTAGTCCAGATCACATCAACGGTGGTAGTGGTCCATCTGGAAGTATGGCCAATC	840
WUS <i>Arabidopsis</i>	G-----GTGAAGATCACATCAACGGTGGTAGTGGTCCATCTGGAAGTATGGCCAATC 833	
WUS clona de WUS	GGAAGTTCGCCCTTGCCTTCTCTTGAGCTACGCTGAACTAGTTGGAACCGT	893
WUS <i>Arabidopsis</i>	GGAAGTTCGCCCTTGCCTTCTCTTGAGCTACGCTGAACTAG----- 876	

2.3.2 Subclonación de WUSCHEL en el vector de expresión

Para la subclonación de WUSCHEL se utilizó una de las clonas seleccionadas que contiene el fragmento de WUSCHEL ligado al vector pCR® 2.1-TOPO® (WUS-TOPO) y también el vector de expresión pET11d que posee un promotor inducible con IPTG, estos dos elementos fueron sometidos a una doble digestión con las enzimas de restricción *Nde* I y *Hind* III, la digestión se llevo a cabo a 37°C durante 6 horas (fig 1.2).

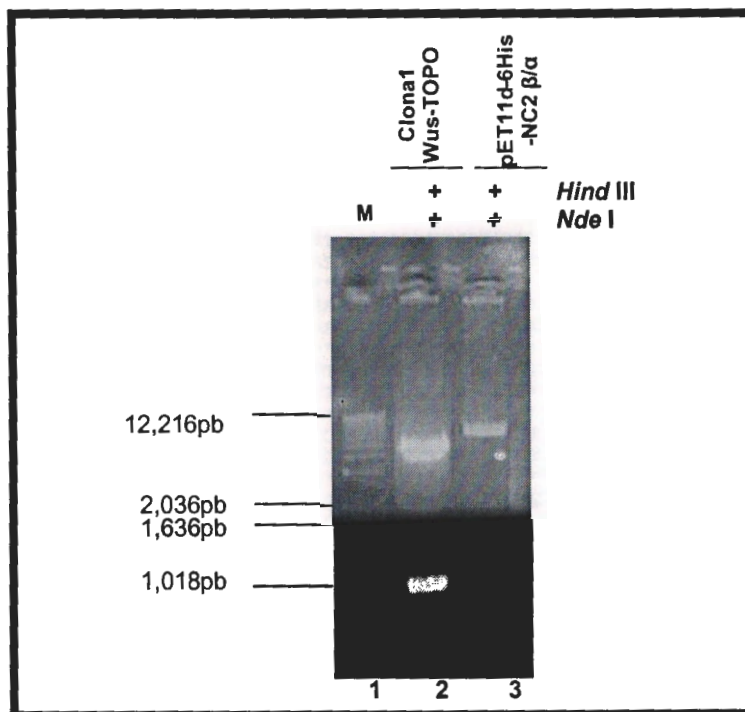


Figura 2.2. Doble digestión de la clona que contiene a WUSCHEL ligado al vector pCR 2.1 TOPO (carril 2) y el vector de expresión pET11d (carril 3) utilizando las enzimas de restricción *Nde* I y *Hind* III. Carril 1. Marcador de peso molecular 1Kb. Gel agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Como el resultado de la digestión se liberó un fragmento de 893 pb el cual fue clonado en el vector pCR® 2.1-TOPO®, como se puede observar carril 2 de la figura 2.2. El resultado de la digestión del vector de expresión pET11d fue la linearización del vector, para poder posteriormente ligar el fragmento de WUS en dicho vector. El fragmento liberado de WUS y el vector de expresión pET11d fueron purificados con el kit GeneClean (Q. Biogene) (Fig 2.3).

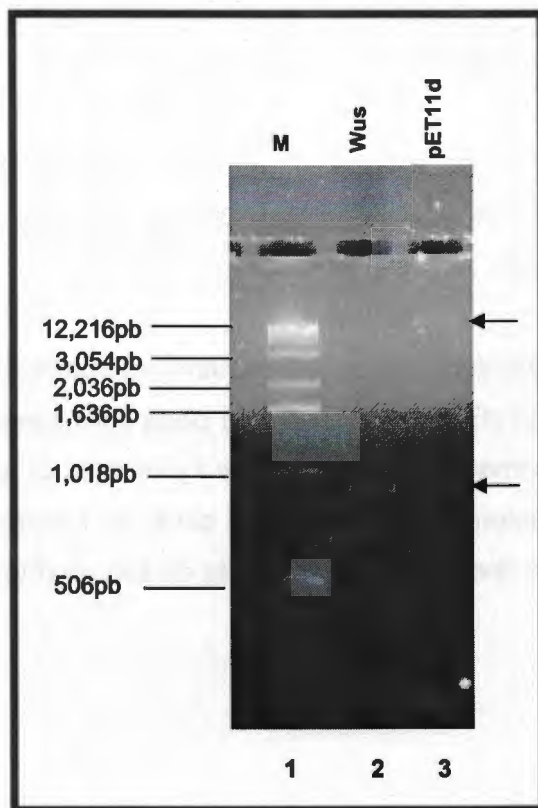


Figura 2.3. Resultados de la purificación de WUSCHEL y el vector pET11d. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Para la ligación de WUS en el vector de expresión se utilizó una proporción de 1:3 vector-inserto, utilizando la enzima T4 ligasa de Invitrogen para el ensayo de ligación, se incubó a 4°C durante toda la noche.

Posteriormente a la terminación de la ligación. se procedió a transformar por choque térmico células competentes *E. coli* DH5 α a 42°C por 90 segundos. Después de la transformación las células fueron plaqueadas en medio LB agar utilizando ampicilina a una concentración de 100 mg/ml, como medio de selección de transformantes.

De la transformación se obtuvieron algunas colonias las cuales fueron sometidas al proceso de extracción de ADN por el método de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001).

Para la corroboración de ligación del fragmento que corresponde a WUS con el vector de expresión pET11d, se eligió una clona para someterla a una doble digestión con las enzimas de restricción *Nde* I y *Hind* III. El resultado coincidió con los resultados obtenidos anteriormente como se mostró en la figura 2.2. Se puede observar la liberación del fragmento de 893 pb (Fig. 2.4).

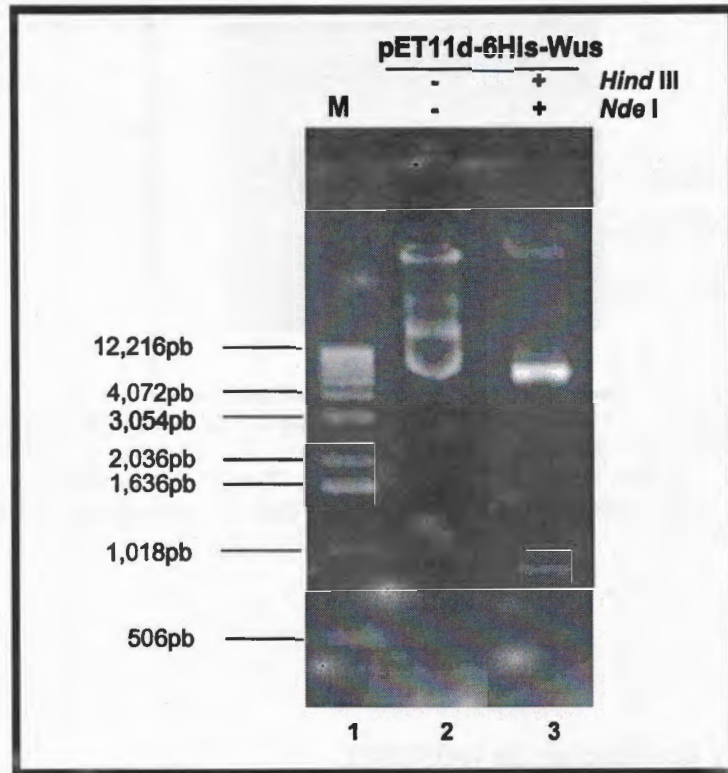


Figura 2.4. Doble digestión del vector pET11d-6His-Wus con la enzimas *Nde* I y *Hind* III. Carril 1. Marcado de peso molecular 1 kb. Carril 2. Vector pET11d-6His-Wus sin digerir. Carril 3. Vector pET11d-6His-Wus digerido. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Para corroborar los resultados también se decidió hacer un PCR utilizando los iniciados específicos para WUS. El resultado de la amplificación por PCR demuestran que tres de las clonas seleccionadas amplificaron el fragmento de tamaño esperado que correspondería a WUS (Fig. 2.5)

