



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio del papel del ácido indol-3-acético y sus
conjugados durante la inducción de la
embriogénesis somática en *Coffea canephora***

Tesis que presenta

Benjamín Abraham Ayil Gutiérrez

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México, 2013



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.



Posgrado en Ciencias Biológicas



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado: Estudio del papel del AIA y sus conjugados durante la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente

Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota

Coordinador de Docencia

Mérida, Yucatán, México, noviembre de 2013



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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



Firma: _____

Nombre: Benjamín Abraham Ayil Gutiérrez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y forma parte del proyecto titulado Estudio del papel del ácido índol-3-acético y sus conjugados durante la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 157014).

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por dirigirme en esta etapa de mi formación académica, de aceptarme nuevamente en su grupo y poder seguir con la investigación.

Al Dr. Víctor Manuel Suárez Solís por su incansable revisión académica.

A la Dra. Nancy Santana Buzzy, por sus consejos y revisión en mi documento de investigación.

Al Dr. Felipe Vázquez Flota, por sus observaciones y apoyo académico.

Al Dr. Neftalí Ochoa Alejo, por su tiempo otorgado para revisiones y constantes viajes de tutoriales y exámenes.

Al Dr. Rafael Rojas Herrera por sus críticas y consejos para alcanzar metas en esta investigación.

A la Dra. Ileana Echevarría Machado por su apoyo académico.

Al Dr. Manuel Martínez Estevez por su revisión y apoyo académico.

A la Dra. Teresa Hernández Sotomayor por su interés y preocupación académica hoy en día de futuros investigadores.

A la Dra. Clelia de la Peña Seaman por sus consejos y apoyo académico.

A la M.C. Rosa María Galaz Avalos por el apoyo técnico y multidisciplinario en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

A la Dra. María Concepción Tamayo Ordoñez por la comprensión, apoyo técnico y académico en la investigación.

Al Licenciado en Biología Felipe Alonso Barredo Pool, en el apoyo técnico e incondicional, en diferentes técnicas de microscopía y enseñanza en fotografía.

Al M.C. Geovanny Nic Can por su apoyo técnico en el laboratorio.

Al M.C. Jorge F. Xool Tamayo por su apoyo técnico en Biología Molecular.

Al M.C. José Roberto Ku Cauich por su apoyo técnico en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.

A la M.C. Margarita de Lourdes Aguilar Espinosa, por su apoyo técnico en el HPLC.

Al CONACYT, por el apoyo económico otorgado durante la realización de esta investigación numero de becario (204929).

Al CICY como una valiosa Institución, y por permitirme hacer uso de sus instalaciones.

A todos mis compañeros de laboratorio por hacer más alegre el día.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a Guadalupe Antonia Gutiérrez González una persona admirable, aquella persona que es para mí y gran parte de la sociedad una persona de excelencia, distinguiéndose en sus labores profesionales. Una mujer que ha sido seleccionada para la reestructuración de instituciones desorganizadas y la formación de personal competente. Aquella persona dedicada e incansable y con vocación de vestir de blanco durante toda su vida. Aquella persona que ha luchado en la formación de personal de calidad, participado en la dirección de diferentes normas de calidad en el país. Y lo principal un ejemplo de madre y de padre.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN..... 1

BIBLIOGRAFÍA 3

CAPÍTULO I..... 5

ANTECEDENTES 5

1.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA 5

1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *COFFEA*..... 6

1.3. REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL 7

1.4. NIVELES DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO..... 10

1.5. BIOSÍNTESIS DE LAS AUXINAS..... 11

1.5.1. LAS RUTAS DE BIOSÍNTESIS DE AIA DEPENDIENTES DE TRIPTOFANO..... 11

1.5.2. LA RUTA INDEPENDIENTE DE TRIPTOFANO 13

1.6. AUXINAS CONJUGADAS..... 13

1.7. TRANSPORTE DE AUXINAS 15

1.8. SEÑALIZACIÓN 20

1.9. JUSTIFICACIÓN..... 25

1.10. HIPÓTESIS..... 25

1.11. OBJETIVO GENERAL 25

1.12. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 25

1.13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL 26

BIBLIOGRAFÍA	27
CAPÍTULO II	39
1“DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN DEL AIA Y DE ALGUNOS DE SUS CONJUGADOS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>COFFEEA CANEPHORA</i> ”	39
2.1. INTRODUCCIÓN.....	39
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	41
2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO.....	41
2.2.2. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	41
2.3. EXTRACCIÓN DE AUXINAS Y SUS CONJUGADOS	41
2.4. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC).....	42
2.5. ANÁLISIS DE LAS SECUENCIAS Y DISEÑO DE LOS CEBADORES	43
2.5.1. EXTRACCIÓN DE ARN	44
2.5.2. PCR CUANTITATIVO	44
2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	45
2.7. RESULTADOS	45
2.7.1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>COFFEEA CANEPHORA</i>	45
2.7.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA DETECCIÓN DE AUXINAS POR HPLC	46
2.7.3. DETERMINACIÓN DE LAS AUXINAS LIBRES Y SUS CONJUGADOS	50
2.7.4. DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES INVOLUCRADOS EN LA HOMEOSTASIS DEL AIA.....	54

2.8. DISCUSIÓN.....	57
BIBLIOGRAFÍA	62
CAPÍTULO III	66
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	66
BIBLIOGRAFÍA	69
ANEXOS	70
ANEXO 1.1.....	70
1.2 SÍNTESIS DE CONJUGADOS DEL ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO	70
1.2.1. ÁCIDO INDOL-3-ACETIL-L-ALANINA	70
1.2.2. ÁCIDO INDOL-3-ACETIL-L-GLUTÁMICO	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Auxinas naturales (A) y sintéticas (B)..... 8

Figura 1.2 Rutas descritas para el metabolismo de las auxinas..... 12

Figura 1.3 Estructura de algunos de los conjugados de las auxinas. 15

Figura 1.4 Transporte de auxinas a través del plasmalema.. 17

Figura 1.5 Distribución del flujo de auxinas y localización de los transportadores de auxinas en la embriogénesis cigótica..... 20

Figura 1.6 Representación esquemática del proceso de ubiquitinación. 22

Figura 1.7 Modelo para la señalización de las auxinas en las células vegetales..... 24

Figura 2.1 Inducción de la embriogénesis somática en *C. canephora*..... 46

Figura 2.2 Germinación de los embriones somáticos..... 46

Figura 2.3 Separación y detección de los reguladores del crecimiento AIA, AIB y ANA... 47

Figura 2.4 Cromatograma de la extracción del AIA en el tejido foliar de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*..... 48

Figura 2.5 Espectrometría de masas de la molécula de AIA..... 48

Figura 2.6 Relación entre área bajo el pico y cantidad de tejido foliar de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*..... 48

Figura 2.7 Cromatograma en el que se muestra la separación de los estándares de AIA-Glu, AIA-Asp, AIA-Ala.. 50

Figura 2.8 Patrón de fraccionamiento de la molécula de AIA-Glu.. 50

Figura 2.9 Contenido endógeno de auxinas libres antes y durante la inducción de la ES en

C. canephora 52

Figura 2.10 Contenido de AIA y sus conjugados, antes y durante la inducción de la ES en *C. canephora* 54

Figura 2.11 Análisis qPCR para la expresión de los genes *CcTAA1*, *CcYUC1* y *CcYUC3* 55

Figura 2.12 Análisis qPCR para la expresión de los genes *CcGH3.1*, *CcGH3.6* y *CcGH3.17* 56

Figura 3.1 Modelo propuesto sobre la participación de las auxinas y sus conjugados durante el proceso de pre-acondicionamiento e inducción de la ES en *C. canephora*. 67

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Genes que participan en cuatro rutas dependientes de triptofano.....19
Cuadro 2.1 Cebadores diseñados para el estudio de la expresión de los diferentes genes
estudiados.....44

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ABA	Ácido abscísico
ABP	Proteínas de unión a auxina
AFP	Auxin signaling F-box
AIA	Ácido indol-3-acético
AIA-Ala	Ácido indol-3-acético alanina
AIA-Glu	Ácido indol-3-acético glutámico
AIA-Id	Indol-3-acetaldehido
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalén acético
ARF	Factores de transcripción de respuesta a auxinas
aux/AIA	Auxina/AIA
BA	Benciladenina
BHT	Hidroxitolueno butilado
ES	Embriogénesis somática
GH3	GRETCHEN HAGEN
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HTAM	<i>N</i> -hidroxitriptamina
IAM	Indolacetamida
IPyA	Ácido indol-3-pirúvico
KIN	Kinetina
oxAIA	Indol-3-acetaldoxima
PF	Peso fresco

PGP	Fosfogluco proteína
PIN	PIN FORMED
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal
TAA1	TRIPTOPHAN AMINOTRANSFERASE
TAM	Triptamina
Ub	Ubiquitina
YUC	YUCCA
CcYUC	<i>Coffea canephora</i> YUCCA
CcGH3	<i>Coffea canephora</i> GRETCHEN HAGEN

RESUMEN

Las auxinas son reguladores del crecimiento vegetal que participan en diversas etapas del desarrollo. Para que se establezca en la célula la polaridad que dará origen al embrión, debe producirse un gradiente de ácido indol-3-acético (AIA). En este estudio se utilizó el sistema embriogénico de *Coffea canephora* para analizar el papel de las auxinas y sus conjugados durante el pre-acondicionamiento de los explantes y la inducción de la embriogénesis somática. Para ello, se estudió la dinámica en la concentración de tres auxinas: los ácidos indol-3-acético, indol-3-butírico, naftalén acético y dos conjugados del ácido indol-3-acético, el AIA-Ala y el AIA-Glu durante el periodo de pre-acondicionamiento de los explantes y durante la inducción de la embriogénesis somática (ES). Además, se determinaron los diferentes cambios morfológicos que dan lugar al inicio del proceso embriogénico en los explantes de *C. canephora*. Se determinó que la presencia de una auxina exógena provoca un aumento en la concentración de los reguladores del crecimiento endógenos, así como en la de sus conjugados durante el pre-acondicionamiento de los explantes. Durante la fase de inducción de la ES la concentración de las auxinas libres, así como la de sus conjugados disminuyó rápidamente. Esta dinámica, de aumento y disminución de auxinas, se vio acompañada del aumento en la expresión de varios de los genes que codifican para algunas de las enzimas involucradas en la homeostasis de las auxinas durante la inducción de la ES.

ABSTRACT

Auxins are plant growth regulators involved in various stages of development. In order to establish the cell polarity that give rise to the embryo, a gradient of 3-indolylacetic acid (IAA) need to be established. In this study, a *C. canephora* embryogenic system was used in order to investigate the role of auxins and their conjugates during the preconditioning of plants and the induction of the somatic embryogenesis (SE) was studied. For this, I studied the dynamic in the concentration of three auxins: indoleacetic acid, indolebutyric acid, and naphthalene acetic acid, and two conjugates of the IAA, IAA-Ala and IAA-Glu, during the preconditioning period and the induction of the SE. In addition, determinations of the different morphological changes that lead to the start of the embryogenic process were made on *C. canephora* explants. It was determined that the presence of an exogenous auxin induces an increase in the concentration of the endogenous auxins, as well as of its conjugates during the preconditioning of the plants used as the source of explants. During the induction phase of the SE, the concentration of the free auxins, as well as their conjugates, significantly decreased. This dynamics of auxins, was accompanied by an increment in the expression of several genes coding for some of the enzymes involved in the auxin homeostasis during the induction of the SE process.

INTRODUCCIÓN

La plasticidad de una planta y su capacidad de respuesta a diferentes condiciones medio ambientales sugieren que existen mecanismos reguladores complejos que la controlan. Se conocen sustancias que regulan este tipo de cambios en las plantas, y se les ha denominado “reguladores del crecimiento vegetal (RCV)”; estas sustancias, de tipo orgánico, actúan a muy bajas concentraciones (Davies, 1995). Su presencia se encuentra relacionada con los procesos de crecimiento, diferenciación y reprogramación celular. Es evidente que la localización intracelular de las enzimas e intermediarios que intervienen en el desarrollo de una planta son puntos potenciales para su regulación (Bartel et al., 2001). Un importante nivel de regulación es la distribución y síntesis de los RCV, así como su localización en los tejidos y células (Cheng et al., 2006; Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008).

La embriogénesis somática (ES) ha sido utilizada como modelo experimental para el estudio del desarrollo de plantas superiores, principalmente por la posibilidad de manipulación que permite un sistema *in vitro*; otra ventaja es que se asemeja a la embriogénesis cigótica (Zimmerman, 1993). En diferentes especies la eliminación o disminución de RCV, como las auxinas, activan el proceso embriogénico (Michalczuk et al., 1992a; Michalczuk et al., 1992b; Schiavone y Cooke, 1987), lo que llevó a la hipótesis de que las auxinas desempeñan un papel muy importante, tanto en el origen embrionario de las células, como en la subsecuente morfogénesis del embrión (Petrasek y Friml, 2009).

En la inducción de la ES, el tipo de explante, el medio de cultivo, las condiciones de luz, así como un pre-acondicionamiento con RCV son importantes para obtener una mejor respuesta en el número de embriones (Quiroz-Figueroa et al., 2002a; 2002b; 2006b). La presencia de auxinas exógenas juegan un papel importante en el proceso embriogénico y parece depender de la naturaleza del tejido o explante utilizado, como hipocotilos (López-Puc et al., 2006), suspensiones celulares (Nomura y Komamine, 1985) y explantes de tejido foliar (Quiroz-Figueroa et al., 2002a; 2002b; 2006a). Algunas especies vegetales requieren la presencia de una auxina exógena durante un predeterminado tiempo para que el tejido pueda ser competente y dar inicio el proceso embriogénico; aún no está clara

cuál es la función de este pretratamiento. En líneas celulares de zanahoria se ha observado que en presencia de auxinas exógenas, las células son capaces de desarrollarse hasta el estadio globular, pero no más allá si los cultivos continúan en presencia de auxinas. Esta observación sugiere que para que se lleve a cabo la transición del embrión globular al estadio corazón se requieren el producto ó los productos de genes que son inducidos únicamente cuando las auxinas son removidas del medio de cultivo (Borkird et al., 1986; Halperin y Wetherell, 1965).

Una vez que se induce la ES se dan cambios en la homeostasis de las auxinas en los nuevos embriones, entre otros, comienzan a sintetizar su propia auxina (Michalczuk et al., 1992a; Michalczuk et al., 1992b). Sin embargo, existe poca información de las concentraciones o de los niveles endógenos de RCV que se requieren para que se inicie la morfogénesis y el desarrollo de una planta (Uggla et al., 1996). Por otro lado, se tiene evidencia que muestra que el transporte polar de las auxinas es una condición indispensable para que se lleve a cabo la morfogénesis (Liu et al., 1993; Schiavone y Cooke, 1987), y que transportadores de la familia PIN se encuentran asociados con este flujo de auxinas (Scarpella y Helariutta, 2010). También existe evidencia de que los transportadores PIN están involucrados en la embriogénesis cigótica, ya que provocan la acumulación diferencial de auxinas en determinadas células del embrión (Petrasek y Friml, 2009; Steward et al., 1958; Von Arnold et al., 2002). De la misma manera se ha demostrado que las auxinas participan en el ámbito molecular, pues son responsables de la inducción de diferentes genes que participan en la ES (Gray, 2004).

En nuestro laboratorio contamos con un modelo de ES a partir de tejido foliar de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro* con una muy buena respuesta embriogénica, en el que se obtienen estructuras embrionarias bien definidas y las cuales se desarrollan hasta una planta completa con una eficiencia del cien por ciento.

En este trabajo se propone dar seguimiento a la dinámica en los niveles de las auxinas libres, ácido índol-3-acético (AIA), ácido índol-3-butírico (AIB), ácido naftalén acético (ANA), y los conjugados del ácido índol-3-acético-L-alanina (AIA-Ala), y ácido índol-3-acético-glutámico (AIA-Glu), así como a algunos de los genes involucrados en la biosíntesis y conjugación del AIA.

BIBLIOGRAFÍA

- Bartel B., S. LeClere, M. Magidin y B. K. Zolman (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation, *J. Plant Growth Regulation.*, 20: 198-216.
- Borkird C., J. H. Choi y Z. R. Sung (1986). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot, *Plant Physiol.*, 81: 1143-1146.
- Cheng Y., X. Dai y Y. Zhao (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*, *Genes & Development*, 20: 1790-1799.
- Davies P. J (1995). *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp 1-833.
- Gray W. M. (2004). Hormonal regulation of plant growth and development, *Plos Biol.*, 2: e311.
- Halperin W. y D. F. Wetherell (1965). Ontogeny of adventive embryos of wild carrot, *Science*, 147: 756-758.
- Liu C.-M., Z.-H. Xu y N.-H. Chua (1993). Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis, *Plant Cell*, 5: 621-630.
- López-Puc G., A. Canto-Flick, F. A. Barredo-Pool, P. Y. Zapata-Castillo, M. C. Montalvo-Peniche, F. Barahona-Perez y N. Santana-Buzzy (2006). Direct somatic embryogenesis: a highly efficient protocol for *in vitro* regeneration of Habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.), *HortScience*, 41: 1645-1650.
- Michalczuk L., T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992a). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis, *Phytochemistry*, 31: 1097-1103.
- Michalczuk L., D. M. Ribnicky, T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992b). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures, *Plant Physiol.*, 100: 1346-1353.
- Nomura K. y A. Komamine (1985). Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture, *Plant Physiol.*, 79: 988-991.
- Petrasek J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development, *Development*, 136: 2675-2688.
- Quiroz-Figueroa F. R., S. C. Kú-Rodríguez y V. M. Loyola-Vargas (2002a). Patrón protéico extracelular durante la embriogénesis somática en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L., *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 46: 259-263.

- Quiroz-Figueroa F. R., M. Méndez-Zeel, F. Sánchez-Teyer, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002b). Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* L., *J. mjjm* ., 159: 1267-1270.
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006a). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: Plant cell culture protocols, (Loyola-Vargas V. M. y F. A. Vázquez-Flota, eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117.
- Quiroz-Figueroa F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006b). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*., 86: 285-301.
- Scarpella E. y Y. Helariutta (2010). Vascular pattern formation in plants, *Current Topics in Developmental Biology*, 91: 221-265, (2010).
- Schiavone F. M. y T. J. Cooke (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors, *Cell Differentiation*, 21: 53-62.
- Stepanova A. N., J. Robertson-Hoyt, J. Yun, L. M. Benavente, D. Y. Xie, K. Dolezal, A. Schlereth, G. Jürgens y J. M. Alonso (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development, *Cell*, 133: 177-191.
- Steward F. C., M. O. Mapes y K. Mears (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells, *Am. J. Bot.*, 45: 705-708.
- Tao Y., J. L. Ferrer, K. Ljung, F. Pojer, F. Hong, J. A. Long, L. Li, J. E. Moreno, M. E. Bowman, L. J. Ivans, Y. Cheng, J. Lim, Y. Zhao, C. L. Ballaré, G. Sandberg, J. P. Noel y J. Chory (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants, *Cell*, 133: 164-176.
- Ugglå C., T. Moritz, G. Sandberg y B. Sundberg (1996). Auxin as a positional signal in pattern formation in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93: 9282-9286.
- Von Arnold S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 69: 233-249.
- Zimmerman J. L (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, *Plant Cell*, 5: 1411-1423.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Los primeros reportes en los que se menciona el proceso de ES se publicaron a finales de los años 50s en cultivos de *Daucus carota* (Reinert, 1959; Steward et al., 1958) y *Oenanthe aquatica* (Waris, 1957; Krikorian y Simola, 1999). En la especie *C. canephora* la ES fue reportada por primera vez por Staritsky (1970) y describió la producción de embriones somáticos a partir de tejido no diferenciado. Más tarde, Hatanaka et al. (1991) obtuvieron ES directa en tejido foliar de *C. canephora*. Con el tiempo se ha obtenido ES en diversos tejidos de especies en café y se han evaluado diferentes protocolos para mejorar la eficiencia de la inducción de la ES (Fuentes-Cerda et al., 2001; Quiroz-Figueroa et al., 2006; Steinmacher et al., 2007; Sun et al., 2006).

Por otro lado, zanahoria (*D. carota*) ha sido el modelo más utilizado para el estudio de la ES, entre otras características debido a su rápida y eficiente respuesta a la inducción de ésta (Goldberg et al., 1994). Diferentes autores definen la ES como el proceso a través del cual las células somáticas, bajo condiciones de inducción, sufren cambios bioquímicos, moleculares y morfológicos obteniendo como resultado la formación de un embrión somático (Komamine et al., 2005; Schmidt et al., 1997; Zimmerman, 1993).

Anatómicamente, la ES se origina a través de una de dos vías: unicelular o multicelular (Raghavan, 1976), y la capacidad de regeneración depende del tipo de especie (Priyono et al., 2010; Samson et al., 2006), factores como la ausencia/presencia y concentración de reguladores del crecimiento, la densidad celular, el medio de cultivo y la frecuencia de renovación de éste (Fuentes et al., 2000; Fuentes-Cerda et al., 2001; Zamarripa et al., 1991), además de factores genéticos. La ES permite una mejor manipulación del sistema, haciendo más fácil el estudio de los diferentes procesos morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Komamine, 1992; Schmidt et al., 1997; Zimmerman, 1993).