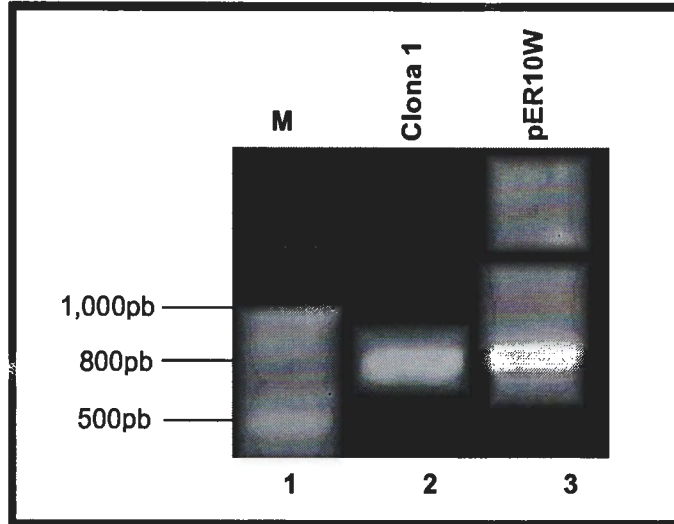


Figura 2.5. Amplificación por PCR de WUSCHEL ligado al vector de expresión pET11d. Carril 1: marcador de peso molecular de 100 pb. Carriles 2: clona que contiene WUSCHEL ligado al vector de expresión. Carril 3: Amplificación de WUSCHEL utilizado como plantilla el vector pER10W. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

2.3.3 Expresión y purificación de *WUSCHEL*

Para la expresión de WUS se eligió una de las clonas que contienen a WUS ligado al vector de expresión pET11d (pET11d-6His-Wus), esta clona fue sometida a extracción de ADN por medio de lisis alcalina (Sambrook and Russell, 2001), con el ADN extraído se transformaron células competentes *E. coli* BL21[D3(Lys E)], las cuales son necesarias para la expresión de la proteína. La transformación se realizó por choque térmico por 90 segundos a 42°C. De las clonas obtenidas se seleccionó una para los experimentos de expresión.

El ensayo de expresión empezó con la inoculación de 3 ml de medio LB (100 mg/ml de ampicilina y 25 mg/ml de cloranfenicol) con células BL21 (6His:pET11d-Wus). El medio de cultivo inoculado se incubó a 37°C durante toda la noche. Del cultivo bacteriano de 3 ml incubado durante toda la noche, se inoculó con 1 ml del cultivo bacteriano a 100ml de medio LB (100mg/ml de ampicilina y 25mg/ml de cloranfenicol) incubando aproximadamente durante 2 horas a 37°C, con una agitación de 150 rpm.

Después de las dos horas de incubación se tomó una alícuota de 1ml y se determinó la absorbancia por espectrofotometría del cultivo bacteriano hasta alcanzar una O.D. de 0.4 o 0.5. Al alcanzar la densidad óptima del cultivo bacteriano fue adicionado 1 mM de IPTG para inducir la expresión de la proteína. El cultivo bacteriano se conservó a 37°C durante 6 horas, igualmente con agitación de 150 rpm. También en el ensayo de expresión se incluyó un control, en este caso un medio de cultivo bacteriano sin someterlo al proceso de inducción.

Para verificar la inducción de la proteínas se elaboró un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12 % (SDS-PAGE) para observar el patrón proteínico tanto de las muestras inducidas y no inducidas. (Fig 2.6). Para la purificación de la proteína, se adicionó 100 µl de resina Ni-NTA al extracto celular, posteriormente se adicionó 100 µl de buffer de Elución (20mM Tris-HCl pH 7.9-7.8, 300 mM KCl, 2 mM PMSF, 250 mM imidazol y 10% glicerol), la proteína purificada fue almacenada a -80°C.

Como resultado se logro la expresión de la proteína recombinante, como se observo en los carriles 3 y 5 en la figura 2.6, el tamaño de una proteína es de aproximadamente 28-29 kDa (Fig. 2.6).

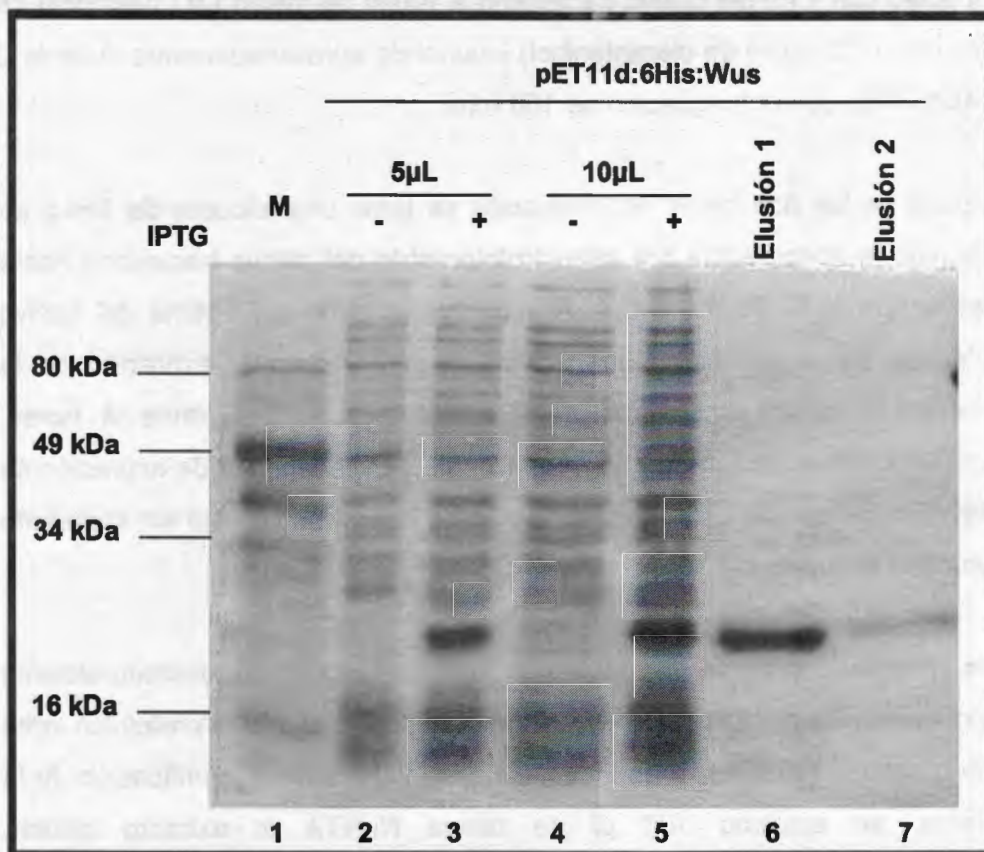


Figura 2.6. Inducción de la expresión de WUSCHEL en células *E. coli* BL21. La inducción de la expresión de la proteína se realizó con 1mM de IPTG durante 5 horas a 37°C. Gel desnaturalizante SDS-PAGE al 12%. El gel fue teñido con azul de Coomassie.

Para estandarizar las condiciones de la expresión y purificación se realizaron varias repeticiones del experimento de expresión y purificación, utilizando las mismas condiciones como se muestra en materiales y métodos.

2.4 CONCLUSIONES

Mediante el aislamiento de WUSCHEL se obtuvo un fragmento de 893 pb, que posee una identidad del 98% con respecto a la secuencia reportada de *Arabidopsis thaliana*. Esto sugiere que WUS es un factor de transcripción que posee una secuencia conservada.

Se logro expresar la proteína de WUSCHEL en el vector pET11d, determinando que la concentración ideal para la inducción de la proteína es de 1mM de IPTG y obteniendo los mismos resultados de eficiencia ya reportados por el proveedor.

La proteína obtenida fue de 28-29 kDa y el sistema de purificación por afinidad con Ni-NTA fue eficiente ya que se puede obtener aproximadamente un 80% de la proteína purificada, resultados que concuerdan con lo reportado por el proveedor. Estos resultados son importantes ya que son los primeros pasos de la caracterización de WUS en *Coffea canephora*.

2.5 Referencias

Estudier, F. W., Rosenberg., A. H., Dunn J. J., and Dubendorff J. M. (1990). Use of T7 RNA polymerease to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**:60-89.

Sambrook J., and Russell D. W. (2001). *Molecular cloning a laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. Pp 6.50-6.63.

CAPITULO 3

Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis

Arroyo-Herrera A¹, Ku Gonzalez A. ¹, Canche Moo R. ¹, Quiroz-Figueroa F. R²., Loyola-Vargas V. M. ¹, Rodriguez-Zapata L.C.³, Burgeff D'Hondt. C.² Suárez-Solís V.M⁴., and Castaño E.^{1*}

¹Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43, No 130, Colonia Chuburná de Hidalgo C.P. 97200 Mérida, Yucatán, México.

²Departamento de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), AP 510-3 Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, CP 62210

³Unidad de Biotecnología, Centro de Investigación Científica de Yucatán. Calle 43, No 130, Colonia Chuburná de Hidalgo C.P. 97200 Mérida, Yucatán, México.

⁴Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Yucatán. Unidad Interinstitucional de Investigación Clínica y Epidemiológica.

*Author for correspondence (e-mail:enriquec@cicy.mx)

‡ Este capítulo esta aceptado para su publicación en la revista Plant Cell, Tissue & Organ Culture

3.1 Abstract

Cell differentiation depends on the proper and sequential expression of key genes required for morphogenesis: Several aspects of control are required for this which include: chromatin modifications, DNA methylation, correct amount of particular transcription factors, proper nuclear arrangement etc. During the last few years the homeobox transcription factor WUSCHEL (WUS) has been shown to cause dedifferentiation when expressed on somatic cells followed by a production of new stem cells that can lead to somatic embryogenesis or organogenesis. We found that expression of WUS in coffee plants can induce calli formation as well as a 400% increase somatic embryo production. The results show that transgenic expression of the transcription factor WUS can be useful to increase somatic embryogenesis in heterologous systems. However a critical developmental stage and additional hormonal requirements are required for the induction of embryogenesis by WUS in *Coffea canephora*.

Keywords: *Coffea* spp., CLAVATA, Homeobox, somatic embryogenesis, Transcription factor, morphogenesis

3.2 Introduction

The study of plant development has revealed many of the players relevant to the maintenance and differentiation of cells required for specialized tissues. Somatic embryogenesis has been a useful tool for understanding many of the genes and pathways involved in development. One particular field of interest during the last few years has been the study of the mechanisms that regulate cell identity and maintenance of undifferentiated cells in plant meristems (Schoof et al. 2000; Gallois et al. 2004; Lenhard and Laux 2003).

The higher plant shoot meristem is a dynamic structure whose maintenance depends on the coordination of two antagonistic processes, organ initiation and self renewal of the stem cell population. The homeobox gene WUSCHEL (WUS) is required to specify stem cell identity. WUS was originally identified as a central regulator of shoot and floral meristems in *Arabidopsis* (Mayer et al. 1998) where it is expressed in a small group of cells, and is required to maintain the overlying stem cells undifferentiated. In *Arabidopsis* WUS has been found to be sufficient to ectopically induce stem cells. (Schoof et al. 2000; Gallois et al. 2004; Lenhard and Laux 2003; Zuo et al. 2002). Recent studies indicate that WUS can act both as a transcriptional activator of the floral gene AGAMOUS and as a transcriptional repressor of cytokinin response genes (Kieffer et al. 2006; Leibfried et al. 2005; Lohmann et al. 2001), suggesting that its molecular function is modified upon the developmental context. Mutations in WUS result in the misspecification of stem cells and premature termination of shoot and floral meristems after a few organs have been formed (Laux et al. 1996). CLV genes promote the progression of meristem cells toward organ initiation. Mutations in any of these genes result in delayed organ initiation,

leading to an accumulation of meristem cells and in crease in the size of the shoot meristem dome (Hamada et al. 2000).

The balance between the rate of cell division and differentiation is crucial for the ordered transition zones in the meristem. In *Arabidopsis*, WUS, CLV, and SHOOT MERISTEMLESS (STM) have been implicated in the maintenance of undifferentiated cells in the meristem (Che et al. 2007; Sablowski 2007). STM is thought to prevent premature recruitment of cells into differentiation pathways, while WUS is required to keep the pool of stem cells in the central zone (Scofield et al. 2007). The combined effect of ectopic WUS and STM have an additive effect on cell division, expansion of the central zone and initiation of organ primordia in *Arabidopsis* (Scofield et al. 2007).

Loss of WUS function leads to differentiation of stem cells and meristem termination. By contrast, ectopic WUS has been shown to induce somatic embryogenesis in some cases (Zuo et al. 2000) and in others to induce ectopic stem cell identity. During wild type development, WUS expression is initiated in 4 inner apical cells of the 16 cell embryo after several asymmetric divisions. WUS expression is confined to the center of the developing shoot meristem. Asymmetric expression of WUS is established during or rapidly after cell division (Laux et al. 1996). Mature embryos express WUS in a small cell group underneath the two outermost cell layers. CLV 3 functions as a mobile intercellular signal in the shoot apical meristem that spreads laterally from the stem cells and acts both on their neighbors and on the stem cells themselves to repress WUS transcription (Muller 2006). Furthermore WUS has been shown to be part of a WOX family of proteins. The WOX proteins maintain a common regulatory sequence between them. The function still unknown in the

majority of the WOX members however it is known that they are expressed asymmetrically and may be involved in the differentiation process.

Considering the function of WUS we decided to test the effect of over expressing WUS as a heterologous protein in *Coffea canephora*. The results show that transgenic lines that over expressed WUS lead to an altered increase growth and improved the production of somatic embryos. Histological analysis showed the development of meristem like structures, from which some produce somatic embryos after four weeks. Moreover, a 400 percent increase in the induction of somatic embryogenesis was observed from the transform WUS plants.

3.3 Materials and Methods

3.3.1 Plant growth and culture conditions

Plantlets of *Coffea canephora* cv. Robusta were grown in Magenta® boxes containing 40 ml of MS medium, supplemented with thiamine (11.86 µM), myo-inositol (0.550 µM), L-cysteine (0.158 µM), sucrose (87.64 mM), α-naphthalen acetic acid (0.54 µM), kinetin (2.32 µM) and Gelrite® (0.25%; w/v); pH was adjusted to 5.8 before autoclaving (20 min, 110 °C). The plantlets were cultured under a 16h light /8h dark photoperiod at 25±2 °C. Grown plants were transfer to a test ground in normal soil after six months of green house adjustment.

3.3.2 Evaluation of somatic embryo production

For somatic embryo induction, leaf segments were excised with a 1 cm diameter cork borer and cultured in the Yasuda medium (Yasuda et al. 1985) modified as follows: 0.784 mM CaCl₂, 5.15 mM NH₄NO₃, 4.7 mM KNO₃, 0.624 mM KH₂PO₄, 0.5 mM Na₂MoO₄, 0.375 mM MgSO₄, 50 mM H₃BO₃, 40 mM MnSO₄ 7H₂O, 0.2 mM CuSO₄, 15 mM ZnSO₄, 75.53 mM FeSO₄, 74.95 mM Na₂EDTA, 4.86 mM pyridoxin, 8.12 mM nicotinic acid, 29.6 mM thiamine-HCl, 550 mM myo-inositol, 87.64 mM sucrose, 2.5 mM 6-benzil amino purine and the 5 µM 17-β-estradiol dissolved in DMSO; pH was adjusted to 5.8 and Gelrite (0.25% w/v) was used as gelling agent. Cultures were incubated under darkness or 16h light /8h dark photoperiod with a light intensity of 50 µmol m⁻² s⁻¹ at 25 ± 2 °C (Quiroz-Figueroa et al. 2002). For the evaluation quantification of the number of embryos per explants was carried out and the number of embryos per explant from wild type plants was set at 100%.

3.3.3 Plasmid binary constructs

The binary vector generated, pER10W-35SRed, contains the DsRFP reporter gene under the 35S constitutive and the gene WUSCHEL under an estradiol inducible transcriptional control (Zuo et al. 2002). The vector was generated by subcloning the gene DsRFP from pRSET B-RED that contain the DsRFP in *EcoRI-Bam* HI (donated by Meredith Gould, Ens Baja California). DsRFP gene was removed from pRSET B-RED by digesting the plasmid with *Xba*I, followed by a fill in reaction with Klenow fragment and subsequent *Hind* III restriction digestion. The plasmid pCD contains a 35S promoter sequence (Gallie et al. 1989) and the plasmid was digested with *Sal* I followed by a fill in reaction with Klenow fragment and a subsequent *Hind* III restriction digestion. The DsRed

containing DNA was ligated into the digested pCD plasmid with T4 ligase for 8 hours at 15 degrees Celsius. The 35S-DsRFP DNA fragment was obtained by digesting *Sma*I and *Sac*I from the new vector named pCD-35SRed. These DNA was subcloned into pER10W donated by Chua NH (2002) by digesting pER10W with digested with *Spe*I. The ligation reaction was carried out after fill-in of the 5' overhangs with DNA polymerase I (Klenow fragment, Invitrogene Life Technologies). pGFP binary vector was a gift from Tomas Gonzales.