1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL GÉNERO *COFFEA*

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán diferentes trabajos han sido realizados para el entendimiento y mejoramiento del proceso embriogénico en el género *Coffea*, en algunos se han realizado modificaciones en el medio de cultivo, analizando el efecto de diferentes concentraciones de la fuente nitrogenada (Fuentes-Cerda et al., 2001) y la adición de salicilatos (Quiroz-Figueroa et al., 2001). En otros trabajos se observó que reguladores de crecimiento como benciladenina (BA) son necesarios para que se lleve a cabo la respuesta embriogénica en explantes foliares de *C. canephora* (Quiroz-Figueroa et al., 2002a). Por otra parte en estudios comparativos en masas embriogénicas y no embriogénicas, se determinó que existen diferencias tanto anatómicas así como en proteínas específicas en cada grupo de células (Quiroz-Figueroa et al., 2002c). En otro estudio de proteínas extracelulares liberadas en el medio de cultivo en suspensiones celulares de *C. arabica*, se determinó la presencia de proteínas constitutivas y de proteínas específicas durante el proceso embriogénico (Mukul-López et al., 2012; Quiroz-Figueroa et al., 2002b). Estas diferencias pueden deberse a la presencia o ausencia de sustancias en el medio, así como de otros compuestos producidos por el explante (Nic et al., sometido). También se han utilizado técnicas de despliegue diferencial para el análisis de la expresión de genes que podrían estar involucrados en el proceso embriogénico, tanto en explantes de tejido foliar como en suspensiones celulares de *Coffea* (Rojas-Herrera y Loyola-Vargas, 2002). Estos experimentos han permitido determinar que hay una similitud en la expresión de algunas proteínas entre *Coffea* y algunas otras especies. Entre estas están proteínas oxigenasa, fosfoglicerato cinasa, ubiquitina, proteínas de choque térmico, un factor de ribosilación ADP, así como actividad quitinolítica. Estos resultados probablemente reflejan las condiciones adecuadas para dar inicio del proceso embriogénico (Rojas-Herrera y Loyola-Vargas, 2002).

En la realización de diferentes experimentos para mantener las condiciones de reproducibilidad y alta eficiencia en la producción de embriones somáticos a partir de explantes foliares de plantas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*. Se ha confirmado que la respuesta embriogénica depende, tanto de la cantidad de luz como de la presencia de BA. El sistema produce alrededor de 150 embriones somáticos en condiciones de oscuridad, 59 embriones en condiciones de fotoperiodo y 27 en presencia de luz continua, por explante. También se ha determinado que las plantas cultivadas *in vitro*

requieren un pre-acondicionamiento de 14 días en un medio que contiene ANA 0.54 μM y KIN 2.32 μM (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Por otra parte en el estudio de la expresión ectópica de algunos genes involucrados en el desarrollo de los embriones somáticos, como *Wuschel*, causa un incremento de la respuesta embriogénica de los tejidos transformados (Arroyo-Herrera et al., 2008).

Diferentes estrategias experimentales han sido elucidadas para entendimiento del proceso embriogénico; sin embargo, aún existen elementos claves que no han sido documentados, en particular el papel de los RCV y sus niveles endógenos durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES. Estas sustancias son un punto clave para dar inicio a la respuesta embriogénica en prácticamente todas las especies en las que se ha obtenido ES (Rossin y Rey, 2011; Sharma et al., 2008; Vondrakova et al., 2011).

1.3. REGULADORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

Las plantas utilizan diversos compuestos en respuesta a las señales que reciben desde el exterior, así como de otros tejidos. Estos compuestos reciben el nombre de RCV. Hoy en día se acepta que hay once grupos de RCV (Jones et al., 2013). Estos grupos son los siguientes: auxinas, citocininas, giberelinas, brasinoesteroides, salicilatos, jasmonatos, poliaminas, estrigolactonas, etileno, ácido abscísico (ABA) y óxido nítrico. Una característica muy importante que se ha descubierto en este tipo de compuestos, es que interactúan entre ellos formando una compleja red de activación-inactivación. La inducción de la ES depende de la presencia de varios RCV; sin embargo, es claro que las auxinas tienen el papel más importante en este proceso. Las auxinas fueron descubiertas cuando se determinó que eran las sustancias causantes del crecimiento diferencial de los tallos en respuesta a un estímulo de luz (Went, 1935). Un aspecto importante sobre las auxinas es que a pesar de su importancia, hasta la fecha no se ha establecido, de forma completa, su ruta de biosíntesis y permanece como un blanco elusivo para los biólogos vegetales (Komamine et al., 2005; Schmidt et al., 1997; Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010; Zimmerman, 1993). Existen dos grandes grupos de auxinas: las naturales y las sintéticas (Korasick et al., 2013) (Figura 1.1).

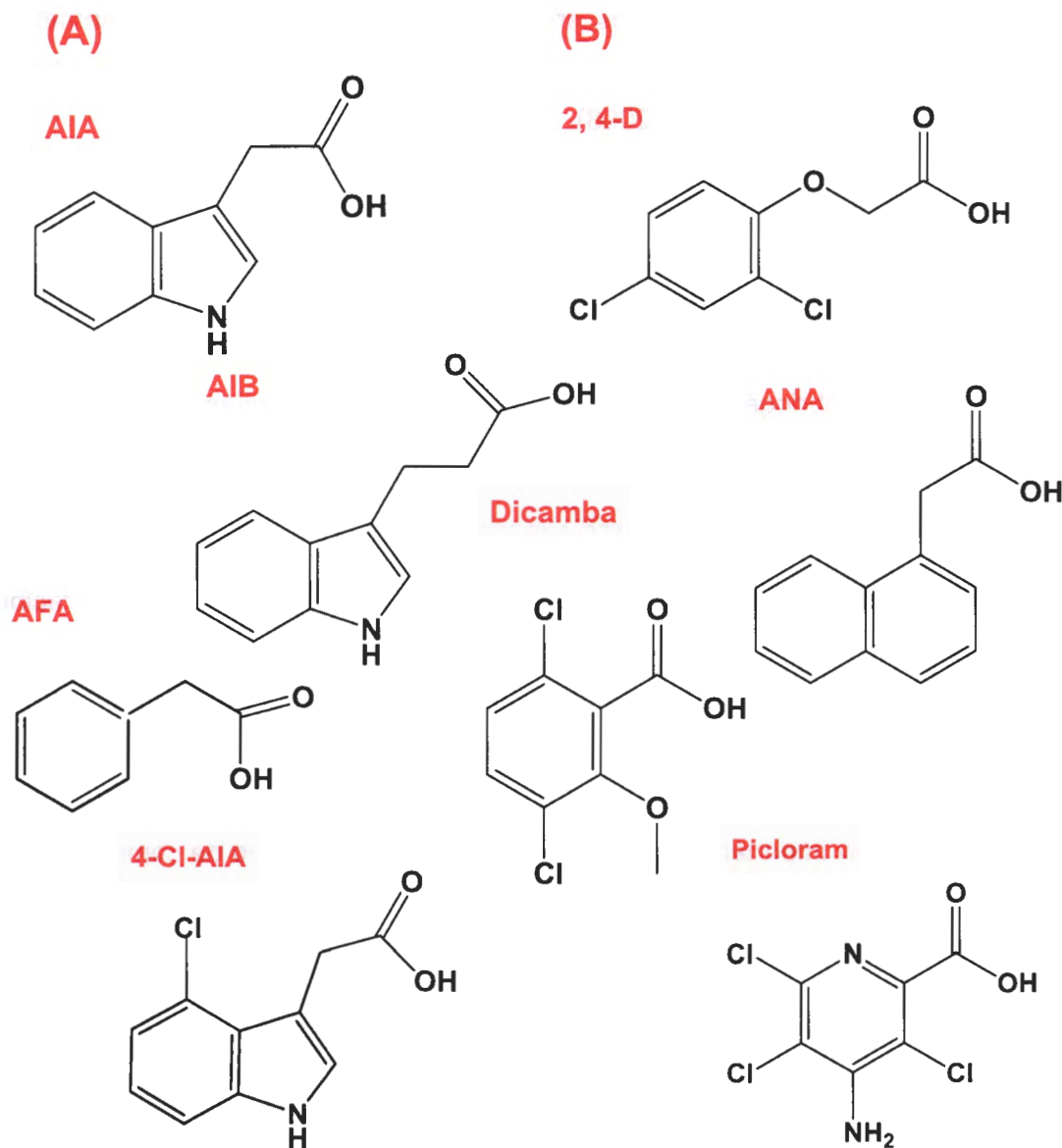


Figura 1.1 Auxinas naturales (A) y sintéticas (B). AIA = ácido-3-indol acético; AIB = ácido-3-indol butírico; 4-Cl-AIA = ácido 4-cloroindol acético; AFA = ácido fenilacético; 2,4-D = ácido 2,4-diclorofenoxi acético; ANA = ácido 1-naftalén acético; dicamba = ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico; picloram = ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.

La característica más relevante de la estructura de las auxinas es la presencia de un anillo aromático y de un grupo con carga negativa situado alrededor de 5.7 angströms del centro del anillo aromático. El AIA es la auxina más abundante y fue la primera en ser descubierta en plantas superiores. Las plantas utilizan varios mecanismos que regulan los niveles de auxinas; entre ellos se encuentran su síntesis, su transporte, su degradación y su conjugación (Bartel, 1997; Bartel et al., 2001; Ljung et al., 2002).

La forma biológicamente activa es el AIA libre. Durante su homeostasis se puede conjugar con diferentes moléculas (Ljung et al., 2002; Staswick et al., 2005). También puede dar origen al AIB. El AIB no fue considerado por mucho tiempo como una auxina natural; Sin embargo, actualmente hay evidencia que muestra que está presente en especies como *Arabidopsis thaliana* (Ludwig-Müller y Epstein, 1991; Ludwig-Müller y Epstein, 1993), zanahoria (Epstein et al., 1991), tabaco (Sutter y Cohen, 1992) y maíz (Ludwig-Müller y Epstein, 1991).

Los niveles endógenos de RCV determinan el efecto fisiológico. Sin embargo, en muy pocos trabajos se han determinado los niveles de auxinas endógenas. Por ejemplo, en hojas de tabaco se han encontrado concentraciones de 9 ng g^{-1} de peso fresco (PF) de AIB libre, mientras que los niveles de AIA libre son del orden de 26 ng g^{-1} de PF (Sutter y Cohen, 1992). Es claro que este campo de la fisiología vegetal es complejo y que este tipo de determinaciones dependen de factores tales como las condiciones de crecimiento y de las especies en estudio (Ludwig-Müller y Epstein, 1993; Yang y Davies, 1999).

En el caso del cultivo de células vegetales cultivadas *in vitro*, un factor adicional que debe tomarse en cuenta es la presencia de RCV en el medio. Por ejemplo, en brotes de *Pisum sativum*, la adición de AIB causa un aumento en los niveles endógenos de AIA durante los primeros días de cultivo; cuatro días después los niveles del AIA retornan a su nivel inicial (Nordstrom et al., 1991). En diferentes trabajos se sugiere que el AIB puede actuar sinérgicamente con el AIA (Van der Krieken et al., 1992; 1993). La β -oxidación del AIA, además de la biosíntesis *de novo*, el transporte y la hidrólisis de conjugados contribuye a la poza de AIA libre. La formación e hidrólisis de conjugados de AIB puede también ser importante para la homeostasis de la poza de auxinas (Bartel et al., 2001).

Además de la concentración absoluta de los RCV, la relación entre ellos es el otro factor que debe tomarse en cuenta al momento de analizar un fenómeno biológico en particular. La primera relación entre RCV fue entre una auxina y una citocinina (Steward y Caplin, 1951).

1.4. NIVELES DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO

En la actualidad se sabe que los RCV de tipo exógeno son necesarios para el establecimiento de los cultivos *in vitro*. Sin embargo, se ha observado que no únicamente las auxinas exógenas son importantes en el establecimiento de la ES, sino que también los cambios en la concentración de las auxinas endógenas pueden ser un punto crítico para que se lleve a cabo la diferenciación (Schivavone y Cooke, 1987). En un estudio llevado a cabo en *D. carota* se ha observado que la presencia del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es necesaria para el mantenimiento de las suspensiones celulares. La eliminación de este RCV, junto con la dilución de las células, induce el proceso embriogénico en zanahoria. En este sistema se ha observado que cuando se elimina al 2,4-D, la concentración endógena del AIA libre aumenta en los primeros días de la inducción de la ES y disminuye conforme avanza el desarrollo de los embriones. En una línea no embriogénica la concentración del RCV natural se mantiene constante durante todo el ciclo de cultivo (Michalczuk et al., 1992).

En líneas celulares de *Medicago falcata*, con capacidad embriogénica rápida, se determinó que existe una correlación positiva entre la respuesta embriogénica y el elevado contenido de AIA libre de los explantes iniciales. Es posible que los niveles endógenos de RCV sean importantes en el origen del potencial embriogénico de los tejidos y pueden estar relacionados con la respuesta específica de los diferentes genotipos y de las diferentes condiciones de inducción de este importante proceso biológico (Ivanova et al., 1994). La adición del AIA, 2,4-D o de ANA a hipocotilos de *D. carota* muestra que estos compuestos entran de manera importante en las células durante la primera semana y posteriormente, durante la cuarta semana, disminuyen. La presencia de 2,4-D provoca un aumento en la concentración de las auxinas endógenas, lo que puede ser un punto clave para adquirir competencia celular; posteriormente se requiere que la concentración del AIA libre disminuya para que se lleve a cabo el

desarrollo de los embriones somáticos (Ribnicky et al., 1996). En líneas celulares del género *Larix* se observó que el 2,4-D y la BA entran en el tejido en forma diferencial y que la capacidad embriogénica depende de la toma de dichos RCV (Jourdain et al., 1997).

1.5. BIOSÍNTESIS DE LAS AUXINAS

Actualmente se conocen cinco rutas para la biosíntesis del AIA: cuatro dependientes de triptofano y una independiente de este aminoácido (Figura 1.2) (Korasick et al., 2013; Tao et al., 2008; Tromas y Perrot-Rechenmann, 2010; Zhao, 2008).

1.5.1. Las rutas de biosíntesis de AIA dependientes de triptofano

Actualmente se han caracterizado cuatro diferentes rutas de biosíntesis que usan triptofano como la molécula inicial (Figura 1.2). En cada una de éstas hay varios intermediarios. En la primera de ellas participa como intermediario la indolacetamida (IAM), la cual es transformada a AIA por medio de una amidohidrolasa. En otra de las rutas, el triptofano es transformado en ácido indol-3-pirúvico (IPyA) por una aminotransferasa y posteriormente una descarboxilasa transforma al IPyA en indol-3-acetaldehído (AIAld), el cual es convertido en AIA por una indol-3-acetaldehído oxidasa.

En una tercera ruta, el triptofano es convertido en triptamina (TAM) por medio de la triptofano descarboxilasa; a continuación, las proteínas producto de los genes *YUCCA* (*YUC*) actúan en la conversión de la TAM a *N*-hidroxilriptamina (HTAM) y posteriormente a AIA (Sugawara et al., 2009; Woodward y Bartel, 2005).

La cuarta y última ruta involucra la conversión del triptofano en indol-3-acetaldoxima (oxAIA) por los citocromos P450 (CYP79B2/CYP79B3). oxAIA es entonces convertido en indol-3-acetonitrilo (IAN), el cual es finalmente convertido a AIA por las nitrilasas (Bartel y Fink, 1994).

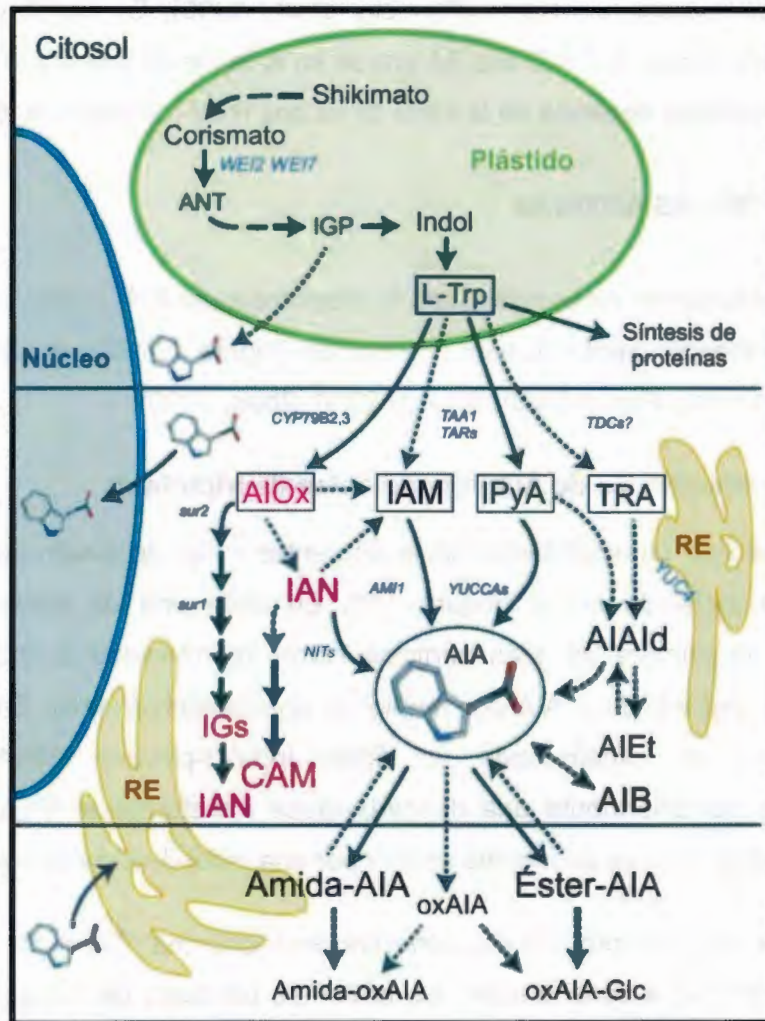


Figura 1.2 Rutas descritas para el metabolismo de las auxinas. La biosíntesis de los precursores de las auxinas, tales como IGP y Trp se lleva a cabo en los plástidos. El Trp se sintetiza en la ruta del shikimato. Se cree que la biosíntesis del AIA dependiente de Trp se lleva a cabo en el citoplasma. Se muestran las cuatro rutas de biosíntesis del AIA dependiente de Trp: las rutas AIOx, AIM, IPyA y TRA. Las enzimas conocidas en cada ruta son mostradas en azul. Los intermediarios que también actúan como precursores y productos de degradación de compuestos de defensa (tales como los IGs y CAM) están en rojo. Rutas para la degradación y conjugación del AIA. El AIA se puede conjugar con aminoácidos y azúcares o ser degradado para formar AIAox. Algunos conjugados del AIA pueden ser almacenados y más tarde pueden ser hidrolizados para formar AIA libre. Las flechas sólidas indican rutas en las cuales las enzimas, genes e intermediarios se conocen, y las flechas punteadas indican rutas que no están bien definidas. ANT = antranilato; CAM = camalexina; IGP = indol-3-glicerol fosfato; Trp = triptofano; IAM = indolacetamida; IPyA = ácido indol-3-pirúvico; AIAld = indol-3-acetaldehído; TAM = triptamina; HTAM = *N*-hidroxiltriptamina; oxAIA = ácido 2-oxoindol-3-acético; IAN = indol-3-acetonitrilo; IBA = ácido indolbutírico; IGs = indol glucosinolato; NITs = nitrilasas; TDCs = triptofano decarboxilasas; TRA = triptamina. Redibujado de Ljung (2013).

Actualmente, en diversas especies vegetales y microorganismos se ha determinado una gran cantidad de genes relacionados con la biosíntesis del AIA (Korasick et al., 2013; Mano y Nemoto, 2012; Normanly, 2010; Simon y Petrásek, 2011; Zhao, 2010). Cada uno de los genes descritos hasta ahora en las cuatro vías dependientes de triptofano, se enlistan en el Cuadro 1.1.

1.5.2. La ruta independiente de triptofano

La evidencia actual sugiere que existe una ruta de biosíntesis del AIA que es independiente de triptofano. La principal evidencia proviene del descubrimiento de que mutantes, tanto de *Arabidopsis* como de maíz, que no producen triptofano, por tener dañada la triptofano sintasa (Last et al., 1991; Radwanski et al., 1996), pueden acumular AIA. Así mismo, en dichas mutantes se puede sintetizar AIA a partir de precursores del triptofano, como el IGP o el indol (Ouyang et al., 2000). Poco se conoce sobre los potenciales intermediarios de esta vía y no se ha identificado ninguno de los genes involucrados en ella.

1.6. AUXINAS CONJUGADAS

El AIA de una manera libre actúa como una molécula señal (Santner et al., 2009) y su modificación por reacciones de conjugación son en general mecanismos de regulación y estabilización del AIA (Cohen y Bandursky, 1982). Entre los compuestos con los que se puede conjugar se encuentran azúcares, aminoácidos y péptidos (Bialek y Cohen, 1986; Cohen y Bandursky, 1982). La conjugación, así como el transporte polar, son algunos de los factores más importantes que controlan los niveles de auxina libre (Bajguz y Piotrowska, 2009; Benjamins y Scheres, 2008; Petrsek y Friml, 2009).

Desde hace tiempo se sabe que la adición de una auxina exógena en el medio de cultivo produce un aumento en las auxinas endógenas (Andreae y Good; 1955). El tratamiento de raíces escindidas de *P. sativum* produce un aumento en la poza interna del AIA, así como en la concentración del conjugado *N*-(3-indolacetil)-*D/L*-ácido aspártico (Davies, 1972). El AIA-Asp también se ha encontrado en segmentos en elongación de *Phaseolus vulgaris* incubados con AIA en la luz (Davies, 1972). No sólo las auxinas naturales adicionadas en forma exógena pueden inducir la acumulación endógena de estas y sus conjugados, sino también las auxinas sintéticas; por ejemplo, el ANA produce

un aumento en el ácido naftilacetilaspártico en epicotilos de *P. sativum* (Zenk et al., 1962). A pesar del requerimiento de auxina exógena para mantener el crecimiento de las células cultivadas *in vitro*, estas células producen cantidades sustanciales de AIA endógeno (Fujimura y Komamine, 1979; Moloney et al., 1983). Sin embargo, el 2,4-D y el ANA tienen efectos menores en la concentración endógena en suspensiones celulares de *D. carota*; el ANA se encontró principalmente en forma conjugada (Ribnicky et al., 1996).

Las auxinas conjugadas se catalogan en aquellas que se unen con moléculas de sacarosa (enlace éster). Auxinas conjugadas con aminoácidos (enlace amida) y auxinas que se encuentran conjugadas con péptidos o proteínas (enlace amida) (Bajguz y Piotrowska, 2009; Ludwig-Müller, 2011). El AIA puede formar conjugados con los aminoácidos como, aspártico, glutámico, alanina, glicina, valina y leucina (Figura 1.3). Los conjugados AIA-Ala y AIA-Leu, pueden liberar AIA durante el proceso de homeostasis del AIA. También existen conjugados como los de AIA-Glu y AIA-Asp que canalizan al AIA a su degradación (Ostin et al., 1998).

La biosíntesis de los conjugados del AIA está relacionada con la presencia de enzimas amido sintetetasas. Estas enzimas son codificadas por genes que pertenecen a la familia *GRETCHEN HAGEN 3* (GH3) (Wang et al., 2008; Chen et al., 2010). Esta familia fue identificada originalmente como respuesta a la presencia de auxinas en *Glicine max* (Hagen et al., 1984) y desde entonces se han identificado estos genes en diferentes especies vegetales (Okrent y Wildermuth, 2011). El número de miembros entre las diferentes especies varía desde diecinueve en *A. thaliana* (Wang et al., 2008), hasta seis en *Carica papaya* (Okrent y Wildermuth, 2011). Esta familia ha sido dividida en tres grupos, dependiendo del sustrato que use la enzima (Staswick et al., 2002; Terol et al., 2006). El grupo I contiene a los genes que codifican a enzimas que usan como sustrato ácido jasmónico; el grupo II comprende enzimas activas con AIA y el grupo III comprende enzimas que no usan ninguno de estos dos sustratos.

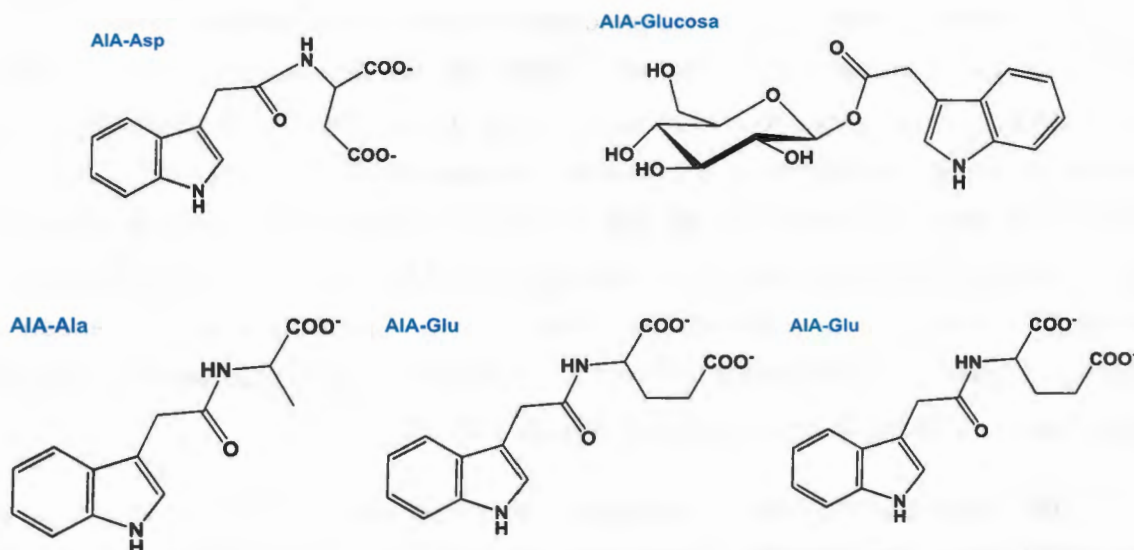


Figura 1.3 Estructura de algunos de los conjugados de las auxinas.

Se estima que los conjugados del AIA constituyen entre el 90-98% en *Arabidopsis* (Normanly et al., 1993). La incubación de raíces, hojas y brotes de *Arabidopsis* con AIA 500 μ M promueve la formación de conjugados, entre los que se encuentran: AIA-Asp, AIA-Glu, AIA-Gln, AIA-Glucosa (AIA-Gluc) (Barratt et al., 1999). En *Helleborus niger* se ha estudiado el perfil de las auxinas durante la pre-antesis, antesis y post-antesis, y se han identificado siete conjugados. Los autores sugieren que estos conjugados podrían participar en la elongación del pedúnculo y en la coordinación en el desarrollo vascular (Brcko et al., 2012). En brotes de *Cucumis sativus* se han determinado 0.42 μ moles de AIA-Glu y 0.11 μ moles de AIA-Asp por kg de PF sin ningún tratamiento previo de auxinas (Sonner y Purves, 1985).

1.7. TRANSPORTE DE AUXINAS

Las plantas utilizan dos vías para la translocación de auxinas: una vía rápida en la que se transporta desde los tejidos jóvenes, con gran actividad biosintética, hacia tejidos con menor actividad. Este tipo de distribución de auxinas, de característica no polar, se lleva a cabo a través del floema, por lo cual se distribuye de forma pasiva a través de toda la planta (Marchant et al., 2002).

El otro tipo de transporte de tipo polar ocurre de célula a célula y depende de proteínas transportadoras. Una de las principales características de este transporte es la direccionalidad, estrictamente controlada, dentro de un determinado tejido (Rubery, 1981). Se ha propuesto que la diferencia de cargas de la auxina, en el apoplasto y en el citoplasma, es la base para su acumulación preferencial en el citoplasma. Como las auxinas son ácidos débiles (el pH del AIA es 4.73), una parte de la auxina se encuentra protonada en el ambiente ácido del apoplasto (pH 5.5), por lo que son capaces de difundirse a través de la membrana en forma pasiva. Cuando las auxinas entran al citoplasma (pH=7), éstas pierden un protón y adquieren una carga negativa y ya no pueden pasar a través de las membranas (Figura 1.4).

El AIA desprotonado que se encuentra en el apoplasto no puede atravesar la membrana, por lo que requiere un mecanismo de transporte activo. Este mecanismo lo forman los transportadores AUX1/LAX. Una vez dentro de la célula, las auxinas deben ser transportadas activamente según el requerimiento de esta y requieren la existencia de proteínas transportadoras específicas. Existen dos transportadores involucrados en este movimiento, los ABCB, conocidos previamente como fosfogluco proteína (PGP) y los transportadores PIN FORMED (PIN) (Blakeslee et al., 2007; Friml et al., 2004; Geisler et al., 2005).

Estudios genéticos recientes respaldan el papel del pH y la vía de transporte pasivo de las auxinas. Por ejemplo, en una mutante que carece de H⁺-pirofosfatasa (AVP1), la acidez del apoplasto disminuye, lo cual está relacionado con la reducción en el transporte polar de las auxinas (Li et al., 2005). Por otro lado, la sobreexpresión de AVP1 acidifica el apoplasto y produce un incremento en el transporte polar de las auxinas.

Otro componente importante del transporte de las auxinas son los transportadores de tipo ABCB. Este subgrupo de transportadores de la familia ABC ha sido denominado como interactores del transporte (ABCB1/PGP1, ABCB4/PGP4 y ABCB19/PGP19) que controlan la salida de las auxinas en las células vegetales (Cho et al., 2007; Geisler et al., 2005).

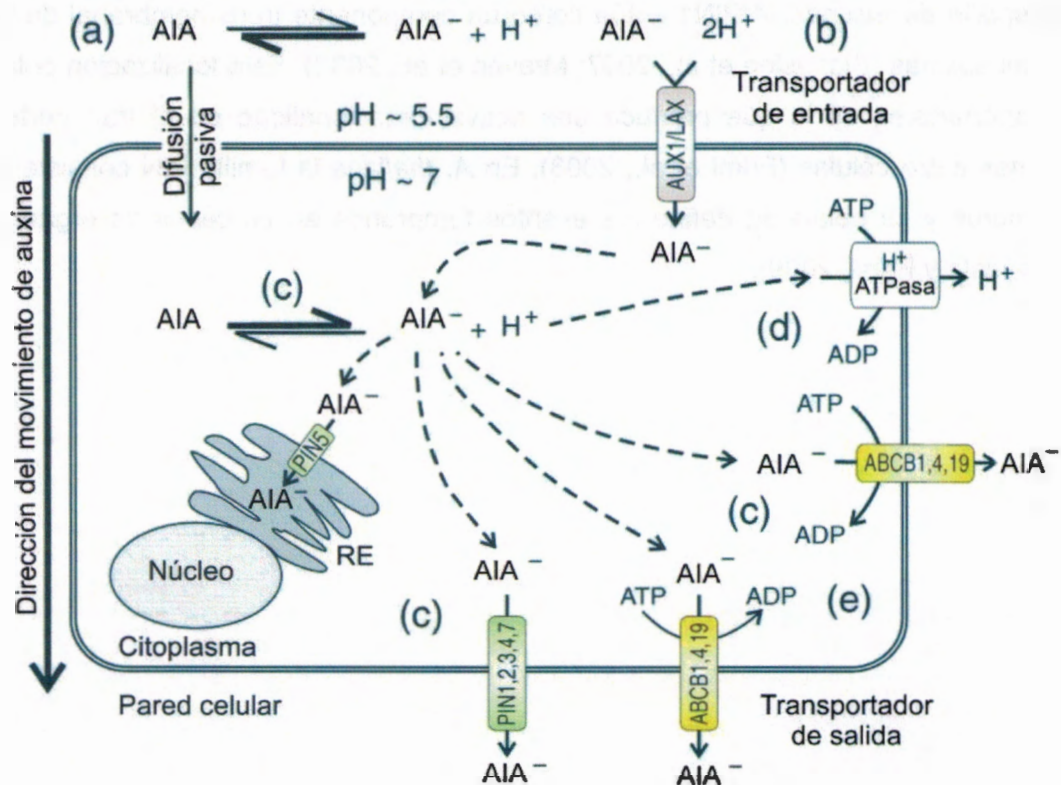


Figura 1.4 Transporte de auxinas a través del plasmalema. En el transporte de las auxinas están involucrados tanto la difusión pasiva, como el transporte específico. Las moléculas de AIA sin disociar entran a la célula por difusión pasiva (a), mientras que las moléculas disociadas de auxina (AIA⁻), menos lipofílicas, y por lo tanto menos permeables son transportadas al interior de la célula vía un cotransportador de la familia AUX1/LAX con 2H⁺ (b). En el más básico ambiente intracelular (c), el AIA se disocia y requiere un transporte activo a través de los transportadores de salida PIN o ABCB para salir de la célula. Una parte del AIA es transportado al lumen del retículo endoplásmico (RE) mediante PIN5. Esta compartimentalización aparentemente sirve para regular el metabolismo de las auxinas (Mravec et al., 2009), mientras que la actividad de los transportadores PIN aparentemente usa un gradiente de protones que es mantenido a través de la acción de la ATPasa de protones de la membrana plasmática (d) y posiblemente también la pirofosfatasa vacuolar de protones (Li et al., 2005). Los transportadores ABCB tienen actividad de ATPasa (e). Redibujado de Petrasek y Friml, (2009).

El otro tipo de transportador son las proteínas codificadas por los genes *PIN1*. Las mutaciones que afectan este gen disminuye el transporte polar de las auxinas. El gen *AtPIN1* codifica para una proteína de 67 KDa que es similar a la proteínas acarreadoras, tanto de bacterias como de eucariotes (Galweiler et al., 1998; Petrásek et al., 2006). Esta proteína se localiza en el extremo terminal de las células competentes involucradas en el

transporte de auxinas. AtPIN1 actúa como un componente transmembranal de la salida de las auxinas (Blakeslee et al., 2007; Mravec et al., 2008). Esta localización polar de los transportadores es lo que produce una activa direccionalidad en el transporte de las auxinas entre células (Friml et al., 2003). En *A. thaliana* la familia PIN consiste de ocho miembros y su polaridad define los eventos tempranos en procesos de organogénesis (Vanneste y Friml, 2009).

Cuadro 1.1 Genes que participan en las cuatro rutas dependientes de triptofano (Mano y Nemoto, 2012 véase **Figura 1.1**).

RUTA (GEN)	ORTÓLOGO	PRODUCTO DEL GEN (LOCALIZACIÓN)	ESPECIE	REFERENCIA
1. Ruta IAM				
AMI1	AtAMI1 NtAMI1	Hidrolasa indol-3-acetamida (citoplasma) Hidrolasa indol-3-acetamida (citoplasma)	<i>A. thaliana</i> <i>Nicotiana tabacum</i>	(Neu et al., 2007; Pollmann et al., 2003) (Mano et al., 2010; Nemoto et al., 2009)
2. Ruta IPA				
TAA1	TAA1 TIR2 TAR1	Triptofano aminotransferasa (citoplasma) Triptofano aminotransferasa Triptofano aminotransferasa	<i>A. thaliana</i> <i>A. thaliana</i> <i>A. thaliana</i>	(Stepanova et al., 2008; Tao et al., 2008) (Yamada et al., 2009) (Stepanova et al., 2008)
AAO1	ZmAO-1 AtAO-1	Aldehído oxidasa (citoplasma) Aldehído oxidasa (citoplasma)	<i>Zea mays</i> <i>A. thaliana</i>	(Sekimoto et al., 1997) (Sekimoto et al., 1998)
YUC	AtYUC1,2,4,6	Flavín monooxigenasa	<i>A. thaliana</i>	(Mashiguchi et al., 2011; Stepanova et al., 2011; Won et al., 2011)
3. Ruta TAM				
TDC	TDC TDC OpTDC TDC TDC	Triptofano descarboxilasa (citoplasma) Triptofano descarboxilasa Triptofano descarboxilasa Triptofano descarboxilasa Triptofano descarboxilasa	<i>Catharanthus roseus</i> <i>Camptotheca acuminata</i> <i>Ophiorrhiza pumila</i> <i>Oriza sativa</i> <i>O. sativa</i>	(De Luca et al., 1989) (López-Meyer y Nessler, 1997) (Yamazaki et al., 2003) (Kang et al., 2007; Ueno et al., 2003)
YUC (YUCCA)	AtYUC1 FZC OsYUC1 Sp1 SIFZY ToFZY PsYUC	Flavín monooxigenasa Flavín monooxigenasa Flavín monooxigenasa YUCCA-Flavín monooxigenasa No conversión de TAM a N-hidroxiTAM Flavín monooxigenasa No conversión de TAM a N-hidroxiTAM	<i>A. thaliana</i> <i>Petunia hybrida</i> <i>O. sativa</i> <i>Z. mays</i> <i>Solanum lycopersicum</i> <i>S. lycopersicum</i> <i>Pisum sativum</i>	(Zhao et al., 2001) (Tobefia-Santamaria et al., 2002) (Yamamoto et al., 2007) (Gallavotti et al., 2008) (Tivendale et al., 2010) (Expósito-Rodríguez et al., 2011) (Tivendale et al., 2010)
4. Ruta AOX1				
CYP79B2/B3	CYP79B2/B3	Monooxigenasa 450 específica a triptofano (cloroplasto)	<i>A. thaliana</i>	(Hull et al., 2000; Mikkelsen et al., 2000)
NIT1/2	AtNIT1,2 ZmNit1,2	Nitrilasa (membrana) Nitrilasa	<i>A. thaliana</i> <i>Z. mays</i>	(Bartel y Fink, 1994; Bartling et al., 1992) (Park et al., 2003)

Se sabe que en el caso de la embriogénesis cigótica de *A. thaliana* hay proteínas transportadoras que actúan como factores clave en el establecimiento de la polaridad, tanto basal como apical, desde el inicio de la formación del embrión (Petrasek y Friml, 2009). Estos factores participan después del proceso de fertilización y provocan que el cigoto dé lugar a dos células asimétricas: una célula apical que da origen al futuro embrión, y una célula basal que dará origen al suspensor. El transportador PIN7 participa en el transporte de las auxinas en estas células dirigiendo el flujo en sentido acropetal, desde la célula basal a la célula apical. PIN1 participa en el transporte de las auxinas entre las dos células apicales que se producen después de la primera división de la célula apical. Esta distribución de los transportadores PIN se mantiene hasta el estadio de ocho células. Cuando el embrión alcanza el estadio globular, el transporte de las auxinas se

vuelve más complejo. Primero se invierte el flujo del transporte, ahora los transportadores PIN1 y PIN7 llevan a las auxinas en sentido acropetal, al mismo tiempo que las células de la periferia transportan auxinas entre ellas usando al transportador PIN1 (Friml et al., 2003; Steinmann et al., 1999) (Figura 1.5). Cuando el embrión alcanza el estadio corazón, el flujo llega a otro nivel de complejidad; el transporte de auxinas sigue siendo basipetal, sólo que ahora está localizado en las células que formarán el sistema vascular, mientras que en las células de la periferia, que se convertirán en el protodermo del embrión, el flujo es ahora acropetal y las auxinas se empiezan a acumular en las células que se convertirán en los cotiledones.

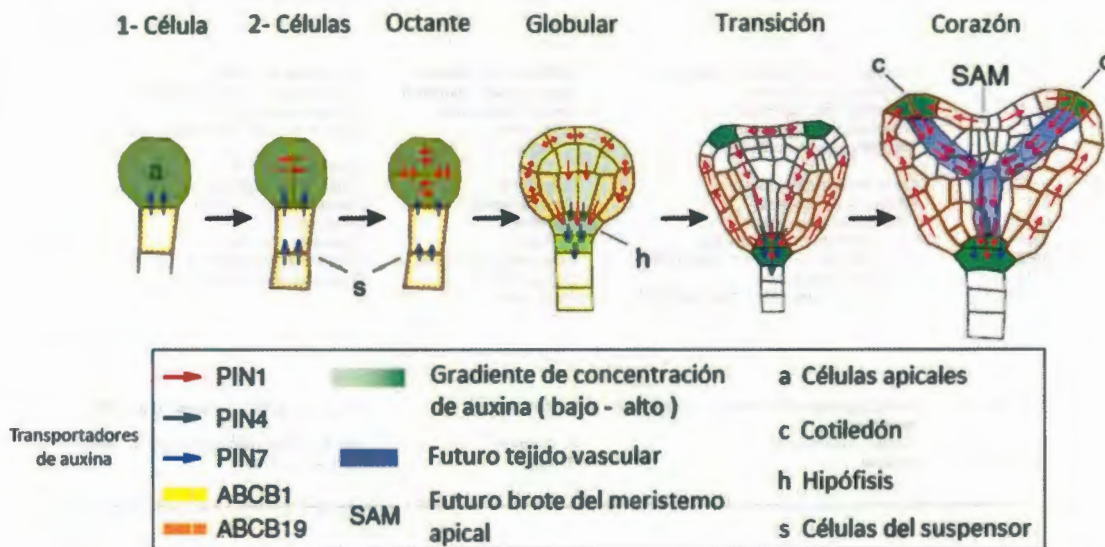


Figura 1.5 Representación esquemática de la distribución de las auxinas y de la localización de los transportadores de auxinas durante los primeros estadios de desarrollo de la embriogénesis cigótica. Distribución de auxina (gradiente verde). Para los transportadores PIN1, PIN4 y PIN7, así como los ABCB1 y ABCB19, las flechas señalan el flujo para cada transportador en particular. Las líneas punteadas indican la localización tejido específico y tipo celular de los transportadores con una polaridad no obvia. Redibujado de Petrasek et al. (2009).