3.3.4 Coffee plantlets and embryos transformation

Agrobacterium tumefaciens strain C58C1 was used for the transformation of coffee plantlets and embryos. Bacterial selection for this strain was carried out with 100 mg l⁻¹ of rifampicin and 100 mg l⁻¹ of espectromicin. Transformation of coffee plants and embryos was done as previously described (Canche-Moo et al. 2006). 30 days after transformation fluorescent embryos were selected under DsRed fluorescent light in a Leica MZFL III stereoscope.

3.3.5 Histological analysis

The selected tissue fragments were fixed in FAA at room temperature for 16h. Afterwards, they were dehydrated in ethanol series (50%, 70%, 96%, 100%, 100%, 100%), and embedded with JB-4 embedding kit®(Polysciencies, Inc.). Serial 10µm thick sections were cut, transferred to polylysine-coated slides and stained with 0.02% toluidine-blue for 5-10 min at room temperature. Pictures were taken with white or fluorescent light. On a Leica MZFL III stereoscope to

be able to cover the entire length of the embryos with an excitation wavelength of 546/10nm and filters D600/40.

3.3.6 Genomic DNA extraction and PCR

Coffee leaves (100 mg) were used for genomic DNA extraction using 600 μ l DNA extraction buffer (100 mM Tris-HCl (pH 8), 50 mM EDTA, 2% SDS, 2% β -mercaptoethanol), following the protocol described by Lin and collaborators (2001).

PCR reactions were carried out by using the Invitrogene DNA polymerase in the presence of 1 mM Mg_2SO_4 . The primers used to check the transformed plants were: 5'-ACATATGGAGCCGCCACAG-3' and 5'-GGAACGTTCTAGTTCAGACG TAGC-3'. The amplification conditions were 95°C for 2 min; 28 cycles of 95°C for 1 min, 56°C for 1 min and 72°C for 1 min and a final extension step at 72°C for 10 min.

3.3.7 Southern-blot analysis

Wild type and selected transformed plant Genomic DNA (5 and 50 μ g) were digested with Eco R1 restriction enzyme or Hind III, separated on a 0.7 % agarose gel and blotted onto charged nylon membranes (Hybond N+, Amersham Pharmacia Biotech, England). For the probe labeling and hybridization we used the Gene Images Alkphos direct labeling and detection system (Amersham Biosciences, USA) kit according with the manufacturer instructions. The hybridization was carried on at 65 °C in 2M urea, 0.1% SDS, 150 Mm NaCl. A 850 pb probe was used which contains the gene sequence of WUSCHEL. The probe was amplified by PCR from the pER10W-35SRed as template. Utilizing the same primers and conditions used to check transformed plants.

3.3.8 RNA extraction

Total RNA was obtained from 300 mg of coffee leaves following the protocol described by Kieffer and collaborators was used 300 mg of *Coffea* leaves using extraction buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 mM EDTA; 2 M NaCl; 2% CTAB (w/v); 0.5% spermidina (w/v) and 2% β -mercaptoethanol) pre-warmed at 65°C, purified with chloroform/isoamylalcohol and was treated with DNase I (Invitrogen) as described elsewhere (Kieffer et al., 2000).

3.3.9 RT-PCR

cDNA synthesis was done with 1 μ g of total RNA using SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen), following manufacturer's instructions. The cycling conditions for PCRs were 95°C for 2 min; 40 cycles of 95°C for 1 min, 56°C for 1 min and 72°C for 1min and a final extension step at 72°C for 10 min. The primers used were: wusNdeI 5'-ACATATGGAGCCGCCACAG-3' and wus R1 5'-ATCGCCTCCACATTCTTCTT-3'. The RT-PCR products were resolved on 1.5% (w/v) agarose gels stained with ethidium bromide. RT-PCR products were separated on 1.5% agarose gel and transferred to nylon membranes (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biosciences) according to the manufacturer's instructions. Following transfer, DNA was fixed to the membranes via UV crosslinking (120 mJ). Probe labelling and hybridization were realized with Gene Images Alkaphos direct labelling and detection system (Amersham Biosciences) kit. The hybridization was carried on at 55°C according with the manufacturer's instructions.

3.4 Results

3.4.1. Whole coffee plantlets transformed with WUS show unorganized calli formation

Previous works have shown that WUS overexpression may generate *de novo* organ or embryo formation from fully differentiated organs (Zuo et al. 2002; Gallois et al. 2004). This led to the hypothesis that induced WUS overexpression could be of particular interest for recalcitrant species from which no efficient *in vitro* multiplication protocols are yet available. However as a first step we decided to test this hypothesis introducing WUS from *Arabidopsis thaliana* into *C. canephora* for which the conditions for transformation and somatic embryogenesis had already been set in our laboratory (Canche-Moo et al. 2006).

The first transformations of plantlets with *Agrobacterium* containing the pERW-35SRED plasmid lead to calli formation around the plant shoot when grown in the presence of 17- β -estradiol. However these calli failed to form any type of embryos or new shoots, as can be seen in figure 3.1. Moreover, calli would readily form on transformed leaves that had been cut as can be seen in figure 3.1C. Calli formation could be observed around the edge of the incisions but these calli did not developed further. Cell cultures obtained from this kind of calli were treated with or without 17 β -estradiol to induce further morphogenesis; however we failed to obtain any organized structures from this tissues. This initial set of experiments showed that somatic embryo formation could not be induced by the expression of WUS 11 from whole plants. We therefore decided to carry out the transformation essays with pERW-35SRED using somatic embryos assuming they would contain a greater degree of potentially embryogenic cells. We took advantage of the red fluorescent protein

expressed from the plasmid to differentiate between transformed and nontransformed embryos as previously published (Canche-Moo et al, 2006). After 80 days of culture in media supplemented with 5mM 17- β -estradiol, 90% of the transformed somatic embryos increased up to 350% in size (figure 3.1E, 3.1F). This was not observed in the wild type somatic embryos or transformed embryos expressing GFP (figure 3.1D and data not shown) under the same conditions. Ten percent of the transformed embryos showed somatic embryo formation as can be seen in figure 3.1E. This was not observed in the wild type somatic embryos or transformed embryos expressing GFP (figure 3.1D and data not shown) under the same conditions. Ten percent of the transformed embryos showed somatic embryo formation as can be seen in figure 3.1E.

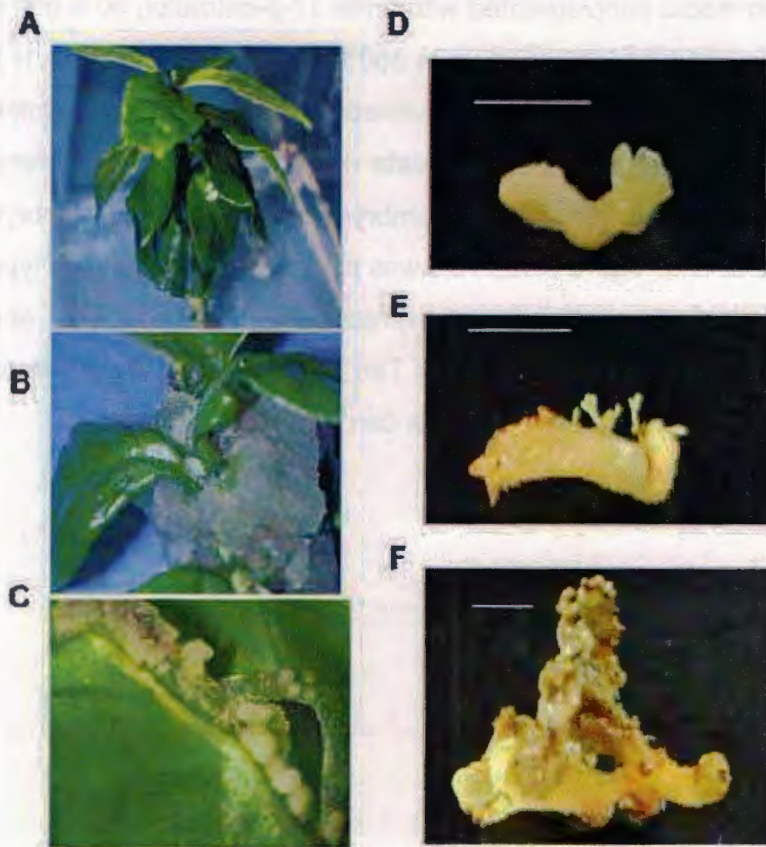


Figure 3.1 Transient transformation of *Coffea canephora* plantlets. Plantlets transformed with an GFP expressing vector (A). WUS expression system was used in plantlets of *coffea canephora*. A month after transformation with pERW-35SRED, some plantlets developed calli around the shoot or in the infected stems (B) and previously incised leaves grown on MS supplemented with estradiol (C). Wild-type typical somatic embryo (D). E and F show transient transform embryos with pER10W-35SRed. 5 mm bars were place to compare the size of embryos.