1.8. SEÑALIZACIÓN

Las plantas son organismos muy versátiles y, dado su carácter sésil, responden de una manera completamente diferente a como lo hacen los animales en su interacción con el medio ambiente. Para adaptarse a los cambios del medio ambiente, las plantas muestran una tolerancia fisiológica y una gran plasticidad fenotípica. Para poder hacerlo, mantienen poblaciones de células madre (meristemas) en los ápices radiculares y

apicales, y son capaces de redefinir nuevos programas de desarrollo que llevan; por ejemplo, a la formación de nuevos nichos de células madre. Estos centros de células madre permiten el crecimiento de nuevos tejidos de la planta para responder a las condiciones del medio ambiente. Una de las moléculas responsable de esta respuesta son las auxinas.

Las auxinas son moléculas muy simples, con actividad de RCV, que participan en la regulación de los procesos pre-programados de desarrollo en las plantas, así como la respuesta de los órganos vegetales a varios estímulos ambientales (Petrásek et al., 2011). La posibilidad de que una sola molécula pueda provocar la ejecución de diferentes programas de desarrollo se debe a que la concentración que se requiere de ella es diferente en cada uno de los tejidos (Vanneste y Friml, 2012).

La percepción y respuesta a los RCV es mediada, para la mayoría de estas moléculas, por el sistema proteosoma-ubiquitina (SPU; Figura 1.6A). En este sistema, la ubiquitina (Ub) una proteína altamente conservada de 76 aminoácidos, se une covalente a las proteínas blanco por medio de la acción secuencial de tres enzimas, ya sea que regule su función, o la marque para su degradación en el proteosoma 26S (Geng et al., 2012; Hershko y Ciechanover, 1998; Santner y Estelle, 2010) (Figura 1.6B).

Inicialmente, la enzima E1 o enzima activadora de Ub hidroliza ATP para formar el intermediario E1-Ub en el cual la glicina del carboxilo terminal de la Ub se une, a través de un enlace tioéster, a la enzima E1. La Ub activada es transferida a un residuo de cisteína de la enzima conjugadora de Ub (E2). El intermediario E2-Ub puede directamente conjugar Ub a un residuo de lisina en la proteína sustrato uniéndose primero a la ligasa de Ub, y transfiriendo la Ub activada a la enzima E3, la cual la transfiere al sustrato (Geng et al., 2012; Pickart, 2001). La enzima E3 es la que confiere especificidad de sustrato a la ruta y posiciona correctamente la proteína sustrato para su conjugación con la Ub. La unión de una sola Ub a la proteína sustrato puede modificar su localización o actividad (Mukhopadhyay y Riezman, 2007). Sin embargo, cuando el proceso se repite, resulta en la formación de una cadena de poliubiquitina y la proteína sustrato es degradada en el proteosoma 26S. El proteosoma 26S es una estructura multi-unidad, con actividad de proteasa dependiente de ATP que degrada proteínas poliubiquitinadas (Voges et al., 1999).

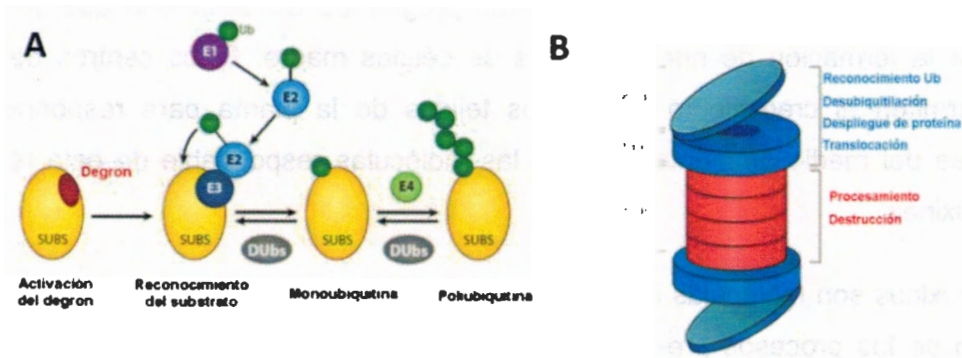


Figura 1.6 Proceso de ubiquitinación. Lado izquierdo. El primer paso es la activación del sustrato a ser degradado. Degron es el motivo en la proteína necesario para el ensamble del co-receptor y tiene la secuencia GWPPVR; sin embargo, es posible que otras secuencias de la proteína también contribuyan a la formación del complejo (Calderón Villalobos et al., 2012). En el caso de los RCV la señal es la unión del RCV. Entonces el sustrato se une la Ub por medio de la ligasa de Ub (E3), la cual actúa concertadamente con la enzima activadora de Ub (E1) y la enzima conjugadora de Ub (E2) para transferir Ub (círculos verdes) al sustrato (SUBS) en un residuo de lisina. La repetición de este proceso, catalizado tal vez por el factor de elongación E4, produce la poliUb del sustrato. La poliUb puede ser revertida por enzimas desubiquitinantes (DUbs) las cuales remueven todas las Ubs o acortan la cadena (A). Lado derecho. Arquitectura del proteosoma 26S. El proteosoma es una proteasa autocompartimentalizada que consiste de tres complejos principales: una partícula núcleo (CP) 20S, que alberga tres actividades proteolíticas diferentes; una tapa 19S que reconoce y desubiquitina al sustrato, y una base 19S que usa la energía de la hidrólisis del ATP para desenrollar las proteínas y pasen a través de la CP para su degradación (B). Redibujados de Gent et al., (2012).

La acción de las auxinas se lleva a cabo tanto a través de uno de dos mecanismos: la regulación de la transcripción de un grupo de genes, y un mecanismo que no requiere la transcripción (Hayashi, 2012; Oliva et al., 2013; Santner y Estelle, 2010). En el primer mecanismo se requiere la proteína que une Ub (E3) llamada SCF^{TIR1/AFB} (TIR1 = TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1; AFB = AUXIN-SIGNALING F-BOX) la cual forma parte de la caja F del complejo SCF (SKP1, CULLIN 1, F-box; Figura 1.7). Los sustratos para esta proteína son las proteínas auxina/AIA (aux/AIA). Sorprendentemente, la auxina trabaja uniéndose directamente a TIR1, la subunidad proteica de la caja F de SCF, como un pegamento para estabilizar la interacción entre TIR1 y el sustrato aux/AIA (Calderon-Villalobos et al., 2010). De esta forma, las auxinas promueven la degradación en el proteosoma 26S, del represor transcripcional aux/AIA, intensificando la ubiquitinación de la proteína aux/AIA. Este mecanismo, junto con la diversidad de aux/AIA y la diferencia en sensibilidad a las auxinas, es lo que permite la posibilidad de que una sola molécula pueda provocar la ejecución de diferentes programas de desarrollo; en cada tejido hay aux/AIA diferentes que responden a diferentes concentraciones de AIA

(Vanneste y Friml, 2012). Por ejemplo, *A. thaliana* tiene 6 TIR1/AFBs y 29 aux/AIAs, permitiendo un impresionante número de combinaciones (Vanneste y Friml, 2012). Un ejemplo de la diversidad que se puede obtener lo reportaron recientemente Calderon-Villalobos et al. (2012), TIR1 en complejo con el dominio II de AIA7 tiene una afinidad hacia el AIA ($K_d = 218 \pm 25.80$ nM) de un orden de magnitud más baja que el de TIR1 en complejo con AIA7 completo ($K_d = 17 \pm 7.81$ nM).

Los represores aux/AIA heterodimerizan con los factores de transcripción de respuesta a auxina (ARF) y bloquean la activación transcripcional de los genes de respuesta a auxina. Por lo tanto, la proteólisis de los represores aux/AIA, promovida por las auxinas, lleva a una activación de los ARF induciendo, de esta manera, la respuesta genética temprana a auxinas. La especificidad del perfil de la expresión genética de los genes regulados por auxinas es definida por varios factores, tales como la expresión de estas proteínas reguladoras, su regulación postranscripcional, su estabilidad y la afinidad entre estas proteínas reguladoras.

Las proteínas de unión a auxina 1 (ABP1) son las candidatas de los posibles receptores de auxina involucrados en la señalización no transcripcional de las auxinas. ABP1 también afecta la expresión genética responsiva a auxina mediada por TIR1/AFB, implicando que ambas maquinarias de señalización, ABP1 y TIR1/AFB, controlan coordinadamente eventos fisiológicos mediados por auxinas (Figura 1.7).

La maquinaria de señalización de las auxinas que está involucrada en la regulación no transcripcional no está bien caracterizada. El conocimiento de los componentes de señalización y los eventos fisiológicos involucrados en esta rápida respuesta a las auxinas es limitado. ABP1 es uno de los receptores candidato implicado en esta cadena de señalización.

ABP1 fue identificado inicialmente como una proteína de unión a auxina a principio de los años ochenta, y su papel fisiológico y su consecuente señalización fueron estudiados intensamente (Timppe, 2001). Se piensa que la función primaria de ABP1 es la regulación de respuesta rápida no transcripcional a auxinas, especialmente la elongación celular rápida. ABP1 activa el potencial de membrana y los canales de iones involucrados en los cambios estructurales en la pared celular y el citoesqueleto, lo que produce la

elongación. Recientemente, se ha demostrado su función molecular y se han determinado los componentes asociados a ABP1 (Robert et al., 2010; Xu et al., 2010) (Figura 1.7).

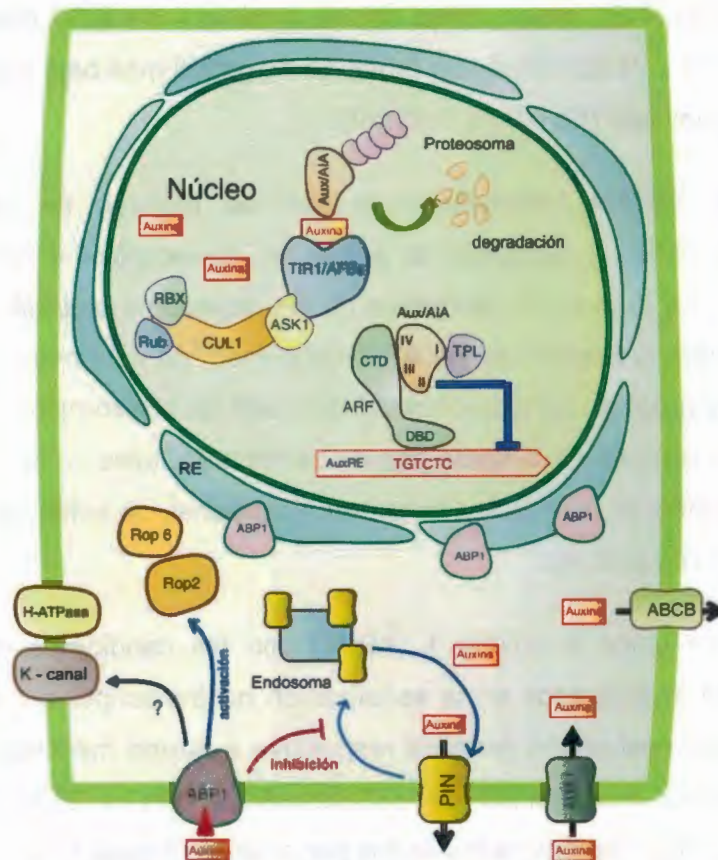


Figura 1.7 Modelo para la señalización de las auxinas en las células vegetales. TIR1/AFB es una proteína de la caja F que forma un complejo entre SCF F3 ligasa de ubiquitina, SKP (ASK1) y culina (CUL1). SCFTIR1/AFB cataliza la ubiquitinación de las proteínas auxina/AIA (Aux/AIAs) en presencia de la auxina. La unión de aux/AIA a TOPLESS (TPL), vía una interacción con los dominios I, III y IV, bloquea la actividad de los factores de transcripción FACTORES DE RESPUESTA A AUXINA (ARFs). La auxina se une en la pequeña cavidad formada entre TIR1 y el dominio II de aux/AIA. La auxina induce la degradación del represor aux/AIA y se libera la actividad de ARF y activa la transcripción de los genes en respuesta a auxina (AuxRe:TGTCTC). La proteína de unión a auxina 1 (ABP1) está localizada en el retículo endoplásmico, pero pequeñas cantidades de esta proteína actúan en la membrana plasmática como receptores de auxinas. La auxina bloquea, desde el plasmalema, la endocitosis de PIN mediada por clatrina a través de la señalización de ABP1. La señal de ABP1 activa los canales de potasio y las ATPasas de protones para producir la respuesta rápida a auxinas, tales como el crecimiento inducido por la turgencia. La señal de ABP1 también activa a las GTPasas Rho, ROP2 y ROP6, las cuales median procesos que controlan la integridad del crecimiento interdigitado de las células de la epidermis de la hoja. Redibujado de Hayashi (2012).

1.9. JUSTIFICACIÓN

Se ha observado que la adición de reguladores del crecimiento durante la inducción de la embriogénesis somática, o durante el pre-acondicionamiento de los explantes, aumenta el contenido de algunos de los reguladores del crecimiento endógenos. Sin embargo, se desconoce la dinámica de este aumento, así como la homeostasis del AIA y sus conjugados antes y durante la inducción de la embriogénesis somática.

1.10. HIPÓTESIS

Si la presencia exógena de auxinas provoca un aumento en los reguladores del crecimiento endógenos, ya sea por un aumento de su síntesis o liberación de auxina de su poza, entonces es posible que este aumento sea la señal que dispara la formación de células embriogénicas en el tejido foliar de *C. canephora*.

1.11. OBJETIVO GENERAL

Analizar la función de las auxinas libres y conjugadas en la inducción de la ES y del proceso de diferenciación celular, empleando la ES en *C. canephora* como modelo biológico.

1.12. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar los niveles de la forma libre de las auxinas AIA, AIB, ANA durante el pre-acondicionamiento e inducción del proceso embriogénico.

Determinar la concentración de los conjugados AIA-Ala y AIA-Glu durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES de *C. canephora*.

Evaluar la expresión de los genes, *CcTAA1*, *CcYUC1*, *CcYUC3*, *CcGH3.1*, *CcGH3.6* y *CcGH3.17*, durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES.

1.13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



Figura 1.8 Estrategia experimental, que se realizó para llevar a cabo el estudio de reguladores de crecimiento libres y conjugados así como genes involucrados en biosíntesis y conjugación.

Para llevar a cabo los experimentos reportados en esta investigación se propagaron plantas de *C. canephora*, de origen somático, sin reguladores del crecimiento, de forma constante durante todo el tiempo que se llevó a cabo este estudio. Antes de la inducción de la ES, las plantas eran colocadas en el medio de pre-acondicionamiento por 14 días en presencia de ANA 0.54 μM y KIN 2.32 μM . A los 14 días se tomaron los explantes de las hojas de estas plantas, con un sacabocado de un centímetro de diámetro y se colocaron en el medio de inducción que contenía BA 5 μM . Durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES se tomaron muestras para los diferentes análisis (Figura 1.8).

BIBLIOGRAFÍA

- Andreae W. A. y N. E. Good (1955). The formation of indoleacetylaspartic acid in pea seedlings, *Plant Physiol.*, 30: 380-382.
- Arroyo-Herrera A., A. Ku-Gonzalez, R. Canche-Moo, F. R. Quiroz-Figueroa, V. M. Loyola-Vargas, L. C. Rodriguez-Zapata, C. Burgeff-D'Hondt, V. M. Suárez-Solis y E. Castaño (2008). Expression of WUSCHEL in *Coffea canephora* causes ectopic morphogenesis and increases somatic embryogenesis, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 94: 171-180.
- Bajguz A. y A. Piotrowska (2009). Conjugates of auxin and cytokinin, *Phytochemistry*, 70: 957-969.
- Barratt N., W. Dong, D. Gage, V. Magnus y C. Town (1999). Metabolism of exogenous auxin by *Arabidopsis thaliana*: identification of the conjugates Na-(indol-3-ylacetyl)-glutamine and initiation of a mutant screen, *Physiologia Plantarum*, 105: 207-217.
- Bartel B (1997). Auxin biosynthesis, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 51-66.
- Bartel B y G. R. Fink (1994). Differential regulation of an auxin-producing nitrilase gene family in *Arabidopsis thaliana*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 91: 6649-6653.
- Bartel B., S. LeClere, M. Magidin y B. K. Zolman (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation, *J. Plant Growth Regulation*, 20: 198-216.
- Bartling D., M. Seedorf, A. Mithofer y E. W. Weiler (1992). Cloning and expression of an *Arabidopsis* nitrilase which can convert indole-3- acetonitrile to the plant hormone, indole-3-acetic acid, *Eur. J. Biochem.*, 205: 417-424.
- Benjamins R. y B. Scheres (2008). Auxin: the looping star in plant development, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59: 443-465.
- Bialek K. y J. D. Cohen (1986). Isolation and partial characterization of the major amide-linked conjugate of indole-3-acetic acid from *Phaseolus vulgaris* L, *Plant Physiology*, 80: 99-104.
- Blakeslee J. J., A. Bandyopadhyay, O. R. Lee, J. Mravec, B. Titapiwatanakun, M. Sauer, S. N. Makam, Y. Cheng, R. Bouchard, J. Adamec, M. Geisler, A. Nagashima, T. Sakai, E. Martinoia, J. Friml, W. A. Peer y A. S. Murphy (2007). Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 19: 131-147.
- Brcko A., A. Pèncík, V. Magnus, T. Prebeg, S. Mlinarie, J. Antunovic, H. Lepedus, V. Cesar, M. Strnad, J. Rolcik y B. Salopek-Sondi (2012). Endogenous auxin profile in the christmas rose (*Helleborus niger* L.) flower and fruit: free and amide conjugated

IAA, *Plant Growth Regul.*, 31: 63-78.

Calderón Villalobos L. I., S. Lee, C. De Oliveira, A. Ivetac, W. Brandt, L. Armitage, L. B. Sheard, X. Tan, G. Parry, H. Mao, N. Zheng, R. Napier, S. Kepinski y M. Estelle (2012). A combinatorial TIR1/AFB–Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin, *Nat. Chem. Biol.*, 8: 477-485.

Calderon-Villalobos L. I., X. Tan, N. Zheng y M. Estelle (2010). Auxin perception-structural insights, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2: 1-16.

Chen Q., C. S. Westfall, L. M. Hicks, S. Wang y J. M. Jez (2010). Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase, *J. Biol. Chem.*, 285: 29780-29786.

Cho M., S. H. Lee y H. T. Cho (2007). P-Glycoprotein 4 displays auxin efflux transporter-like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells, *Plant Cell*, 19: 3930-3943.

Cohen J. D. y R. S. Bandursky (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 403-430.

Davies P. J (1972). The fate of exogenously applied indoleacetic acid in light grown stems, *Physiologia Plantarum*, 27: 262-270.

De Luca V., C. Marineau y N. Brisson (1989). Molecular cloning and analysis of cDNA encoding a plant tryptophan decarboxylase: Comparison with animal dopa decarboxylases, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 86: 2582-2586.

Epstein E., S. J. Nissen y E. G. Sutter (1991). Indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acid in tissues of carrot inoculated with *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Growth Regul.*, 10: 97-100.

Expósito-Rodríguez M., A. A. Borges, A. Borges-Pérez y J. A. Pérez (2011). Gene structure and spatiotemporal expression profile of tomato genes encoding YUCCA-like flavin monooxygenases: the *ToFZY* gene family, *Plant Physiol. Biochem.*, 49: 782-791.

Friml J., X. Yang, M. Michniewicz, D. Weijers, A. Quint, O. Tietz, R. Benjamins, P. B. F. Ouwerkerk, K. Ljung, G. Sandberg, P. J. J. Hooykaas, K. Palme y R. Offringa (2004). A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux, *Science*, 306: 862-865.

Friml J., A. Vieten, M. Sauer, D. Weijers, H. Schwarz, T. Hamann, R. Offringa y G. Jurgens (2003). Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*, *Nature*, 426: 147-153.

Fuentes S. R. L., M. B. P. Calheiros, J. Manetti y L. G. E. Vieira (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in

- Coffea canephora*, Plant Cell Tiss. Org. Cult., 60: 5-13.
- Fuentes-Cerda C. F. J., M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2001). Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by nitrogen source, Biotechnol. Lett., 23: 1341-1343.
- Fujimura T. y A. Komamine (1979). Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture, Z. Pflanzenphysiol., 95: 13-19.
- Gallavotti A., S. Barazesh, S. Malcomber, D. Hall, D. Jackson, R. J. Schmidt y P. McSteen (2008). *sparse inflorescence1* encodes a monocot-specific *YUCCA*-like gene required for vegetative and reproductive development in maize, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 105: 15196-15201.
- Galweiler L., C. Guan, A. Muller, E. Wisman, A. Mendgen, A. Yephremov y K. Palme (1998). Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue, Science, 282: 2226-2230.
- Geisler M., J. J. Blakeslee, R. Bouchard, O. R. Lee, V. Vincenzetti, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwatanakun, W. A. Peer, A. Bailly, E. L. Richards, K. F. K. Ejendal, A. P. Smith, C. Baroux, U. Grossniklaus, A. Muller, C. A. Hrycyna, R. Dudler, A. S. Murphy y E. Martinoia (2005). Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter AtPGP1, Plant J., 44: 179-194.
- Geng F., S. Wenzel y W. P. Tansey (2012). Ubiquitin and proteasomes in transcription, Annu. Rev. Biochem., 81: 177-201.
- Goldberg R. B., G. De Paiva y R. Yadegari (1994). Plant embryogenesis: zygote to seed, Science, 266: 605-614.
- Hagen G., A. Kleinschmidt y T. Guilfoyle (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections, Planta, 162: 147-153.
- Hatanaka T., O. Arakawa, T. Yasuda, N. Uchida y T. Yamaguchi (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*, Plant Cell Rep., 10: 179-182.
- Hayashi K. i (2012). The interaction and integration of auxin signaling components, Plant Cell Physiol., 53: 965-975.
- Hershko A. y A. Ciechanover (1998). The ubiquitin system, Annu. Rev. Biochem., 67: 425-479.
- Hull A. K., R. Vij y J. L. Celenza (2000). *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 97: 2379-2384.
- Ivanova A., M. Velcheva, P. Denchev, A. Atanassov y H. A. Van Onckelen (1994).

Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*, *Physiologia Plantarum*, 92: 85-89.

Jones R., H. Ougham, H. Thomas y S. Waaland (2013). The molecular life of plants, John Wiley & Sons, Malaysia, pp 1-742.

Jourdain I., M. A. Lelu y P. Label (1997). Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch, *Plant Physiol. Biochem.*, 35: 741-749.

Kang S., K. Kang, K. Lee y K. Back (2007). Characterization of rice tryptophan decarboxylases and their direct involvement in serotonin biosynthesis in transgenic rice, *Planta*, 227: 263-272.

Komamine A., (1992). Mechanism of somatic embryogenesis in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 28: 11-14.

Komamine A., N. Murata y K. Nomura (2005). Mechanisms of somatic embryogenesis in carrot suspension cultures - morphology, physiology, biochemistry, and molecular biology, *In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant*, 41: 6-10.

Korasick D. A., T. A. Enders y L. C. Strader (2013). Auxin biosynthesis and storage forms, *Journal of Experimental. Botany* (En prensa). DOI 10.1093/jxb/ert080.

Krikorian A. D. y L. K. Simola (1999). Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973), *Physiologia Plantarum*, 105: 348-355.

Last R. L., P. H. Bissinger, D. J. Mahoney, E. R. Radwanski y G. R. Fink (1991). Tryptophan mutants in *Arabidopsis*: the consequences of duplicated tryptophan synthase beta genes, *Plant Cell*, 3: 345-355.

Li J., H. Yang, W. A. Peer, G. Richter, J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwantakun, S. Undurraga, M. Khodakovskaya, E. L. Richards, B. Krizek, A. S. Murphy, S. Gilroy y R. Gaxiola (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 regulates auxin-mediated organ development, *Science*, 310: 121-125.

Ljung K (2013). Auxin metabolism and homeostasis during plant development, *Development*, 140: 943-950.

Ljung K., A. K. Hull, M. Kowalczyk, A. Marchant, J. Celenza, J. D. Cohen y G. Sandberg (2002). Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Mol. Biol.*, 50: 309-332.

López-Meyer M. y C. L. Nessler (1997). Tryptophan decarboxylase is encoded by two autonomously regulated genes in *Camptotheca acuminata* which are differentially expressed during development and stress, *Plant J*, 11: 1167-1175.

Ludwig-Müller J (2011). Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants, *J. Exp. Bot.*, 62: 1757-1773.

- Ludwig-Müller J. y E. Epstein (1991). Occurrence and *in vivo* biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn (*Zea mays* L.), *Plant Physiology*, 97: 765-770.
- Ludwig-Müller J. y E. Epstein (1993). Analysis of indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana*, *Acta Horticult.*, 329: 109-111.
- Mano Y., K. Nemoto, M. Suzuki, H. Seki, I. Fujii y T. Muranaka (2010). The *AMI1* gene family: indole-3-acetamide hydrolase functions in auxin biosynthesis in plants, *J. Exp. Bot.*, 61: 25-32.
- Mano Y. y K. Nemoto (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants, *Journal of Experimental Botany* 63: 2853-2872.
- Marchant A., R. Bhalerao, I. Casimiro, J. Eklof, P. J. Casero, M. Bennett y G. Sandberg (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the *Arabidopsis* seedling, *Plant Cell*, 14: 589-597.
- Mashiguchi K., K. Tanaka, T. Sakai, S. Sugawara, H. Kawaide, M. Natsume, A. Hanada, T. Yaeno, K. Shirasu, H. Yao, P. McSteen, Y. Zhao, K.-I. Hayashi, Y. Kamiya y H. Kasahara (2011). The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 108: 18512-18517.
- Michalczuk L., T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis, *Phytochemistry*, 31: 1097-1103.
- Mikkelsen M. D., C. H. Hansen, U. Wittstock y B. A. Halkier (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid, *J. Biol. Chem.*, 275: 33712-33717.
- Moloney M. M., J. F. Hall, G. M. Robinson y M. C. Elliott (1983). Auxin requirements of sycamore cells in suspension culture, *Plant Physiology*, 71: 927-931.
- Mravec J., P. Skupa, A. Bailly, K. Hoyerova, P. Krecek, A. Bielach, J. Petrásek, J. Zhang, V. Gaykova, Y. D. Stierhof, P. I. Dobrev, K. Schwarzerova, J. Rolcik, D. Seifertova, C. Luschnig, E. Benkova, E. Zazimalova, M. Geisler y J. Friml, (2009). Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter, *Nature*, 459: 1136-1140.
- Mravec J., M. Kubes, A. Bielach, V. Gaykova, J. Petrásek, P. Skupa, S. Chand, E. Benková, E. Zazimalová y J. Friml (2008). Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development, *Development*, 135: 3345-3354.
- Mukhopadhyay D. y H. Riezman (2007). Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling, *Science*, 315: 201-205.

- Mukul-López H. G., C. De-la-Peña, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2012). Evaluation of the extracellular proteome profile during the somatic embryogenesis process of *Coffea spp.*, *J. Mex. Chem. Soc.*, 56: 72-79.
- Nemoto K., M. Hara, M. Suzuki, H. M. T. Seki y Y. Mano (2009). The NtAMI1 gene functions in cell division of tobacco BY-2 cells in the presence of indole-3-acetamide, *FEBS Lett.*, 583: 487-492.
- Neu D., T. Lehmann, S. Elleuche y S. Pollmann (2007). *Arabidopsis* amidase 1, a member of the amidase signature family, *FEBS J.*, 274: 3440-3451.
- Nordstrom A. C., F. A. Jacobs y L. Eliason, (1991). Effect of exogenous indole-3-acetic acid and indole indole-3-butiric acid on internal levels of the respective auxins and their conjugation with aspartic acid during adventitious root formation in pea cuttings, *Plant Physiol.*, 96: 856-861.
- Normanly J (2010). Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism, *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, 2: 1-17.
- Normanly J., J. D. Cohen y G. R. Fink (1993). *Arabidopsis thaliana* auxotrophs reveal a tryptophan-independent biosynthetic pathway for indole-3-acetic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90: 10355-10359.
- Okrent R. y M. Wildermuth (2011). Evolutionary history of the GH3 family of acyl adenylases in rosids, *Plant Mol. Biol.*, 76: 489-505.
- Oliva M., E. Farcot y T. Vernoux (2013). Plant hormone signaling during development: insights from computational models, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 16: 19-24.
- Ostin A., M. Kowalyczk, Bhalerao R.P. y Sandberg G (1998). Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 118: 285-295.
- Ouyang J., X. Shao y J. Li (2000). Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*, *Plant J.*, 24: 327-334.
- Park W. J., V. Kriechbaumer, A. Muller, M. Piotrowski, R. B. Meeley, Gierl A. y E. Glawischnig (2003). The nitrilase ZmNIT2 converts indole-3-acetonitrile to indole-3-acetic acid, *Plant Physiology*, 133: 794-802.
- Petrasek J. y J. Friml (2009). Auxin transport routes in plant development, *Development*, 136: 2675-2688.
- Petrásek J., K. Malínská y E. Zazimalová, (2011). Auxin transporters controlling plant development Transporters and Pumps in Plant Signaling, en: *Transporters and pumps in plant signaling*, (Geisler M. y K. Venema, eds.), Springer, Berlin Heidelberg, 255-290.

- Petrásek J., J. Mravec, R. Bouchard, J. J. Blakeslee, M. Abas, D. Seifertová, J. Wisniewska, Z. Tadele, M. Kubes, M. Covanová, P. Dhonukshe, P. Skupa, E. Benková, L. Perry, P. Klecek, O. R. Lee, G. R. Fink, M. Geisler, A. S. Murphy, C. Luschnig, E. Zazimalová y J. Friml (2006). PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux, *Science*, 312: 914-918.
- Pickart C. M (2001). Mechanisms underlying ubiquitination, *Annu. Rev. Biochem.*, 70: 503-533.
- Pollmann S., D. Neu y E. W. Weiler (2003). Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole- 3-acetic acid, *Phytochemistry*, 62: 293-300.
- Priyono, B. Florin, M. Rigoreau, J. P. Ducos, U. Sumirat, S. Mawardi, C. Lambot, P. Broun, V. Pétiard, T. Wahyudi y D. Crouzillat (2010). Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre, *Plant Cell Rep.*, 29: 343-357.
- Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002a). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*, *Plant Cell Rep.*, 20: 1141-1149.
- Quiroz-Figueroa F. R., S. C. Kú-Rodríguez y V. M. Loyola-Vargas (2002b). Patrón protéico extracelular durante la embriogénesis somática en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L., *Rev. Soc. Quím. Méx.*, 46: 259-263.
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Méndez-Zeel, A. Larqué-Saavedra y V. M. Loyola-Vargas (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture, *Plant Cell Rep.*, 20: 679-684.
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Méndez-Zeel, F. Sánchez-Teyer, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002c). Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* L., *J. Plant Physiology*, 159: 1267-1270.
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: *Plant cell culture protocols*, (Loyola-Vargas V. M. y F. A. Vázquez-Flota, eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117.
- Radwanski E. R., A. J. Barczak y R. L. Last (1996). Characterization of tryptophan synthase alpha subunit mutants of *Arabidopsis thaliana*, *Mol. Gen. Genet.*, 253: 353-351.
- Raghavan V (1976). *Experimental Embryogenesis in Vascular Plants*, Academic Press, London, pp 1-603.

- Reinert J (1959). Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten, *Planta*, 53: 318-333.
- Ribnicky D. M., N. Ilic, J. D. Cohen y T. J. Cooke (1996). The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. The implications for carrot somatic embryogenesis, *Plant Physiology*, 112: 549-558.
- Robert S., J. Kleine-Vehn, E. Barbez, M. Sauer, T. Paciorek, P. Baster, S. Vanneste, J. Zhang, S. Simon, M. -Covanová, K. Hayashi, P. Dhonukshe, Z. Yang, S. Y. Bednarek, A. M. Jones, C. Luschnig, F. Aniento, E. Zazimalová y J. Friml (2010). ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*, *Cell*, 143: 111-121.
- Rojas-Herrera R. y V. M. Loyola-Vargas (2002). Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding, *Plant Sci.*, 163: 705-711.
- Rossin C. B. y M. E. C. Rey (2011). Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars, *S. Af. J. Bot.*, 77: 59-65.
- Rubery P. H (1981). Auxin receptors, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 32: 569-596.
- Samson N. P., C. Campa, L. L. Gal, M. Noiro, G. Thomas, T. S. Lokeswari y A. d. Kochko (2006). Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 86: 37-45.
- Santner A., L. I. Calderon-Villalobos y M. Estelle, (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth, *Nat. Chem. Biol.*, 5: 301-307.
- Santner A. y M. Estelle (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling, *Plant J.*, 61: 1029-1040.
- Schiavone F. M. y T. J. Cooke (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors, *Cell Differentiat.*, 21: 53-62.
- Schmidt E. D. L., F. Guzzo, M. A. J. Toonen y S. C. De Vries (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos, *Development*, 124: 2049-2062.
- Sekimoto H., M. Seo, N. Dohmae, K. Takio, Y. Kamiya y T. Koshiba (1997). Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase, *J. Biol. Chem.*, 272: 15280-15285.
- Sekimoto H., M. Seo, N. Kawakami, T. Komano, S. Desloire, S. Liotenberg, A. Marion-Poll, M. Caboche, Y. Kamiya y T. Koshiba (1998). Molecular cloning and characterization of aldehyde oxidases in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiol.*,

39: 433-442.

- Sharma S. K., S. Millam, P. E. Hedley, J. McNicol y G. J. Bryan (2008). Molecular regulation of somatic embryogenesis in potato: an auxin led perspective, *Plant Molecular Biology*, 68: 185-201.
- Simon S. y J. Petrásek (2011). Why plants need more than one type of auxin?, *Plant Sci.*, 180: 454-460.
- Sonner J. M. y W. K. Purves (1985). Natural occurrence of indole-3-acetylaspargate and indole-3-acetylglutamate in Cucumber shoot tissue, *Plant Physiol.*, 77: 784-785.
- Staritsky G (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee, *Acta Bot. Neel.*, 19: 509-514.
- Staswick P. E., I. Tiryaki y M. Rowe (2002). Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation, *Plant Cell*, 14: 1405-1415.
- Staswick P. E., B. Serban, M. Rowe, I. Tiryaki, M. T. Maldonado, M. C. Maldonado y W. Suza (2005). Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid, *Plant Cell*, 17: 616-627.
- Steinmacher D. A., N. G. Krohn, A. C. M. Dantas, V. M. Stefenon, C. R. Clement y M. P. Guerra (2007). Somatic embryogenesis in peach palm using the thin cell layer technique: induction, morpho-histological aspects and AFLP analysis of somaclonal variation, *Ann. Bot.*, 100: 699-799.
- Steinmann T., N. Geldener, M. Grebe, S. Mangold, C. L. Jackson, S. Paris, L. Galweiler, K. Palme y G. Jürgens (1999). Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF, *Science*, 286: 316-318.
- Stepanova A. N., J. Robertson-Hoyt, J. Yun, L. M. Benavente, D. Y. Xie, K. Dolezal, A. Schlereth, G. Jürgens y J. M. Alonso (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development, *Cell*, 133: 177-191.
- Stepanova A. N., J. Yun, L. M. Robles, O. Novak, W. He, H. Guo, K. Ljung y J. M. Alonso (2011). The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis, *Plant Cell*, 23: 3961-3973.
- Steward F. C. y S. M. Caplin (1951). A tissue culture from potato tuber: The synergistic action of 2,4-D and of coconut milk, *Science*, 113: 518-520.
- Steward F. C., M. O. Mapes y J. Smith (1958). Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells, *Am. J. Bot.*, 45: 693-703.

- Sugawara S., S. Hishiyama, Y. Jikumaru, A. Hanada, T. Nishimura, T. Koshiba, Y. Zhao, Y. Kamiya y H. Kasahara (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 106: 5430-5435.
- Sun Y., X. Zhang, C. Huang, X. Guo y Y. Nie (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from different wild diploid cotton (*Gossypium*) species, *Plant Cell Rep.*, 25: 289-296.
- Sutter E. G. y J. D. Cohen (1992). Measurement of indolebutyric acid in plant tissues by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry analysis, *Plant Physiology*, 99: 1719-1722.
- Tao Y., J. L. Ferrer, K. Ljung, F. Pojer, F. Hong, J. A. Long, L. Li, J. E. Moreno, M. E. Bowman, L. J. Ivans, Y. Cheng, J. Lim, Y. Zhao, C. L. Ballaré, G. Sandberg, J. P. Noel y J. Chory (2008). Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants, *Cell*, 133: 164-176.
- Terol J., C. Domingo y M. Talón (2006). The GH3 family in plants: Genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis, *Gene*, 371: 279-290.
- Timpte C (2001). Auxin binding protein: curiouser and curiouser, *Trends Plant Sci.*, 6: 586-590.
- Tivendale N. D., N. W. Davies, P. P. Molesworth, S. E. Davidson, J. A. Smith, E. K. Lowe, J. B. Reid y J. J. Ross (2010). Reassessing the role of N-hydroxytryptamine in auxin biosynthesis, *Plant Physiology*, 154: 1957-1965.
- Tobeña-Santamaria R., M. Bliiek, K. Ljung, G. Sandberg, J. N. M. Mol, E. Souer y R. Koes (2002). FLOOZY of petunia is a flavin monooxygenase-like protein required for the specification of leaf and flower architecture, *Genes Dev.*, 16: 753-763.
- Tomas A. y C. Perrot-Rechenmann (2010). Recent progress in auxin biology, *C. R. Biol.*, 333: 297-306.
- Ueno M., H. Shibata, J. Kihara, Y. Honda y S. Arase (2003). Increased tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities induce Sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*, *Plant J.*, 36: 215-228.
- Van der Krieken W. M., H. Breteler y M. H. M. Visser (1992). The effect of the conversion of indolebutyric acid into indoleacetic acid on root formation on microcuttings of *Malus*, *Plant Cell Physiology*, 33: 709-713.
- Van der Krieken W. M., H. Breteler, M. H. M. Visser y D. Mavridou (1993). The role of the conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system, *Plant Cell Rep.*, 12: 203-206.
- Vanneste S. y J. Friml (2009). Auxin: a trigger for change in plant development, *Cell*, 136:

1005-1016.

- Vanneste S. y J. Friml (2012). Plant signaling: deconstructing auxin sensing, *Nat. Chem. Biol.*, 8: 415-416.
- Voges D., P. Zwickl y W. Baumeister (1999). The 26S proteasome: A molecular machine designed for controlled proteolysis, *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 1015-1068.
- Vondrakova Z., K. Eliášová, L. Fischerová y M. Vágner (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*, *Cen. Eur. J. Biol.*, 6: 587-596.
- Wang H., C. e. Tian, J. Duan y K. Wu (2008). Research progresses on *GH3s*, one family of primary auxin-responsive genes, *Plant Growth Regulation*, 56: 225-232.
- Waris H (1957). A striking morphogenetic effect of amino acid in seed plant, *Suom Kemistil*, 36B: 121.
- Went F (1935). Auxin, the plant growth-hormone, *Bot. Rev.*, 1: 162-182.
- Won C., X. Shen, K. Mashiguchi, Z. Zheng, X. Dai, Y. Cheng, H. Kasahara, Y. Kamiya, J. Chory y Y. Zhao, (2011). Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by tryptophan aminotransferases of arabisidopsis and YUCCAs in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 108: 18518-18523.
- Woodward A. W. y B. Bartel (2005). Auxin: regulation, action, and interaction, *Ann. Bot.*, 95: 707-735.
- Xu T., M. Wen, S. Nagawa, Y. Fu, J. G. Chen, M. J. Wu, C. Perrot-Rechenmann, J. Friml, A. M. Jones y Z. Yang (2010). Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*, *Cell*, 143: 99-110.
- Yamada M., K. Greenham, M. J. Prigge, Jensen P.J y M. Estelle (2009). The *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2* gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development, *Plant Physiology*, 151: 168-179.
- Yamamoto Y., N. Kamiya, Y. Morinaka, M. Matsuoka y T. Sazuka (2007). Auxin biosynthesis by the *YUCCA* genes in rice, *Plant Physiology*, 143: 1362-1371.
- Yamazaki T., M. Takaoka, E. Kato, K. Hanada, M. Sakita, K. Sakata, Y. Nishiuchi y H. Hirano (2003). A possible physiological function and the tertiary structure of a 4-kDa peptide in legumes, *Eur. J. Biochem.*, 270: 1269-1276.
- Yang T. y P. J. Davies (1999). Promotion of stem elongation by indole-3-butyric acid in intact plants of *Pisum sativum* L, *Plant Growth Regulation*, 27: 157-160.
- Zamarripa C. A., J. P. Ducos, H. Tessereau, H. Bollon, A. B. Eskes y V. Pétiard (1991). Développement d'un procédé de multiplication en masse du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide, en: 14^e Colloque Scientifique

Internationale sur le Café, Association Scientifique Internationale du Café, Paris, 392-402.

Zenk M. H (1962). Aufnahme und Stoffwechsel von α -Naphthyl-Essigsäure durch Erbsenepicotyle, *Planta*, 58: 75-94.

Zhao Y (2008). The role of local biosynthesis of auxin and cytokinin in plant development, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 11: 18-22.

Zhao Y., S. K. Christensen, C. Fankhauser, J. R. Cashmann, J. D. Cohen, D. Weigel y J. Chory (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis, *Science*, 291: 306-309.

Zhao Y (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61: 49-64.