The red fluorescent embryos were selected as shown in figure 3.2 after 30 days of transformation. Non transformed embryos showed a weak red fluorescence as compared with transformed embryos. Furthermore, histological dissections of 80 days embryo showed a homogeneous fluorescence as compared to wild type embryos (figure 3.2C and 3.2 D).

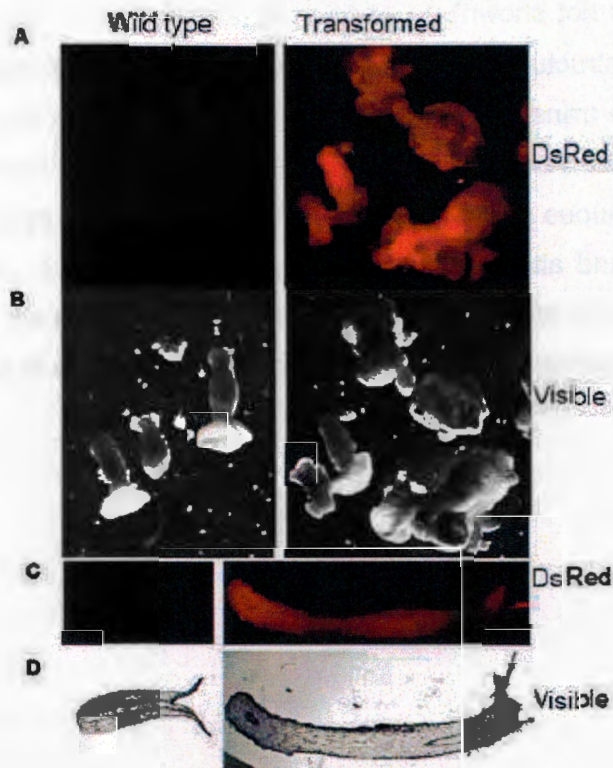


Figure 3.2. Selection transformed somatic embryos of *Coffea canephora* with pER10W-35SRed. The embryos were maintained in Yasuda medium (supplemented with 17- β -estradiol) for 30 days. Wild-type typical somatic embryos were compared to transformed embryos (A under fluorescent light or B under visible light). Histological dissection of an 80 day old embryos is shown. (D under fluorescent light or E under visible light).

Most embryos seen in figure 3.1F showed altered structures that resemble ectopic meristem center formation on the cotyledons (figure 3.3A). Transversal dissection of the embryos showed a multitude of dense nuclei cells around the leaves (figure 3.3B) from which some developed into somatic embryos (figure 3.3C). However, the majority of the embryos did not develop into plants. The hypocotyls usually got swollen and leaf development, when observed, was compromised by several distortions and new growths that did not continue to develop (results not shown). In addition to lateral organs, adventitious shoots or embryo like structures could also form (figure 3.3C). All vegetative embryo tissues from the transform plants could produce shoot-like organs or embryo-like structures, but their further development was impaired. These observations show that continuous overexpression of WUS as a regulatory protein results in malformations and alterations *in growth*. However, we took advantage of the inducible system to provide a transitory signal, in this case we tested WUS as a trigger for the genes involved in the developmental switch to embryogenesis.

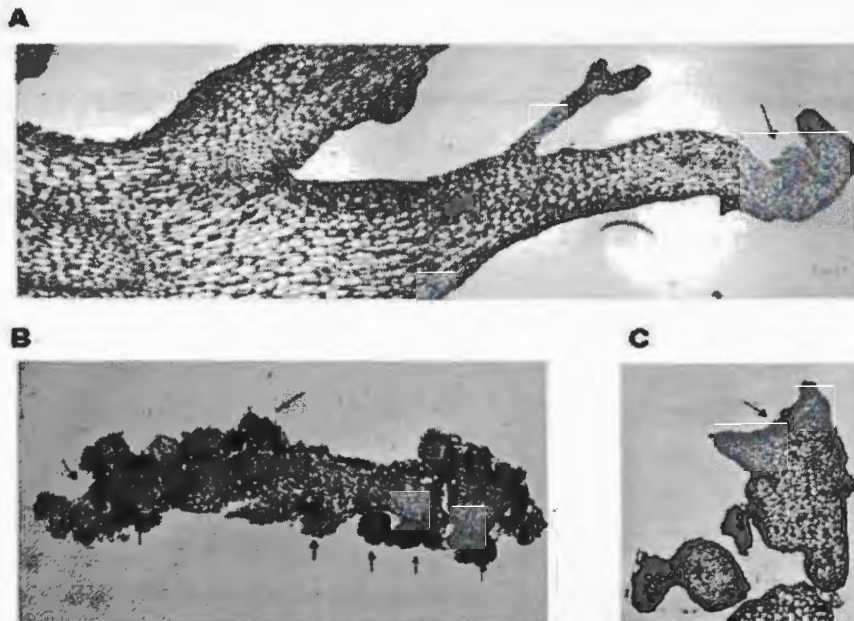


Figure 3.3. Histological analysis of 40 day old embryos maintained in Yasuda medium in the presence of $5 \mu\text{M}$ 17- β -estradiol. **A.** Apical portion from a pERW-35SRED transformed somatic embryo, showing possible ectopic meristem-like structures in the cotyledonal section of the embryo is shown by the arrow. **B.** Cross section of the cotyledonear structure from a transformed embryo. The arrows showed highly dense structure from which some develop into secondary somatic embryos. **C.** Somatic embryo showing the meristem portion.

We tested on the 10% embryos that showed normal secondary embryo formation and developed cyclic somatic embryogenesis for six months as can be seen in figure 3.4. The essays were always carried out in parallel with a wild type plant to verify that the specific growing conditions were identical to those of the pERW-35SRED transformed embryos, as can be seen on the left of each panel. The long production of embryos can be attributed to the chemical stability of 17- β -estradiol under these conditions. The newly formed somatic

embryos were grown on MS media for 16 months into well developed normal plantlets as seen on figure 3.4. From the plantlets obtained, only those showing effective transformation with pERW-35SRED were selected for further study. The above data seem to corroborate that WUS, in addition to its meristem function described previously (Laux et al. 1996; Mayer et al. 1998), it can also plays a critical role in promoting or maintaining embryonic potential as seen by Zuo et al. (2002).

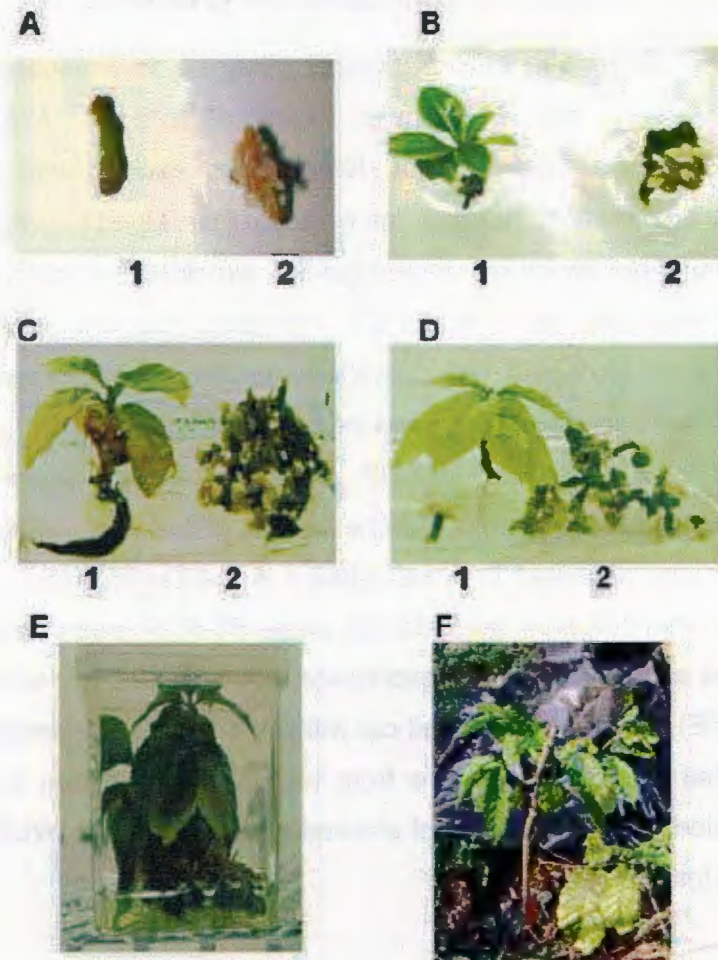


Figure 3.4. Overexpression of WUS induces secondary embryogenesis in somatic embryos of *Coffea canephora*. **A-D** Wild type coffee somatic embryo is show at the left side of the panel, and the somatic embryo transformed with pERW-35SRED forming calli is show at the right.. **A** after 10 days. **B** after 30 days. **C** 2 Months, **D**. 6 Months. **E**. Coffee plants 16 21 months old completely regenerated from the secondary somatic embryos. All the treatments were maintained in a medium containing MS+ANA+Kinetina (A-E) + 5 μ M 17- β -estradiol (A-D).