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

CAPÍTULO II

¹“DINÁMICA DE LA CONCENTRACIÓN DEL AIA Y DE ALGUNOS DE SUS CONJUGADOS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *COFFEA CANEPHORA*”

2.1. INTRODUCCIÓN

La mayoría de los procesos embriogénicos requiere de la presencia, ya sea antes o durante el proceso embriogénico, de por lo menos una auxina. Las auxinas juegan una función importante durante el proceso embriogénico; esto no sólo es verdad para la auxina que se añade exógenamente, sino también para las auxinas endógenas (Michalczuk et al., 1992b). Las auxinas endógenas parecen ser esenciales, ya que el uso de inhibidores de su transporte durante la inducción de la ES pueden producir embriones anormales (Fujimura y Komamine, 1979; Schiavone y Cooke, 1987). La rápida inducción de la ES en *Medicago falcata* correlaciona con un contenido elevado de AIA y un nivel bajo de ABA en los explantes iniciales (Ivanova et al., 1994). La adición de auxinas exógenas estimula la acumulación del AIA libre endógeno en *D. carota* (Michalczuk et al., 1992b). Durante la inducción de la ES directa o indirecta en *Acca sellowiana*, se observa un corto pulso en la concentración de AIA durante el tercer día de cultivo (Pescador et al., 2012). En *Dactylis glomerata*, la respuesta embriogénica correlaciona con el contenido endógeno de auxina (1988). Parece que el aumento en la concentración endógena de AIA es esencial y está asociada fuertemente con el mecanismo de inducción de la ES. El aumento en el contenido de auxinas endógenas, en respuesta a la presencia de exógenas, fue descubierto hace algún tiempo por Andreae y Good (1955).

Este capítulo ha sido sometido a publicación a la revista *Plant Signaling & Behavior* con el título ¹“DYNAMICS OF THE CONCENTRATION OF IAA AND SOME OF ITS CONJUGATES DURING THE INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *COFFEA CANEPHORA*”.

El tratamiento de raíces escindidas de *Pisum sativum* con AIA produce un aumento en la poza interna de AIA, así como en la concentración del conjugado ácido *N*-(3-indolilacetil)-D/L-aspártico (Davies, 1972). Este conjugado también ha sido determinado en segmentos en elongación de *Phaseolus vulgaris* incubados con AIA en la luz (Davies, 1972). No solamente el AIA produce un aumento en los conjugados de auxinas; se ha determinado que la incubación de hipocotilos de *P. sativum* con la auxina sintética ANA, produce un incremento en el ácido naftil acetil aspártico (Zenk, 1962). A pesar de los requerimientos para el suministro de auxina exógena para mantener el crecimiento, las células cultivadas *in vitro* producen cantidades sustanciales de AIA endógeno (Fujimura y Komamine, 1979; Moloney et al., 1983). Sin embargo, el 2,4-D y el ANA tienen efectos menores en la concentración endógena de AIA en suspensiones celulares de *D. carota*; el ANA se encontró mayormente en la forma conjugada (Ribnicky et al., 1996).

Los diferentes tejidos de *D. carota*, tales como el peciolo y el hipocotilo, así como la proliferación de suspensiones celulares, requiere la exposición por uno o varios días al 2,4-D para inducir la ES (Fujimura y Komamine, 1979; Jiménez y Bangerth, 2001; Michalczuk et al., 1992b). La adición de 2,4-D y del inhibidor de auxinas el ácido *p*-clorofenoxiisobutírico modifica los niveles endógenos de AIA libre y la composición anatómica de los embriones somáticos en sus primeros estadios de desarrollo de *Abies alba* (abeto europeo plateado) (Vondrakova et al., 2011). Otras plantas, tales como *C. canephora* (Quiroz-Figueroa et al., 2006), *Medicago spp.* (Bögre et al., 1990; Pasternak et al., 2002), y *Manihot esculenta* Crantz (Rossin y Rey, 2011) también requieren la adición de una auxina para inducir la ES.

El aumento en los conjugados de AIA está relacionado con la presencia de enzimas con actividad de amido sintetasas, y son codificadas por genes pertenecientes a la familia GH3 (Chen et al., 2010; Wang et al., 2008). Esta familia fue identificada inicialmente en *Glycine max* como respuesta a la presencia de auxinas exógenas (Hagen et al., 1984) y desde entonces estos genes han sido identificados en diferentes especies vegetales (Okrent y Wildermuth, 2011). El número de miembros de la familia GH3 difiere entre especies, desde diezcinueve en *A. thaliana* hasta seis en *C. papaya* (Okrent y Wildermuth, 2011). Esta familia ha sido dividida en tres grupos, de acuerdo con la especificidad de sustrato que usa la enzima (Staswick et al., 2002; Terol et al., 2006). Al

grupo I pertenecen los genes que codifican para las enzimas que usan ácido jasmónico como sustrato; el grupo II comprende las enzimas que utilizan AIA y el grupo III enzimas que son activas con sustratos diferentes al ácido jasmónico y al AIA.

A pesar del hecho de que la inducción de la ES en *C. canephora* se lleva a cabo en ausencia de cualquier auxina exógena, depende completamente de la pre-incubación de los explantes con ANA (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Puesto que no se añade ninguna auxina exógena durante la inducción de la ES, este sistema es un modelo excelente para estudiar el papel de las auxinas endógenas durante la inducción de la ES en *C. canephora*.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material biológico y condiciones de crecimiento

Las plántulas de *C. canephora* utilizadas fueron obtenidas a partir de embriones somáticos y cultivadas en medio de Murashige y Skoog (1962) (MS; PhytoTechnology Laboratories, M524) y suplementado con tiamina-HCl (29.6 μM ; Sigma, T3902-25G), mioinositol (550 μM ; Sigma, I5125-500G), cisteína (0.15 μM ; Sigma, C-8277), sacarosa (87.64 mM; Sigma, S5391) y gelrite (0.25%, p/v; Sigma, G1910), pH 5.8 y cultivadas a 25 ± 2 °C en fotoperiodo de 16/8h (luz/oscuridad; $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

2.2.2. Inducción de la embriogénesis somática

Después de 40 semanas las plántulas tenían seis pares de hojas y fueron acondicionadas por 14 días en un medio MS suplementado con ANA (0.54 μM ; Sigma, N-1145) y KIN (2.32 μM ; Sigma, K0753) en las mismas condiciones de incubación que las mencionadas en el párrafo anterior. Al final del tratamiento de pre-acondicionamiento, se tomaron los explantes con un sacabocados de 1 cm de diámetro. Se colocaron cinco explantes en un matraz de 250 mL con 25 mL de medio de Yasuda modificado como se ha descrito previamente (Quiroz-Figueroa et al., 2006) en presencia de BA (5 μM ; PhytoTechnology Laboratories, B800) y cultivados a 25 ± 2 °C en la oscuridad a 55 rpm.

2.3. Extracción de auxinas y sus conjugados

Se colectaron 100 mg de tejido desde el inicio de la pre-incubación (días -14, -9 y -4 antes de la inducción) hasta la inducción (día cero). También se colectaron muestras a los

30 y 60 min, así como 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. El tejido colectado fue congelado y almacenado hasta su uso a - 81 °C. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres muestras biológicamente distintas a partir de por lo menos dos experimentos independientes.

El tejido congelado fue molido con nitrógeno líquido y mezclado con 1 mL de agua ácida ajustado con HCl a un pH 2.8. La mezcla fue transferida a un tubo de ensayo con 1 mL adicional de agua ácida. La mezcla fue agitada durante 1 min con 1 mL de una solución de hidroxitolueno butilado (Acros Organics, 112992500) y seguidamente se le adiciono 1 mL de acetato de etilo (CTR Scientific, CTR 00184). Se agito 1 min y se recupero el sobrenadante, seguidamente se adiciono 2 mL de acetato de etilo se agito durante 1 min y se recupero el sobrenadante y así una vez más. De esta mezcla se tomaron 3 mL de la fase orgánica y se evaporo con nitrógeno gaseoso. La muestra seca se resuspendió en 1 mL de la fase móvil con la que se corrió la muestra en el HPLC (60% acetonitrilo; J. T. Baker, 9017-03: 40% agua conteniendo 0.5% ácido acético; CTR Scientific, 00500) y filtrado a través de un filtro Millipore (0.22 μ M). Para determinar la eficiencia de la extracción fitoquímica, se aplicó una cantidad conocida de los estándares a una muestra de tejido. La eficiencia de la extracción fue en todos los casos mayor a 99%.

2.4. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se inyectaron 20 μ l del extracto, como se describió en el párrafo anterior, en el HPLC. Los compuestos en los extractos de los tejidos fueron sometidos a cromatografía con un sistema de elusión isocrático con una velocidad de flujo de 0.6 mL/min⁻¹ en una columna de fase reversa C₁₈ (Phenomenex) de 250 mm x 4.6 mm. El sistema cromatográfico (Agilent Technologies 1200) consistió de un arreglo de bombas cuaternario (Agilent Technologies G1311A) conectado a un inyector automático (Agilent Technologies G1329A). Las muestras fueron analizadas con un detector de fluorescencia (Agilent Technologies G1321A) y se usó una longitud de 280 nm de emisión y una longitud de excitación de 340 nm.

La presencia de los compuestos en las muestras analizadas fue determinada mediante los tiempos de retención del AIA (Fluka, 45533), AIB (Sigma, 57310), ANA, y de

los conjugados AIA-Glu y AIA-Ala. Estos conjugados fueron preparados como se describe en el Anexo 1. También se realizaron co-inyecciones de los estándares y de las muestras analizadas, para determinar si coincidían en su elusión. Además, para asegurar que la identidad de cada compuesto era la correcta se realizaron inyecciones en un sistema de cromatografía de gases con detector de masas. Las curvas de calibración se realizaron con los estándares, tanto libres como conjugados, usando el área debajo de cada pico de cada compuesto.

2.5. Análisis de las secuencias y diseño de los cebadores

Para el diseño de cebadores, para amplificar los genes estudiados, se usaron las siguientes bases de datos: TAIR, <http://www.arabidopsis.org/>; Sol Genomic Network, <http://solgenomics.net/> y NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. El alineamiento de los nucleótidos se llevó a cabo con los softwares BioEdit sequence alignment Editor 5.0.6 (Hall, 1999) y CLUSTAL W 1.82 (Thompson et al., 1994). El diseño de los cebadores para los genes *CcGH3.1*, *CcGH3.6*, *CcGH3.17*, *CcTAA1*, *CcYUC1* y *CcYUC3* se llevó a cabo con el software Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), y los cebadores generados fueron analizados con el programa Oligo Analyzer 3.1, (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>). Los cebadores se diseñaron contra regiones conservadas o dominios característicos de las proteínas analizadas, para los genes mencionados líneas arriba. Los cebadores generados se enlistan en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1 Cebadores diseñados para el estudio de la expresión de los diferentes genes estudiados.

Gen	Secuencias de los cebadores
<i>CcTAA1</i>	F-5'-CGGAACCATCAGAGAGACGGT-3'
	R-5'-GTCAGATCCACAACGCTCTCC-3'
<i>CcYUC1</i>	F-5'-AGAAGGTTTTGGTGGTGG-3'
	R-5'-CTTTTGTAACCTGTTGCTAA-3'
<i>CcYUC3</i>	F-5'-GGCCWTCAGGTCTAGCC-3
	R-5'-GRGATTTTRTAGTCACMAGCATG-3'
<i>CcGH3.1</i>	F-5'-TCCAGAAGATGGTCTTGCCAG-3'
	R-5'-CGATCACCGTTTTCCATACGC-3'
<i>CcGH3.6</i>	F-5'-GCTGGAGGAGATGCCTCTTT-3'
	R-5'-CATCGAGACCCCATCTCTGC-3'
<i>CcGH3.17</i>	F-5'-TTGTGCAGCGAGATGCGATA-3'
	R-5'-TAGGCTGGCGAACTACAAGC-3'
<i>ACTINA</i>	F-5'-GGAGAAGAGTTATGAGCTGCCTGAC-3'
	R-5'-CATACGATCAGCAATACCAGGGAA-3'

2.5.1. Extracción de ARN

El ARN total se extrajo de 100 mg de tejido mediante el método del reactivo del BRLTrizol (Invitrogen) y repurificado con el reactivo de QiagenRNeasy Mini siguiendo las instrucciones de los fabricantes. El ADNc se preparó utilizando 200 unidades de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen) y 2 µg de ARN, 1 µg de Random Primer, 1 µg de Oligo dT, en un volumen de 20 µl y siguiendo las instrucciones del fabricante. Los templados de ADNc para el PCR cuantitativo se prepararon a partir de tres muestras individuales para cada tratamiento.

2.5.2. PCR cuantitativo

Para llevar a cabo el PCR cuantitativo, cada reacción contenía 50 ng del templado de ADNc, 10 µM de cada cebador y 1 x del reactivo EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix Universal (11784-200-Invitrogen). Los ensayos para el PCR cuantitativo se llevaron a cabo en el equipo StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: para *CcGH3.1* y *CcTAA1*, 94 °C por 5 min, seguido por 20 ciclos de 94 °C por 1 min, 51.3 °C por 1.30 min, 72 °C por 1 min y un ciclo final de 72 °C por 5 min; para *CcGH3.6*, *CcGH3.17* y *CcYUC3* 94 °C por 5 min, seguido por 20 ciclos de 94 °C por 1 min, 55.6 °C por 1.30 min, 72 °C por 1 min y un ciclo final de 72 °C por 5 min; *ACTIN* y *CcYUC1* 94 °C por 5 min, seguido por 20 ciclos de 94 °C por 1 min, 63 °C

por 1.30 min, 72 °C por 1 min y un ciclo final de 72 °C por 5 min. Los niveles de transcrito correspondientes a *CcGH3.1*, *CcGH3.6*, *CcGH3.17*, *CcTAA1*, *CcYUC1* y *CcYUC3* en las muestras se normalizaron al nivel de expresión del gen de *ACTINA* y los datos se expresaron como el nivel de expresión relativa. La especificidad de los productos de amplificación por PCR se determinó mediante el análisis de la curva de fusión. Los datos obtenidos del PCR de tiempo real se usaron para calcular la cantidad relativa de los genes blanco y se comparó con la expresión del gen de *ACTINA* usando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak y Schmittgen, 2001). El análisis estadístico de las diferencias entre la media de los valores se llevó a cabo usando la prueba de Tukey y las diferencias se consideraron significativas a $P \leq 0.05$.

2.6. Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron y procesaron usando un programa para análisis de variancia (ANOVA). El grado de significancia entre la media de los valores se determinó usando la prueba de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas a $P \leq 0.05$. Los datos se analizaron con el programa Origin versión 8.

2.7. RESULTADOS

2.7.1. Inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*

Las auxinas juegan un papel importante durante la inducción de la ES. Esto es verdad no sólo para las auxinas exógenas, sino también para las auxinas endógenas (Michalczuk et al., 1992b). Sin embargo, la información concerniente a la dinámica de su comportamiento, así como la de sus conjugados durante la inducción de la ES, es muy limitada. La inducción de la ES a partir de explantes de *C. canephora* depende del pre-tratamiento de las plántulas con ANA y KIN por 14 días antes de que los explantes sean colocados bajo condiciones de inducción de la ES (Quiroz-Figueroa et al., 2006). La ES es muy eficiente en este sistema (Figura 2.1). Las primeras estructuras embriogénicas aparecen después de 21 días en el medio de inducción. Después de 56 días, el número de estructuras embriogénicas alcanza un promedio de 150 ± 20 . Los embriones obtenidos germinan con facilidad en medio MS sin RCV, con una eficiencia del 100% (Figura 2.2).

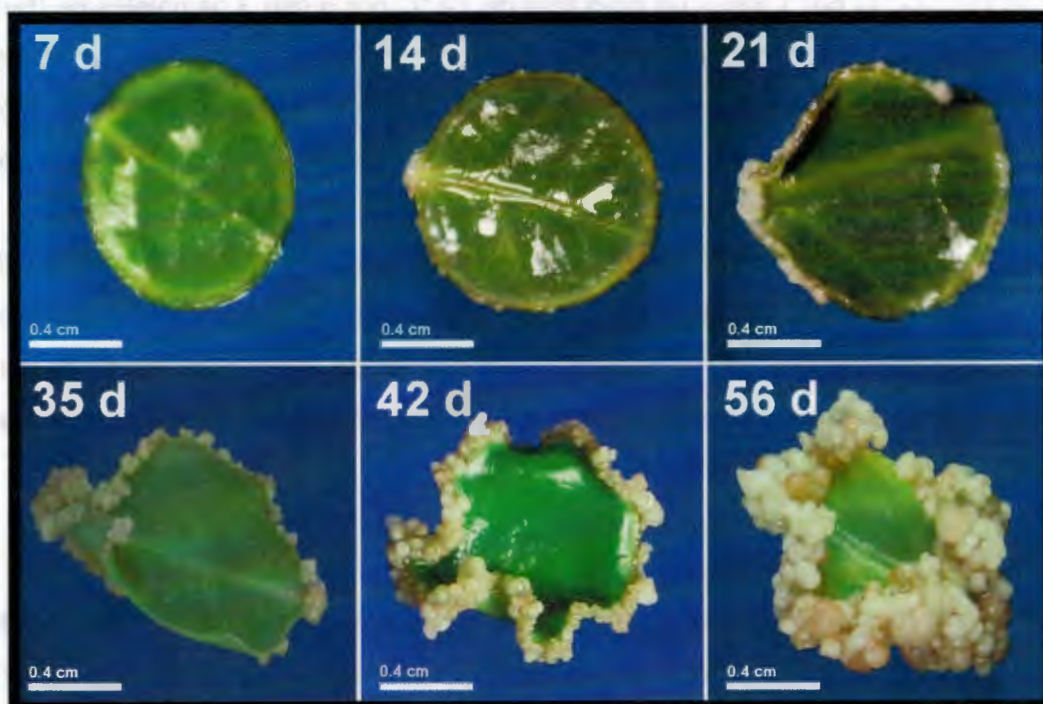


Figura 2.1 Inducción de la ES en *C. canephora*. El proceso de ES se indujo como fue reportado previamente (Quiroz-Figueroa et al., 2006). Cada fotografía fue tomada a los 7, 14, 21, 35, 42, y 56 días de inducción de la ES. Las plántulas fueron cultivadas *in vitro* en un medio MS suplementando ANA ($0.54 \mu\text{M}$) y KIN ($2.32 \mu\text{M}$) por dos semanas antes de la inducción de la ES. Después del periodo de pre-acondicionamiento, los explantes fueron incubados en medio de Yasuda modificado líquido, suplementado con BA ($5 \mu\text{M}$), cada explante tiene inicialmente un área de 0.25 cm^2 .



Figura 2.2 Germinación de los embriones somáticos. A) Embriones cotiledonares. B) Germinación de los embriones somáticos. De izquierda a derecha, embriones cotiledonares, desarrollo de plántulas hasta el estadio de seis hojas. C) Plántulas individuales de *C. canephora* a partir de embriones somáticos.

2.7.2. Estandarización de la detección de auxinas por HPLC

El primer paso para la determinación de la concentración de auxinas y sus conjugados fue estandarizar una metodología para separar las diferentes auxinas por medio de HPLC. Lo primero que se estableció fue que el coeficiente de extinción molar era mayor cuando se usaba fluorescencia que cuando se usaba luz visible para su

detección. Una vez establecida la metodología (ver materiales y métodos) se determinó que el AIA tenía un tiempo de retención de 4.94 min, el AIB de 6.00 min y el ANA de 7.17 (Figura 2.3).

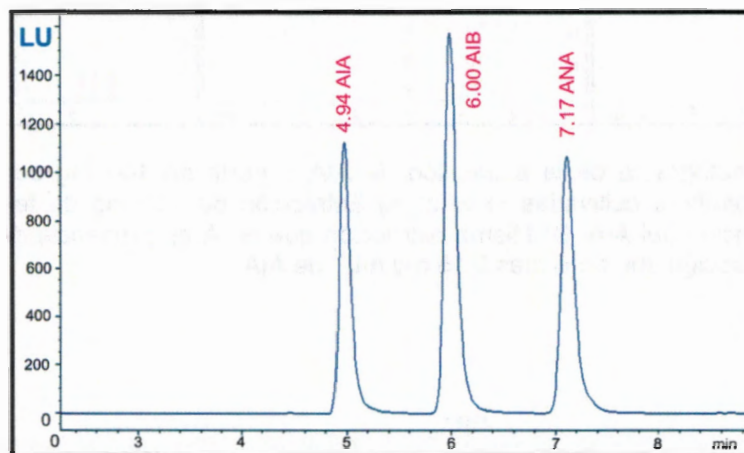


Figura 2.3 Cromatograma en el que se muestra la separación y detección de los reguladores del crecimiento AIA, AIB y ANA, indicando en el eje de las abcisas el tiempo de retención (min) y en el eje de las ordenadas unidades de luminancia (LU).