3.4.2 Roots from transformed plants grown on 17- β -estradiol supplemented media develop meristem like structures.

Transformed plants with pERW-35SRED obtained as described above were transferred from MS+NAA+kinetin medium to the same MEDIUM supplemented with 17- β -estradiol. Roots were excised and submitted to histological observation. The root tips were often enlarged to give rise to lateral root primordial-like structures or embryo-like structures, which were unable to develop further, as seen in figure 3.5. However, after two months the roots swell into undifferentiated calli. Southern blot from transformed plants was used to verify insertion of the gene WUS in the selected plant and compared to a plant transformed with a GFP expression vector (figure 3.5D). High background is probably due to Wuschel related genes from *Coffea*. However a clear band was observed that was absent in the control plant. To verify the expression of WUS from the selected plant, RT-PCR was carried out. At 28 PCR cycles a difference in the expression was seen with or without estradiol (figures 3.5E). PCR's were carried out without a reverse transcription reaction to verify that amplifications were from mRNA and not from Genomic DNA contamination. The selected plant showed to express the WUS gene in the roots used for analysis.

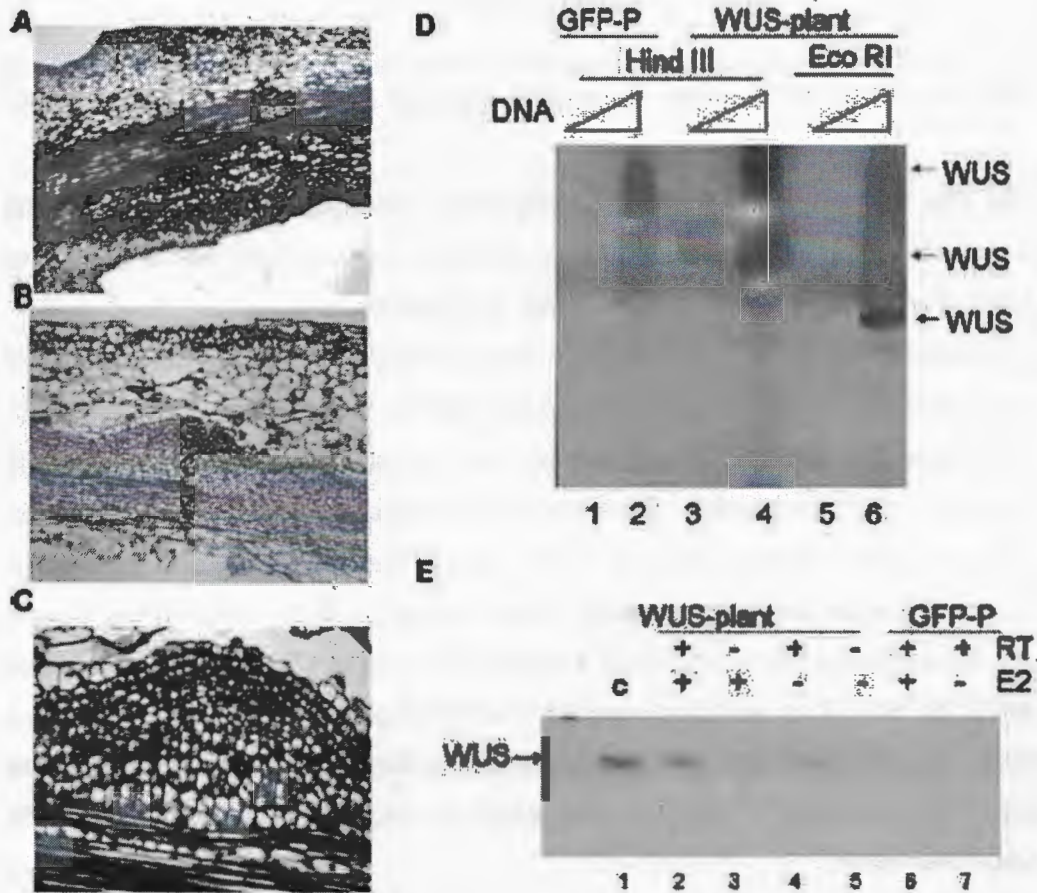


Figure 3.5. Histological analysis of roots of *Coffea canephora* plants after 40 days exposure to 5 μ M 17- β -estradiol. **A.** Root from a wild type plant. **B.** Longitudinal section of a pERW-35SRED transformed root showing an apparent increase of cell proliferation across the root. **C.** Apparent lateral root primordial-like structure formation in a pERW-35SRED transformed root. Southern Blot from a selected pERW-35SRED transformed plant was used to verify that WUS was introduced into the genome. 5 and 50 μ g of Genomic DNA were loaded either for the control (GFP transformed plant) or WUS transformed plant. Genomic DNA was digested with *Hind* III or *Eco*RI for 5 hours at 37°C. RT-PCR was carried out as described in Materials and Methods. RNA from a single either GFP transformed or WUS transformed plantlets was used. Plantlets were grown with or without 5 μ M estradiol. RNA was treated with or without SuperScript™ III for 1 hour.

3.4.3 Embryogenic cultures obtained from transformed plants show a high increase in somatic embryo formation in the presence of 17- β -estradiol.

We also carried out somatic embryogenesis induction with leaves from the pERW-35SRED transformed plantlets. Explants were excised with a cork borer from these leaves and were placed in Yasuda medium as described in materials and Methods. This liquid medium allows normally a small number of somatic embryos to develop from wild type plants, due to its low cytokinin level. We found that pERW-35SRED transformed cultures showed a 400% \pm 30% increase in somatic embryo formation as compared to cultures obtained from wild type leaf explants, as seen in fig. 3.6A. These essays were repeated 8 times to check for reproducibility. RNA extraction from transformed parent plants were was tested for WUS expression via RT-PCR see fig. 3.6B. Total extracted RNA from selected parent transformed plants and wild type is shown in fig. 6C. Therefore the increase in somatic embryo formation corresponds to expression of WUS in these tissues, which its known function is to keep cells undifferentiated.

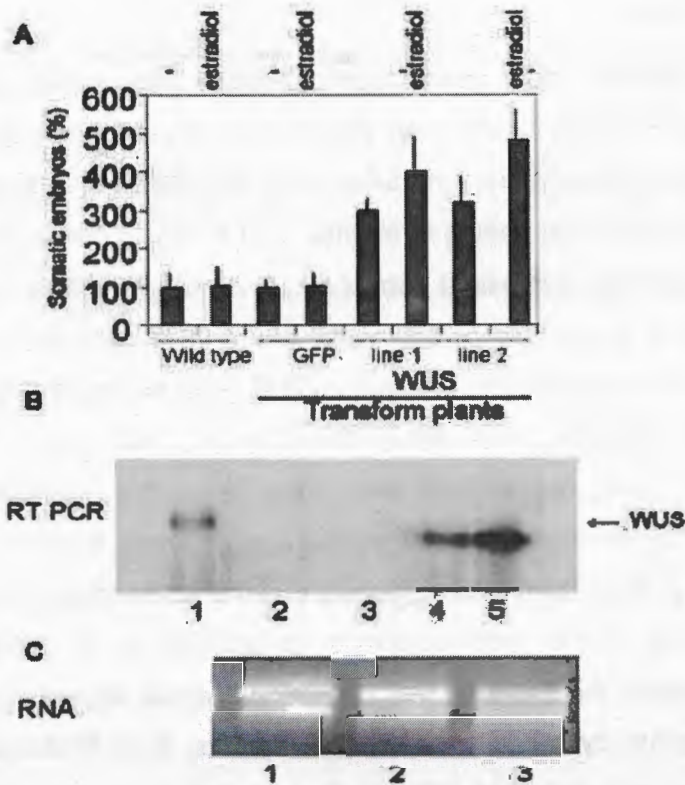


Figure 6. Somatic embryogenesis induction in cultures from pERW-35SRED transformed leaves. Leaf explants either from normal wild type, pGFP transformed plants or from two selected pERW-35SRED transformed plants, were used as starting material for somatic embryogenesis induction. **A.** Somatic embryo quantification after 1 month in liquid Yasuda medium supplemented with 5 μ M 17- β -estradiol. **B.** RT-PCR-Blotting to detect WUS expression. in leaves: 1: WUS positive control PCR product; 2 water; 3 wild type plant; 4 pERW-35SRED transformed plant line 1; 5 pERW-35SRED Transformed plant line 2. **C.** Total RNA extracted from leaves used for the RT-PCR. 1 Wild type plant; 2 pERW-35SRED Transformed plant line 1; 3 pERW-35SRED Transformed plant line 2.