Una vez establecidas las condiciones de separación de las auxinas libres, se procedió a su determinación en los extractos. Las auxinas se oxidan con facilidad, por lo que se procedió a establecer un protocolo para su extracción y evitar su oxidación. Se usaron 100 mg de tejido foliar de las plántulas cultivadas *in vitro*. Cuando se analizó el extracto, sin la adición del antioxidante, el área bajo el pico fue de 13.92 (Figura 2.4A). Cuando se añadió hidroxitoluenobutilado (BHT; 1 mg/mL^{-1}) se evitó la oxidación del AIA y el área bajo el pico aumentó hasta 73.35, un aumento de 5 veces (Figura 2.4B). Una tercera acción que se llevó a cabo para asegurar la metodología, fue la adición de una cantidad conocida de AIA como estándar interno. El aumento en el pico que eluía a 5.028 min el cual confirmó que efectivamente se trata del AIA (Figura 2.4C). En un experimento por separado, y usando un sistema de cromatografía de gases con un detector de masas, se confirmó que el pico que eluía en el sistema de HPLC a 4.94 – 5.0 min era AIA (Figura 2.3). El patrón de fraccionamiento, tanto de un estándar puro de AIA, como de la muestra proveniente del tejido foliar, fue el mismo. Además, los diferentes fragmentos producidos por el detector de masas permitieron reconstruir la molécula de AIA. El patrón de fraccionamiento fue similar al reportado previamente por Chiwocha et al. (2003) (Figura 2.5).

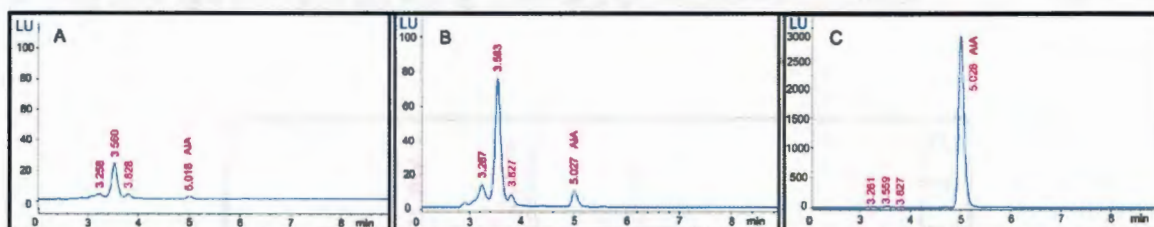


Figura 2.4 Cromatograma de la extracción de AIA a partir de 100 mg de tejido foliar de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*. A) Extracción de 100 mg de tejido foliar sin el inhibidor de la oxidación del AIA. B) Misma extracción que en A en presencia de 1 mg mL^{-1} de BHT. C) Misma extracción que en B más 0.15 mg mL^{-1} de AIA.

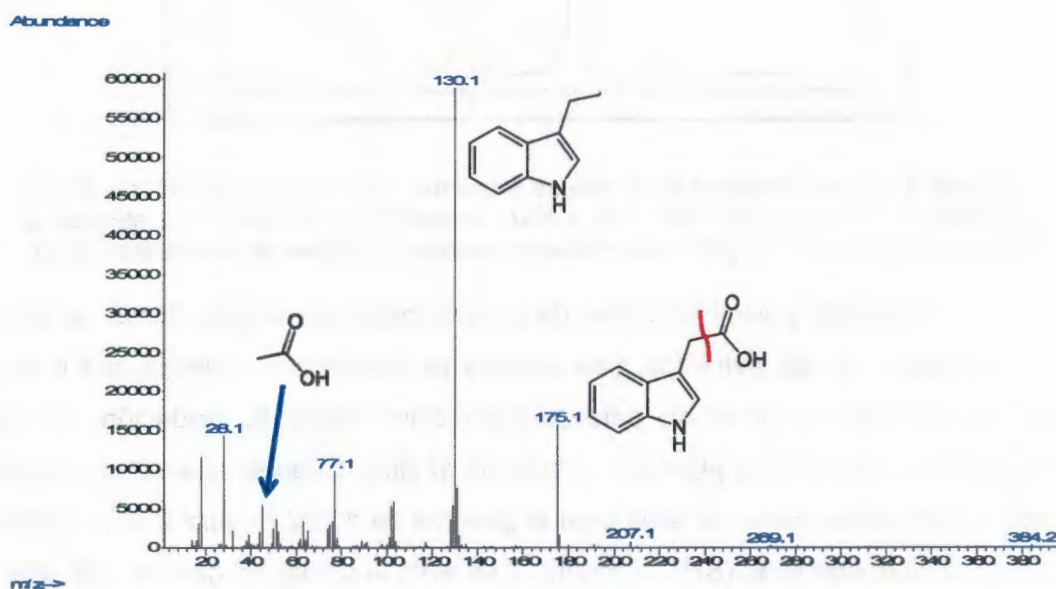


Figura 2.5 Espectrometría de masas de la molécula de AIA. Se muestran las estructuras químicas correspondientes a los fragmentos mayoritarios.

El siguiente paso en el establecimiento de la metodología fue determinar la cantidad de muestra para la determinación de las auxinas. Se utilizaron 100, 300 y 500 mg de tejido foliar de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*. Con 100 mg de tejido se obtuvo un área debajo del pico de 73.35; con 300 mg el área fue de 282.8, esto es 3 veces más. Cuando la muestra fue de 500 mg el área bajo el pico aumentó 5 veces (341.73; Figura 2.6). La correlación de la línea de la gráfica fue de 0.97, indicando la dependencia entre la concentración del AIA y el tamaño de la muestra.

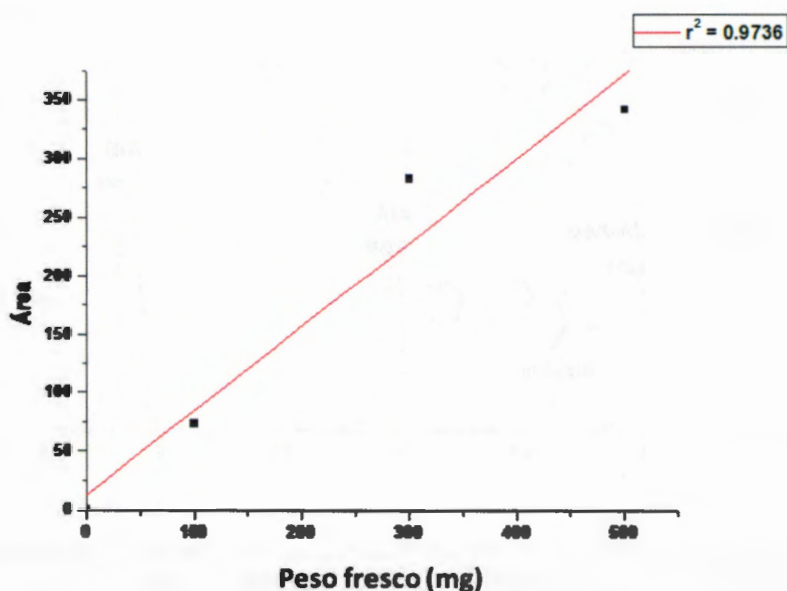


Figura 2.6 Detección del área del pico correspondiente al AIA por la cantidad de tejido foliar de plántulas de *C. canephora* cultivadas *in vitro*.

A continuación se determinaron las condiciones de separación de los conjugados de AIA. Todas las condiciones fueron iguales tanto para la separación de las auxinas libres así como de los conjugados. En la Figura 2.7 se muestra el cromatograma de la separación de los estándares de AIA-Ala y AIA-Glu, así como los estándares de AIA y AIB. Los tiempos de retención para los conjugados fueron de 3.89 min para el AIA-Glu y de 4.32 min para el AIA-Ala. Los picos fueron analizados también con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas. Los patrones de fraccionamiento entre los compuestos sintetizados y los picos de las muestras fueron similares. En la Figura 3.8 se muestra el patrón de fraccionamiento proveniente del detector de masas para el AIA-Glu. En esa Figura se muestran los fragmentos esperados del fraccionamiento de la molécula del AIA-Glu.

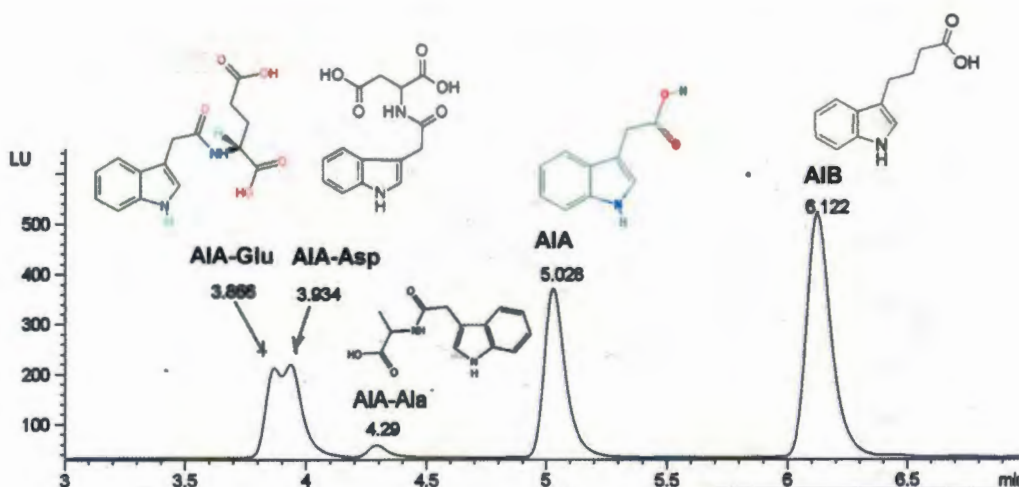


Figura 2.7 Cromatograma en el que se muestra la separación de los estándares de AIA-Glu, AIA-Asp, AIA-Ala, AIA ($pK_a = 4.73$) y AIB ($pK_a = 4.86$).

2.7.3. Determinación de las auxinas libres y sus conjugados

La determinación de las auxinas endógenas produjo resultados interesantes (Figura 2.9). Dado que en los explantes de plántulas incubadas en presencia de ANA, la concentración endógena de este aumentó hasta alcanzar $0.66 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$ cuatro días después del inicio de la pre-incubación de las plántulas. Esta concentración disminuyó a $0.359 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$ al final del periodo de pre-acondicionamiento. El AIB estaba presente en los explantes antes de la incubación en el medio de pre-acondicionamiento ($0.601 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$); esta concentración disminuyó a $0.462 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$ después de 14 días de pre-acondicionamiento. Por otro lado, la concentración inicial de AIA ($0.292 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$) aumentó hasta $1.958 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$ para el final del periodo de pre-incubación (Figura 2.9).

Cuando los explantes fueron transferidos al medio de inducción de la ES, las tres auxinas libres disminuyeron. Tanto el ANA como el AIB disminuyeron por debajo del límite de detección. El AIA disminuyó abruptamente hasta $0.303 \text{ nmoles g}^{-1} \text{ PF}$; Esta cantidad de AIA fue seis veces menor que la cantidad al inicio de la inducción de la ES (Figura 2.9).

Todos los tejidos de plantas contienen auxinas, principalmente AIA. Sin embargo, durante los últimos 15 años, las evidencias sugieren que la mayor parte de las auxinas dentro de los tejidos se encuentran en forma conjugada (Ceccarellil et al., 2000; Jourdain et al., 1997). Con el fin de seguir la cinética de los conjugados de AIA durante los periodos de pre-incubación e inducción de la ES, se sintetizaron y caracterizaron varios conjugados del AIA y se usaron el AIA-Ala y el AIA-Glu. Escogimos estos dos conjugados por su carácter contrastante, el primero es un compuesto que es utilizado por la célula como un depósito de AIA, ya que se puede hidrolizar para producir AIA libre, en tanto que el segundo conjugado que escogimos dirige al AIA a su degradación a través de un proceso de oxidación (Bartel et al., 2001; Woodward y Bartel, 2005). Los picos fueron analizados también con un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de masas. Los patrones de fraccionamiento entre los compuestos sintetizados y los picos de las muestras fueron similares.

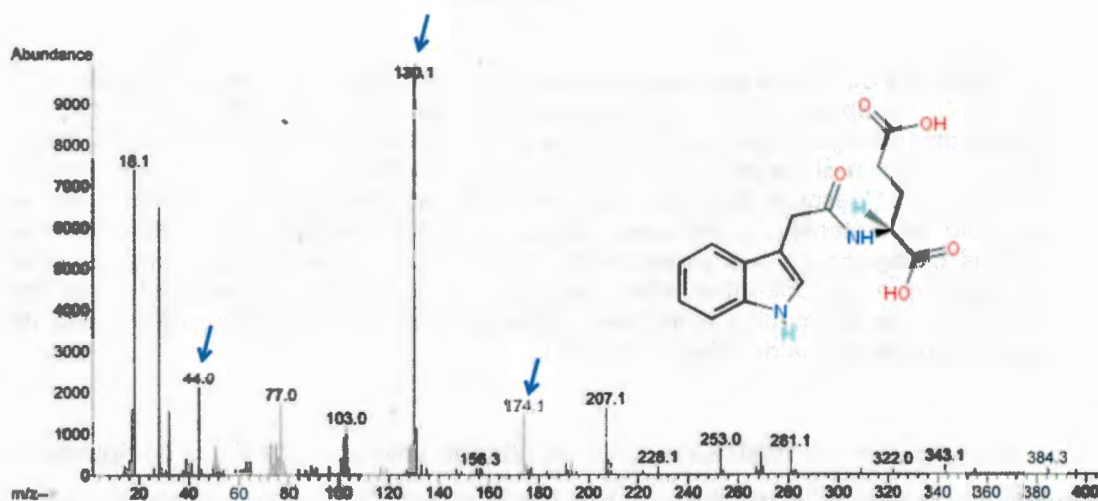


Figura 2.8 Patrón de fraccionamiento de la molécula de AIA-Glu. Las flechas indican los fragmentos mayoritarios.

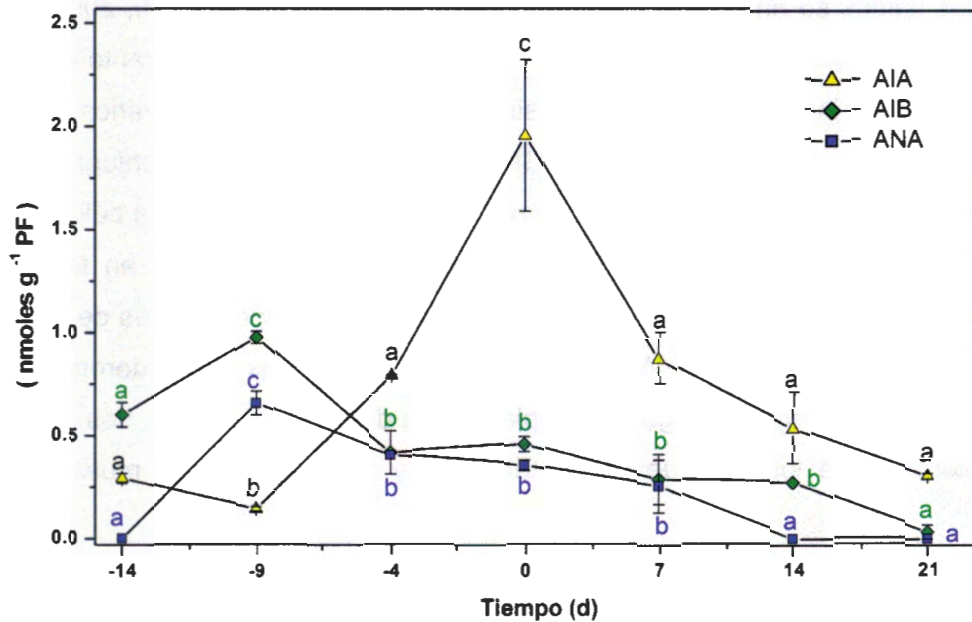


Figura 2.9 Contenido endógeno de auxinas libres antes y durante la inducción de la ES en *C. canephora*. Contenido endógeno de AIA (▲), AIB (◆), y ANA (■). Se colectaron 100 mg de tejido desde el inicio de la pre-incubación de las plántulas (días -14, -9 y -4) hasta el día de la inducción (día cero). También se colectaron muestras los días 7, 14 y 21 después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describió en materiales y métodos. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres replicas biológicas en dos experimentos diferentes. Las barras representan el error estándar ($n = 3$). Diferentes letras representan la significancia estadística de las diferencias de las medias entre cada determinación en un tiempo determinado de acuerdo con la prueba de Tukey ($P \leq 0.01$).

En los experimentos realizados, y los resultados obtenidos de estos compuestos en el contenido de conjugados del AIA, el AIA-Ala y el AIA-Glu en los tejidos foliares de *C. canephora*, antes del pre-tratamiento, fueron de 2.36 y 55.13 nmoles g⁻¹ PF, respectivamente. Esto significa que 99.49% del total de auxina en el tejido foliar encontraba en forma conjugada, en el análisis de estos compuestos (Figura 2.10). El contenido de los dos conjugados de AIA llegaron a un máximo de 99.67% cinco días después del inicio del pre-tratamiento, al final de este, el contenido de AIA fue del 1.67% del total de auxina. Este porcentaje de AIA libre correspondió a 1.95 nmoles g⁻¹ PF, mientras que el contenido de los conjugados alcanzaron valores de 10.20 y 104.72 nmoles g⁻¹ PF para el AIA-Ala y AIA-Glu, respectivamente. Esto representó un aumento

de más de 2 veces de la cantidad inicial de AIA y de sus conjugados al inicio de pre-incubación y únicamente el incremento del AIA fue de 6 veces más (Figura 2.10).

La cantidad del AIA y de sus conjugados disminuyó cinco veces durante los primeros 30 min de incubación de los explantes en el medio de inducción de ES. La cantidad de AIA disminuyó 26.4 veces y el conjugado AIA-Ala decreció por debajo de los niveles de detección, en tanto que el conjugado AIA-Glu se redujo 5 veces (Figura 2.10). Un día después de la inducción de la ES, la cantidad de AIA-Glu había disminuido a 9.12 nmoles g^{-1} PS y después de ello, disminuyó a un nivel por debajo del nivel de detección hasta el final del estudio (Figura 2.10). El destino del AIA-Ala fue muy diferente. Este compuesto disminuyó drásticamente durante los primeros 30 min de incubación de los explantes en el medio de cultivo de inducción de la ES, y entonces aumentó durante los siguientes días hasta 9.48 nmoles g^{-1} PF después de 21 días. Los conjugados de AIA alcanzaron un máximo del 98% del total de auxinas después de que los explantes se colocaron en el medio de inducción de la ES. Entonces, los conjugados, disminuyeron hasta 97.01% después de tres días del inicio de la inducción de la ES. Durante los siguientes once días, la concentración del AIA-Ala aumentó 4 veces más. Veintiún días después de la inducción de la ES, tiempo en el que se observan las primeras estructuras embriogénicas, y la concentración del conjugado AIA-Ala vuelve a 92 % (Figura 2.10).

El aumento en AIA libre que se puede determinar después de 14 días de pre-incubación de los explantes (Figura 2.10), lleva a dos posibilidades: una, la síntesis *de novo* del AIA, y la otra el aumento en el contenido del AIA proveniente de la hidrólisis de conjugados de AIA previamente sintetizados. Sin embargo, el aumento en el contenido de AIA-Ala sugiere que el aumento en el contenido del AIA se debió a la síntesis *de novo*. Para explorar esta posibilidad, analizamos la expresión de tres genes involucrados en la biosíntesis del AIA.

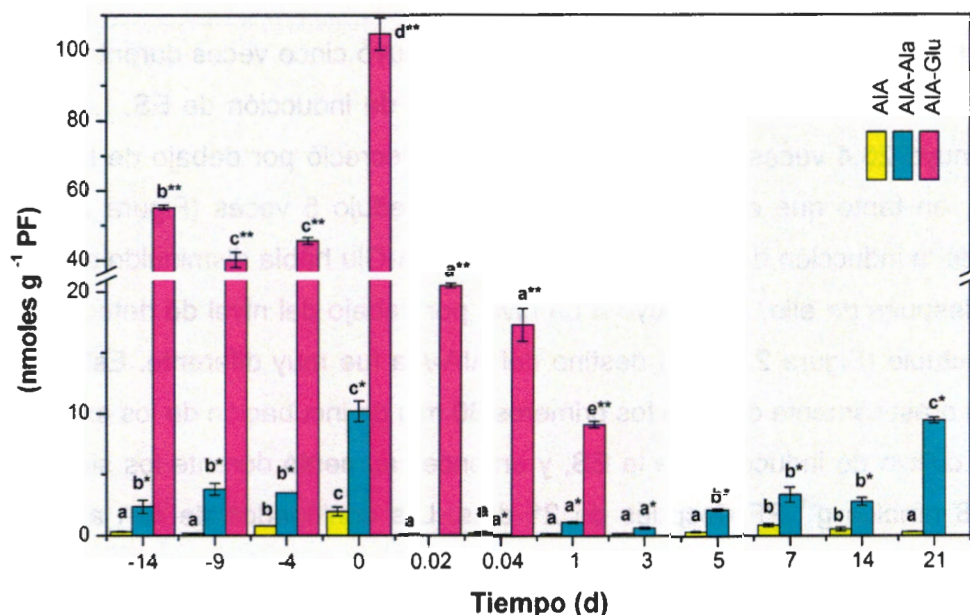


Figura 2.10 Contenido de AIA y sus conjugados, antes y durante la inducción de la ES en *C. canephora*. AIA (barras amarillas); AIA-Ala (barras azules); AIA-Glu (barras púrpura). Se colectaron 100 mg de tejido a partir del inicio de la pre-incubación de las plántulas (días -14, -9 y -4) y hasta el día de la inducción de la ES (día cero). También se colectaron muestras a los 0.02, 0.04, 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres replicas biológicas a partir de por lo menos dos experimentos diferentes. Las barras representan el error estándar ($n = 3$). Letras diferentes en las barras representan el nivel de significancia de la diferencia de las medias entre cada determinación a cada uno de los tiempos estudiados mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.01$).