Discussion

Unlike animals most plant organogenesis takes place postembryonically, allowing plants to modify their development in response to the environment. The shoot apical meristem (SAM) has the ability to maintain an organized structure while responding to intrinsic and extrinsic developmental signals. To accomplish this, a constant pool of slowly dividing undifferentiated stem cells is maintained within the central zone of the SAM (Kieffer et al. 2006). The proliferation of stem cells within the SAM must be exactly matched to the rate at which daughter cells differentiate (Baurle and Laux, 2005; Carles and Fletcher, 2003; Gross-Hardt and Laux, 2003). Our observation that WUS is capable of promoting the vegetative-to-embryonic transition, and eventually somatic embryo formation, suggests that the homeodomain protein can play a critical role during embryogenesis, in addition to its function in meristem development. Furthermore this regulatory control appears to work well on a heterologous system such as Coffea plants. It is Presume that the highly restrictive expression of WUS hallmarks the putative embryonic organizing centre which, in turn, may give rise to stem cells during embryogenesis and later development. (Zou et al. 2002) The mechanism by which WUS prevents the differentiation of stem cells is unknown. Furthermore, its activity in dedifferentiating cells may prove unconventional as a way to reorganize heterochromatin to the level of stem cells when expressed in selected tissues (Zou et al 2000). This activity is consistent with our results shown in figure one in which somatic cells dedifferentiates to form calli. Similar to the effect seen when abnormal added levels of auxins are added in plants (Golz 2006). In tissue that is not highly differentiated like that of somatic embryos the ectopic expression of WUS provided an abnormal growth in the majority of the embryos, this could be due to the effect of WUS on ARF(s) which has a direct

influence upon its expression and mutations in ARF have shown abnormal growth in *Arabidopsis*. Figure 3.1 shows an increase in overall size of the embryos with several abnormalities that may lead to ectopic meristems seen in figure 3.2 and 3.3. Furthermore, low expression may lead to the formation of somatic embryogenesis in a few cells. These results are consistent with previous findings seen in *Arabidopsis* by Zou et al. 2002 and Xu et al. 2005 which may reflect how an ectopic expression of a transcription factor can lead to an alteration in the development signals. Furthermore, the time and type of cells are crucial for induction into somatic embryogenesis. Previously Zou et al. 2002 had shown that root meristems could produce somatic embryos in *Arabidopsis*. Here we found that the best tissue for induction was during the first stages of somatic embryogenesis. This provided a cyclic somatic embryogenesis system. Moreover, when the embryos were put in a non inducing environment they show a proper development. Although roots did show abnormal development during induction and increase meristem formation along the roots, no embryos develop from this tissue. Mostly a higher number of roots formed from exposed plants (Data not shown). Probably due to the similarities in function with WOX5 which controls root meristem maintenance and WUS expression may interfere with normal development in roots as can be seen in figure 3.5 which is consistent with previous observations (Imin et al., 2007; Nardmann et al. 2007). This is however the first time that expression of WUS has been carried out in a somatic embryogenesis induction system from which may provide a useful tool for propagation of difficult cultivars of plants. Figure 3.6 shows that transformed plants that overexpressed WUS showed a $400\% \pm 30\%$ increase in somatic embryo formation as compared to cultures obtained from wild type leaf explants. Further research would be required to define if over expression of WUS in recalcitrant plants can lead to somatic

embryogenesis. Additionally the regulatory pathway in which WUS may be able to act promoting somatic embryo formation in *Arabidopsis* seems to be conserved as it functions in a similar way in *Coffea*. However, unlike *Arabidopsis* that a induction of WUS was all that was necessary for somatic embryo formation or organogenesis (Zou et al. 2002 and Xu et al. 2005). In *Coffea canephora* only an increase in number embryo was observed figure 3.6 and a small percentage of secondary embryos were obtained as seen in figure 3.1E. RT-PCR showed that WUS was also expressed in the absence of 17- β estradiol. This leaking of transcription can be attributed to the location of the insertion of this gene in the genome (an euchromatin region) or a cross reactivity of the estrogen receptive portion interacting with an estrogen like molecule. This may explain the low difference in embryo formation, between the induced and non-induced transformed explants seen in figure 3.6A-B.

Acknowledgments

We thank to Fernando Contreras for her technical help and Luis Joel Figueroa from Accesolab for the contribution of reagents for this study. Dr. Castaño is partially funded by CONACYT grant 39731-z and CONACYT grant 056001.

References

Baurle I, Laux T (2005) Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell* 17:2271–2280.

Canche-Moo A, Ku-Gonzalez C, Burgeff, Loyola-Vargas VM, Rodríguez-Zapata LC and Castaño E (2006) Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell and Tiss. Org. Cult.* 84: 373-377.

Che P, Lall S, Howell SH (2007) Developmental steps in acquiring competence for shoot development in *Arabidopsis* tissue culture. *Planta* Jun 21. DOI 10.1007/s00425-007-0565-4.

Gallie DR, Lucas WJ and Walbot V (1989) Visualizing mRNA expression in plant protoplasts: factors influencing efficient mRNA uptake and translation. *Plant Cell* 1:303-311.

Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R (2004). WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev.* 18: 375–380.

Carles CC and Fletcher JC (2003) Shoot apical meristem maintenance: the art of a dynamic balance. *TRENDS in Plant Science* 8(8):394-401.

Golz JF (2006) Signalling between the shoot apical meristem and developing lateral organs. *Plant Mol Biol.* 60(6):889-903.

Gross-Hardt R, Lenhard M, Laux T (2002). WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes Dev.* 16: 1129–1138.

Hamada S, Onouchi H, Tanaka H, Kudo M, Liu YG, Shibata D, Machida C, Machida Y (2000) Mutations in the WUSCHEL gene of *Arabidopsis thaliana* result in the development of shoots without juvenile leaves. *Plant J.* 24: 91–101.

Kiefer E, Heller W, and Ernst D (2000) A simple and efficient protocol for isolation of functional RNA from plant tissues rich in secondary metabolites *Plant Molecular Biology Reporter* 18:33-39.

Kieffer M, Stern Y, Cook H, Clerici E, Maulbetsch C, Laux T, Davies B (2006). Analysis of the transcription factor WUSCHEL and its functional homologue in *Antirrhinum* reveals a potential mechanism for their roles in meristem maintenance. *Plant Cell* 18: 560–573.

Imin N, Nizamidin M, Wu T, Rolfe BG (2007) Factors involved in root formation in *Medicago truncatula*. *J Exp Bot.*;58(3):439-51

Laux T, Mayer KF, Berger J, Jürgens G (1996) The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development* 122:87–96.

Lin RC, Ding ZS, Li LB and Yu T (2001) A rapid and efficient DNA minipreparation suitable for screening transgenic plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 19:379a-379e.

Leibfried A, To JPC, Busch W, Stehling S, Kehle A, Demar M, Kieber JJ and Lohmann JU (2005). WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438:22-29.

Lenhard M and Laux T (2003) Stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA1. *Development* 130:3163-3173.

Lohmann J, Hong R, Hobe M, Busch M, Parcy F, Simon R and Weigel D (2001) A molecular link between stem cell regulation and floral patterning in *Arabidopsis*. *Cell* 105(6):793-803.

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

Muller R, Borghi L, Kwiatkowska D, Laufs P, Simon R (2006) Dynamic and compensatory responses of *Arabidopsis* shoot and floral meristems to CLV3 signaling. *Plant Cell* 18(5):1188-98.

Nardmann J, Zimmermann R, Durantini D, Kranz E, Werr W (2007) WOX gene phylogeny in Poaceae: a comparative approach addressing leaf and embryo development. *Mol Biol Evol.* 24(11):2474-84.

Quiroz-Figueroa FR, Fuentes-Cerda CF, Rojas-Herrera R, and Loyola-Vargas VM (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.* 20: 1141-1149.

Sablowski R (2007) Flowering and determinacy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 58(5):899-907.

Schoof, H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T (2000) The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 100:635–644.

Scofield S, Dewitte W, Murray JA (2007) The *KNOX* gene *SHOOT MERISTEMLESS* is required for the development of reproductive meristematic tissues in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50(5):767-81.

Xu YY, Wang XM, Li J, Li JH, Wu JS, Walker JC, Xu ZH and Chong K (2005) Activation of the *WUS* gene induces ectopic initiation of floral meristems on mature stem surface in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 57:773-784.

Yasuda T, Fujii Y and Yamaguchi T (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.* 26: 595–597.

Zuo J, Niu QW, Frugis G, Chua NH (2002) The *WUSCHEL* gene promotes vegetative-to embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30(3):349-59.



Capítulo 4

DISCUSIÓN GENERAL

El factor de transcripción WUS se considera el regulador principal de la población de células madre en el meristemo apical y meristemo floral en plantas debido a que su actividad fundamental en la planta. WUS se encarga de mantener el balance entre el número de células madre y las células que se diferencian para formar nuevos órganos (Laux *et al.*, 1996; Meyer *et al.*, 1998; Baurle and Laux, 2005).

Otra de las funciones y no menos importante que se han determinado de WUS es la especificación celular durante la organogénesis femenina y masculina en plantas (Deyhle *et al.*, 2006; Gross-Hardt *et al.*, 2002). La función de WUS en el desarrollo del óvulo, interviene en la formación del integumento y la chalaza (Gross-Hardt *et al.*, 2002). Con respecto al desarrollo de las anteras, la expresión de WUS se inicia en etapas muy tempranas del desarrollo de estas, siendo precursor celular del estomium y su actividad termina justo antes de que las células del estomium entren en diferenciación (Deyhle *et al.*, 2006).

La secuencia de WUS en *Coffea*, se determinó que su secuencia tiene un tamaño de 893 pb, al ser comparada la secuencia con las bases de datos, mostró una identidad del 98 % con respecto a la secuencia ya reportada de *Arabidopsis thaliana* (Cuadro 2.1).

Para la expresión y purificación de WUS recombinante, se lograron las condiciones de expresión de la proteína y se igualaron los resultados con respecto a lo reportado por Novagen (Dubendorff y Studier, 1991). Se obtuvo una proteína con un tamaño aproximado entre 28 y 29 kDa (Fig. 2.7). La obtención de la proteína de WUS es de gran importancia ya que este es el primer paso para futuros estudios a nivel transcripcional.

El sistema de sobre expresión de WUSCHEL en embriones demuestra que este factor es capaz de promover la transición vegetativa-embriogénica, sugiriendo que este factor de transcripción juega un rol fundamental durante la embriogénesis cuando se expresa ectópicamente.

En los estudios de sobreexpresión de WUS el tejido elegido para los experimentos es de gran importancia, dependiendo del tejido con el que se trabaje se tendrá respuestas fisiológicamente diferentes por la sobre expresión de WUS ya que depende mucho del estado de diferenciación del tejido. En primera instancia se probó la repuesta en plantas de café, el resultado fue la dediferenciación de células somáticas para formar callo, como se observó en la Figura 3.1. Estos resultados son similares a los efectos anormales que se observan con un excedente de auxinas en plantas (Golz, 2006).

La mejor inducción de la sobre expresión de WUS se observó en embriones somáticos provocando incremento en su tamaño (Fig 3.2). En algunos embriones se presentó la formación ectópica de meristemas y embriones somáticos como se puede observar en la figura 3.3. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Zou *et al.*, 2002, donde reporta la producción de embriones somáticos en raíces transformadas y en los

resultados obtenidos por Xu *et al.*, 2005 donde obtuvo la producción ectópica de nuevos meristemas a partir células diferenciadas del cortex.

En el trabajo realizado por Zou *et al.*, 2002, se reportó la inducción de embriogénesis somática en raíces transformadas por efecto de la sobre expresión de WUS, estos embriones tuvieron un crecimiento normal sin necesidad de ningún tratamiento hasta llegar a una planta adulta sana y fértil, demostrando que WUS tiene un papel importante en promoción de la transición del estado vegetativo al embriogénico. A diferencia de lo reportado anteriormente Xu *et al.*, 2005, demostró que al transformar tejido maduro de tallo de inflorescencias y sobre expresar WUS, la actividad de WUS es suficiente para establecer nuevos meristemas en tejido ya diferenciado.

Además, se observó que un pequeño porcentaje de los embriones presentó embriogénesis secundaria por seis meses (Fig. 3.4). Esto quizá se deba a que la sobre expresión de WUS causa alteración en la señalización del desarrollo.

Es probable que las alteraciones observadas en la raíz de las plantas transformadas (Fig. 5) por el efecto de la sobre expresión de WUS se deba a la similitud que posee con el gen WOX 5, ya que pertenecen a la misma familia de proteínas. La función de WOX 5 es mantener las células madre indiferenciadas en el meristemo radicular (Haecker *et al.*, 2003),

Nuestros resultados son de gran importancia, esto se debe a que este es el primer trabajo en el que se reporta un sistema de producción de embriogénesis somática con la expresión de WUS y sería una herramienta de

gran utilidad a nivel de propagación de planta *in vitro*, ya que este sistema se podría emplear en plantas de interés comercial con dificultad de propagación.

REFERENCIAS

Baurle I., Laux T. (2005). Regulation of WUSCHEL transcription in the stem cell niche of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Plant Cell* 17:2271–2280.

Deyhle F., Sarkar A., Tucker E. J. and Laux T. (2006). WUSCHEL regulates cell differentiation during anther development. *Developmental Biology*

Dubendorff J. W. and Estudier F. W. (1991). Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. *J. Mol. Biol.* 219(1):45-59.

Gallois J. L., Nora F. R., Mizukami Y., and Sablowski R. (2004). WUSCHEL shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes & Development* 18:375:380.

Golz J. F. (2006). Signalling between the shoot apical meristem and developing lateral organs. *Plant Mol Biol.* 60(6):889-903.

Groß-Hardt R., Lenhard M., and Laux T. (2002). WUSCHEL signaling functions in interregional communication during *Arabidopsis* ovule development. *Genes & Development*, 16:1129-1138.

Haecker A., Groß-Hardt R., Geiges B., Sarkar A., Breuninger H., Hermann M., and Laux T. (2003). Expresión dynamics of WOX genes mark cell fate decisions during early embryonic patterning in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 131:657:668.

Laux T., Mayer K. F., Bergen J., and Jürgens G. (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in *Arabidopsis*. *Development.*, 122:87-96.

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

Nagasaki H., Matsuoka M., and Sato Y. (2005). Members of TALE and WUS subfamilies of homeodomain proteins with potentially important functions in development form dimers within each subfamily in rice. *Genes Genet. Syst.*, **80**:261-267.

Xu Y. Y., Wang X. M., Li J., Li J. H., Wu J. S., Walker J. C., Xu Z. H. and Chong K. (2005). Activation of the WUS gene induces ectopic initiation of floral meristem on mature stem surface in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, **57**:773-784.

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

CAPITULO 5

PERSPECTIVAS

Este es el primer reporte de la expresión recombinante de WUSCHEL, esto puede permitir desarrollar estudios a nivel de localización celular y funcional de este factor de transcripción. Además, estudios con transcripción *in vitro* para determinar su función como un factor de transcripción y su interacción con otros factores transcripcionales.

Otros estudios de vital importancia para la investigación en WUS serían estudios a nivel de transducción de señales, determinando en que vías o cascadas involucradas porque este factor de transcripción posee más de una función en la diferenciación celular.

El modelo de sobre expresión de WUSCHEL puede ser de vital importancia para probarlo en futuros estudios con especies vegetales que no son eficientes en los protocolo de multiplicación *in vitro*, recalcitrantes.

ANEXO

Expresión y purificación de proteínas

Medio Luria-Bertani (LB)

Cloruro de sodio
Extracto de Levadura

Buffer de lisis

1µg/ml Lisozima
20mM Tris-HCl pH 7.8-7.9
500 mM KCl
2mM PMSF
20% de glicerol

Buffer BC100

10% glicerol
20mM Tris-HCl pH 8.3
1 mM EDTA pH 8.0
100 mM NaCl
200µl β-mercapto
4 mM de PMSF
0.01% Triton

Buffer de elusión

120mM Tris-HCl pH 7.9-7.8
400 mM KCl
1 mM PMSF
250 mM imidazol
10% glicierol

Preparación de gel de archilamida al 12%

Buffer de electroforesis 10X

250 mM trama base

1.91 M Glicina
1% SDS

Buffer de carga Laemmli 3X

4 ml de Tris-HCl 1.5 M, pH 6.8
12 ml de glicerol al 100%
4 ml de SDS al 30%
1m de azul de Bromofenol
Se ajusta a 20 ml con agua destilada.

Gel de separación

7.5-12 % Acrilamida
0.27 % de Bis-N metil-bis-acrilamida
0.043 % de persulfato de amonio
2.2 mM de TEMED

Gel de empaquetamiento

3.3 % de acrilamida
0.088% de Bis-N, mutilen-bis-acrilamida
0.1% de persulfato de amonio
0.1% de SDS
6.6 mM de TEMED