2.7.4. Determinación del nivel de expresión de algunos genes involucrados en la homeostasis del AIA

El AIA es sintetizado a través de cinco diferentes rutas en las plantas superiores (Mano y Nemoto, 2012). Una ruta es a través de la biosíntesis del IPA. Esta reacción es catalizada por la triptofano aminotransferasa (*TAA1*; *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE of ARABIDOPSIS 1*), el IPA es convertido en AIA por el producto de una familia de genes, las flavínmonooxigenasas (*YUC*) (Mano y Nemoto, 2012). Se utilizó PCR cuantitativo para estimar la expresión de los genes *CcTAA1*, *CcYUC1* y *CcYUC3* durante el periodo de pre-incubación y durante la inducción de la ES (Figura 2.11).

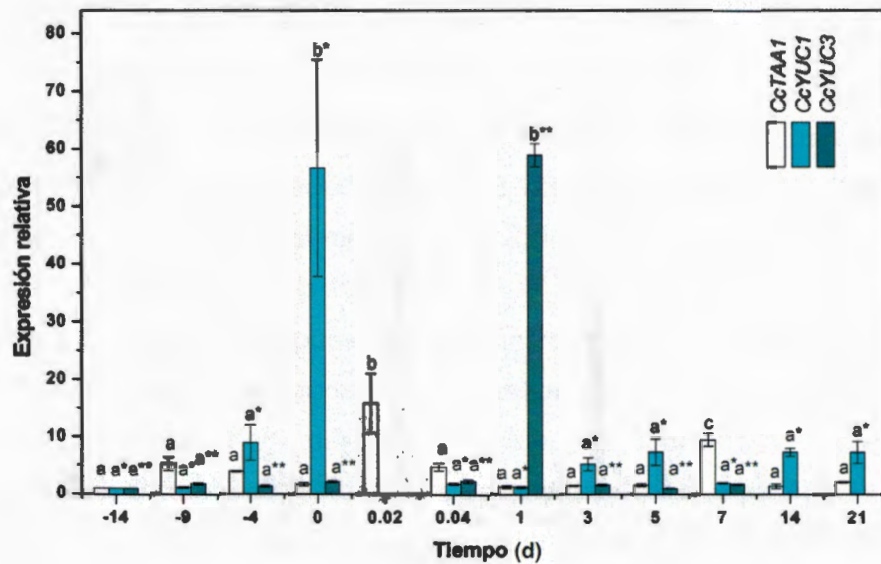


Figura 2.11 Análisis qPCR para la expresión de los genes *CcTAA1* (barras vacías), *CcYUC1* (barras azul claro) y *CcYUC3* (barras verdes). Se colectaron 100 mg de tejido a partir del inicio de la pre-incubación de las plántulas (días -14, -9 y -4) y hasta el día de la inducción de la ES (día cero). También se colectaron muestras a los 0.02, 0.04, 1, 3, 5, 7, 14 y 21 días después de la inducción de la ES. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se llevaron a cabo con tres replicas biológicas a partir de por lo menos dos experimentos diferentes. Las barras representan el error estándar ($n = 3$). Letras diferentes en las barras representan el nivel de significancia de la diferencia de las medias entre cada determinación a cada uno de los tiempos estudiados mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.01$).

La expresión del gen *CcTAA1* aumentó durante los primeros diez días de pre-incubación, alcanzando un máximo 30 min después de que los explantes fueron transferidos al medio de inducción de la ES y entonces disminuyó por los siguientes seis días. Siete días después de la inducción de la ES, y coincidiendo con un aumento en la cantidad de AIA libre, la expresión de *CcTAA1* aumentó a 9.5 veces el nivel inicial de expresión (Figura 2.11). Después de este aumento, *CcTAA1* disminuyó y permaneció alrededor del mismo nivel de expresión que tenía en las hojas de las plantas antes de la pre-incubación.

et al., 2011; 1988). Sin embargo, también es posible que la auxina exógena promueva la inhibición del AIA endógeno libre mediante reacciones de conjugación reversibles (Cohen y Bandursky, 1982; Michalczyk et al., 1992a). Además de estos dos factores, la aplicación exógena de auxinas modifica su transporte (Teale et al., 2006). En resumen, la homeostasis de las auxinas es crítica para la inducción del proceso de ES.

En nuestro modelo, hay un importante incremento tanto de la auxina libre como de sus conjugados amido durante el proceso de pre-incubación (Figuras 3.9 y 3.10). Se esperaba un aumento en la concentración de ANA en los tejidos, ya que este RCV se encuentra en el medio de cultivo. Sin embargo, el incremento en la concentración del AIA y del AIB fue sorprendentemente elevado. Es posible que este aumento sea una consecuencia de diversos factores, tales como su biosíntesis, hidrólisis a partir de conjugados previamente sintetizados o que sea el resultado del transporte de la auxina desde otros tejidos u órganos, puesto que las plantas regulan muy estrechamente los niveles celulares de AIA a través de estos mecanismos (Strader y Bartel, 2011). Al mismo tiempo, la mayor parte de las auxinas se encuentra en la forma de conjugados con aminoácidos y pueden llegar a ser hasta el 90% del total de auxinas. Resultados similares se han obtenido durante la ES en *D. carota*. La inducción de la ES en *D. carota* se lleva a cabo cultivando sus suspensiones celulares en presencia de 2,4-D. Entonces se elimina el 2,4-D y se diluye la densidad celular. La ES de *D. carota* se lleva a cabo en ausencia de auxina en el medio de inducción de la ES. Durante la inducción de la ES, 94% de las auxinas se encontraban en la forma química de conjugado éster o amida, y solamente 6% como auxina libre (Ceccarellil et al., 2000). Por otro lado, el 2,4-D induce la síntesis de AIA dependiente de triptofano en suspensiones celulares de *D. carota* durante la inducción de la ES. En *Medicago truncatula*, la adición de 2,4-D a células provenientes de protoplastos de hoja produce un aumento en la poza de AIA libre y de conjugados de AIA (Pasternak et al., 2002). Parece ser que la modificación de la poza interna de AIA es muy importante para que se inicien los procesos de morfogénesis. Por ejemplo, durante el enraizamiento de *Vigna radiata* se ha determinado que los niveles de auxinas libres permanecen altos durante la fase de inducción del enraizamiento y disminuyen justo al iniciar la fase de iniciación de enraizamiento (Flores Ortiz et al., 2009; Gaspar y Hofinger, 1988; Nag et al., 2001).

La modificación del AIA libre por conjugación es un mecanismo general para la regulación de su actividad y estabilidad (Westfall et al., 2012). Esta modificación es parte de la homeostasis de la planta y es muy importante para su desarrollo. Las plantas, en general, producen grandes cantidades de conjugados de AIA, como en el caso de *Arabidopsis* en la que se han determinado niveles de hasta aproximadamente el 90% del total de auxina en la forma de conjugados (Tam et al., 2000). Los conjugados de aminoácidos del AIA tienen actividad biológica en la células vegetales, y su actividad depende del tipo de aminoácido unido al AIA (Andreae y Good, 1955; Bialek et al., 1983; Feung et al., 1977; Hangarter et al., 1980; Hangarter y Good, 1981; Purves y Hollenberg, 1982). Entre los diferentes conjugados con aminoácidos del AIA ensayados para actividad biológica, el AIA-Ala es el más activo (Bialek et al., 1983), puesto que puede almacenarse y reusarse más tarde.

La disminución en la concentración endógena del AIA es esencial para el desarrollo de los embriones somáticos. En *D. carota*, el nivel de AIA disminuye 10 veces a partir de la concentración inicial en la formación de las primeras células (Michalczuk et al., 1992b), y lo mismo sucede en los embriones somáticos de *Abies alba* (Vondrakova et al., 2011). Se ha sugerido que en la presencia continua de auxina, las líneas celulares de zanahoria son capaces de desarrollar el estadio globular, pero no más allá (Borkird et al., 1986). Además, recientemente también se ha sugerido que la remoción de la auxina exógena del medio desencadena tanto el transporte polar como el establecimiento de un gradiente de auxina para la inducción de la ES (Bai et al., 2013; Su et al., 2009). Nuestros resultados muestran una aguda disminución, tanto en el contenido de auxina libre, como en sus conjugados amida durante los primeros 60 minutos de la inducción de la ES (Figura 2.10). Observamos que las primeras estructuras globulares aparecen después de que el nivel de AIA libre disminuye al mismo nivel que tenía en la planta original antes de la pre-incubación (Figura 2.9). Estos datos sugieren que la transición de un estadio indiferenciado al estadio globular requiere la expresión de nuevos genes que son sintetizados solamente cuando las auxinas endógenas son removidas. Sin embargo, los mecanismos que se llevan a cabo durante la inducción de la ES son pobremente entendidos.

Un aspecto que deberá analizarse con profundidad en el futuro es la participación del

AIB. La concentración endógena de AIB siguió un comportamiento paralelo al del AIA; sin embargo, no conocemos prácticamente nada sobre su papel en el proceso de morfogénesis. De lo poco que sabemos es que en hipocotilos y raíces de *A. thaliana* el transporte de AIB es mayor al transporte del AIA (Rashotte et al., 2003).

Una pregunta que aún permanece es, si el dramático aumento en el contenido de AIA endógeno producido por la presencia de ANA proviene de la síntesis *de novo* o se origina de la hidrólisis de los conjugados del AIA almacenados en la célula. En este estudio mostramos que durante la pre-incubación de los explantes hubo un aumento de 56 veces en la expresión del gen *CcYUC1* (Figura 2.11). Este gen codifica a una enzima clave (del tipo flavín monooxigenasa) en la biosíntesis de las auxinas (Mano y Nemoto, 2012). Recientemente, Bo et al. (2013) han demostrado que se requiere la síntesis de auxinas para la inducción de la ES en *A. thaliana* y es, al menos, parcialmente mediada por el nivel basal de etileno durante la inducción de la ES, sugiriendo que la respuesta a etileno es importante para la inducción de la ES.

En *Coffea canephora* se ha seleccionado estudiar la expresión de tres genes de la familia *GH3*: *GH3.1*, *GH.6* y *GH3.17* que usan como sustrato al AIA libre. Se determinó un aumento en la transcripción del gen *CcGH3.17* al final del periodo de incubación (Figura 2.12). Este aumento podría explicar el gran incremento en el contenido de conjugados de AIA determinados al mismo tiempo (Figura 2.10). Durante el día tres hay un importante aumento en la expresión del gen *CcGH3.1*, justo cuando inicia el incremento en la concentración de AIA-AIa.

La presencia de auxina exógena eleva, tanto el AIA libre, como los conjugados del AIA con aminoácidos durante el periodo de pre-incubación. Por lo menos en parte, el aumento en el contenido de auxina se debe a la síntesis *de novo*. Este aumento en la cantidad de auxina endógena es indispensable para cambiar el programa genético de las células y prepararlas para la segunda fase. Hasta ahora, se conoce muy poco de cómo la auxina exógena usada en la primera fase interactúa con la homeostasis de la auxina endógena del explante usado para la inducción de la ES durante la fase de inducción.

Durante los últimos años, el entendimiento del papel de la homeostasis de las auxinas durante la inducción de la ES ha mejorado notablemente. Sin embargo, todavía hay

importantes huecos en el conocimiento de este proceso. Se puede concluir que la inducción de la ES en explantes de *C. canephora* depende tanto de la auxina endógena como de la concentración de la auxina exógena. Los resultados aquí mostrados sugieren que el balance entre la concentración del AIA libre, y sus conjugados amida, es necesario para permitir la expresión de su potencial embriogénico. El siguiente paso será entender cómo la homeostasis de las auxinas modifican el programa genético de la célula para producir una nueva planta, en particular el papel del transporte de las auxinas y sus conjugados.

BIBLIOGRAFÍA

- Andreae W. A. y N. E. Good (1955). The formation of indoleacetylaspartic acid in pea seedlings, *Plant Physiology*, 30: 380-382.
- Bai B., Y. H. Su, J. Yuan y X. S. Zhang (2013). Induction of somatic embryos in *Arabidopsis* requires local *YUCCA* expression mediated by the down-regulation of ethylene biosynthesis, *Molecular Plant*, (En prensa).
- Bartel B., S. LeClere, M. Magidin y B. K. Zolman, (2001). Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: *de novo* synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation, *J. Plant Growth Regulation*, 20: 198-216.
- Bialek K., W. J. Meudt y J. D. Cohen (1983). Indole-3-acetic acid (IAA) and IAA conjugates applied to bean stem sections, *Plant Physiology*, 73: 130-134.
- Bögre L., I. Stefanov, M. Abrahám, I. Somogyi y D. Dudits (1990). Differences in responses to 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D) treatment between embryogenic and non-embryogenic lines of alfalfa, en: *Progress in plant cellular and molecular biology*, (Nijkamp H. J. J., L. H. W. Van der Plas y J. Van Aartrijk, eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 427-436.
- Borkird C., J. H. Choi y Z. R. Sung (1986). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot, *Plant Physiology*, 81: 1143-1146.
- Ceccarellil N., A. Monding, M. Curadi, R. Lorenzi y F. L. Schiavo (2000). Auxin metabolism and transport in an embryogenic cell line of *Daucus carota* L, *J. Plant Physiology*, 157: 17-23.
- Chen Q., C. S. Westfall, L. M. Hicks, S. Wang y J. M. Jez (2010). Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase, *J. Biol. Chem.*, 285: 29780-29786.
- Chiwocha S. D. S., S. R. Abrams, S. J. Ambrose, A. J. Cutler, M. Loewen, A. R. S. Ross y A. R. Kermode (2003). A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds, *Plant J.*, 35: 405-417.
- Cohen J. D. y R. S. Bandursky (1982). Chemistry and physiology of the bound auxins, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 33: 403-430.
- Davies P. J (1972). The fate of exogenously applied indoleacetic acid in light grown stems, *Physiologia Plantarum*, 27: 262-270.
- Feung C. S., R. H. Hamilton y R. O. Mumma (1977). Metabolism of indole-3-acetic acid, *Plant Physiology*, 59: 91-93.

- Flores Ortiz C. M., A. Cabañas-Cabrera, I. P. Peñalosa Castro, R. E. Quintanar Zúñiga, J. Vázquez Medrano y M. A. Urzúa Meza (2009). Endogenous auxins, IAA-oxidase and rooting in *Vigna radiata* L. Wilczek induced by exogenous free and conjugated auxin., *Rev. Fitotec. Mex.*, 32: 61-66.
- Fujimura T. y A. Komamine (1979). Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture, *Z. Pflanzenphysiol.*, 95: 13-19.
- Gaspar T. y M. Hofinger (1988). Auxin metabolism during adventitious rooting, *Adv. Plant Sci. Ser.*, 2: 117-131.
- Hagen G., A. Kleinschmidt y T. Guilfoyle (1984). Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections, *Planta*, 162: 147-153.
- Hall T. A (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acid Symp. Ser.*, 41: 95-98.
- Hangarter R. P. y N. E. Good (1981). Evidence that IAA conjugates are slow-release sources of free IAA in plant tissues, *Plant Physiology*, 68: 1424-1427.
- Hangarter R. P., M. D. Peterson y N. E. Good (1980). Biological activities of indoleacetyl amino acids and their use as auxins in tissue culture, *Plant Physiology*, 65: 761-767.
- Ivanova A., M. Velcheva, P. Denchev, A. Atanassov y H. A. Van Onckelen (1994). Endogenous hormone levels during direct somatic embryogenesis in *Medicago falcata*, *Physiologia Plantarum* 92: 85-89.
- Jiménez V. M. y F. Bangerth (2001). Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot, *Physiologia Plantarum*, 111: 389-395.
- Jourdain I., M. A. Lelu y P. Label (1997). Hormonal changes during growth of somatic embryogenic masses in hybrid larch, *Plant Physiol. Biochem.*, 35: 741-749.
- Livak K. J. y T. D. Schmittgen (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods*, 25: 402-408.
- Mano Y. y K. Nemoto (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants, *J. Exp. Bot.*, 63: 2853-2872.
- Michalczyk L., T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992a). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis, *Phytochemistry*, 31: 1097-1103.
- Michalczyk L., D. M. Ribnicky, T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992b). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures, *Plant Physiology*, 100: 1346-1353.
- Moloney M. M., J. F. Hall, G. M. Robinson y M. C (1983). Elliott, Auxin requirements of

sycamore cells in suspension culture, *Plant Physiology*, 71: 927-931.

- Murashige T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nag S., K. Saha y M. A. Choudhuri (2001). Role of auxin and polyamines in adventitious root formation in relation to changes in compounds involved in rooting, *J. Plant Growth Regulation*, 20: 182-194.
- Okrent R. y M. Wildermuth (2011). Evolutionary history of the GH3 family of acyl adenylases in rosids, *Plant Molecular Biology*, 76: 489-505.
- Pasternak T. P., E. Prinsen, F. Ayaydin, P. Miskolczi, G. Potters, H. Asard, H. A. Van Onckelen, D. Dudits y A. Fehér (2002). The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa, *Plant Physiology*, 129: 1807-1819.
- Pescador R., G. B. Kerbauy, W. Melo Ferreira, E. Purgatto, R. M. Suzuki y M. P. Guerra (2012). A hormonal misunderstanding in *Acca sellowiana* embryogenesis: levels of zygotic embryogenesis do not match those of somatic embryogenesis, *Plant Growth Regulation*, 68: 67-76.
- Purves W. K. y S. M. Hollenberg (1982). Metabolism of exogenous indoleacetic acid to its amide conjugates in *Cucumis sativus* L, *Plant Physiology*, 70: 283-286.
- Quiroz-Figueroa F. R., M. Monforte-González, R. M. Galaz-Avalos y V. M. Loyola-Vargas (2006). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*, en: *Plant cell culture protocols*, (Loyola-Vargas V. M. y F. A. Vázquez-Flota, eds.), Humana Press, Totowa, New Jersey, 111-117.
- Rashotte A. M., J. Poupart, C. S. Waddell y G. K. Muday (2003). Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 133: 761-772.
- Ribnicky D. M., N. Ilic, J. D. Cohen y T. J. Cooke (1996). The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. The implications for carrot somatic embryogenesis, *Plant Physiology*, 112: 549-558.
- Rossin C. B. y M. E. C. Rey (2011). Effect of explant source and auxins on somatic embryogenesis of selected cassava (*Manihot esculenta* Crantz) cultivars, *S. Afr. J. Bot.*, 77: 59-65.
- Schiavone F. M. y T. J. Cooke (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors, *Cell Differ.*, 21: 53-62.
- Staswick P. E., I. Tiryaki y M. Rowe (2002). Jasmonate response locus *JAR1* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for

- adenylation, *Plant Cell*, 14: 1405-1415.
- Strader L. C. y B. Bartel (2011). Transport and metabolism of the endogenous auxin precursor indole-3-butyric acid, *Mol. Plant*, 4: 477-486.
- Su Y. H., X. Y. Zhao, Y. B. Liu, C. L. Zhang, S. D. O'Neill y X. S. Zhang (2009). Auxin-induced *WUS* expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*, *Plant J.*, 59: 448-460.
- Tam Y. Y., E. Epstein y J. Normanly (2000). Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose, *Plant Physiology*, 123: 589-596.
- Teale W. D., I. A. Paponov y K. Palme (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7: 847-859.
- Terol J., C. Domingo y M. Talón (2006). The GH3 family in plants: Genome wide analysis in rice and evolutionary history based on EST analysis, *Gene*, 371: 279-290.
- Thompson J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.*, 22: 4673-4680.
- Vondrakova Z., K. Eliášová, L. Fischerová y M. Vágner (2011). The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*, *Cen. Eur. J. Biol.*, 6: 587-596.
- Wang H., C. e. Tian, J. Duan y K. Wu (2008). Research progresses on *GH3s*, one family of primary auxin-responsive genes, *Plant Growth Regulation*, 56: 225-232.
- Wenck A. R., B. V. Conger, R. N. Trigiano y C. E. Sams (1988). Inhibition of somatic embryogenesis in orchardgrass by endogenous cytokinins, *Plant Physiology*, 88: 990-992.
- Westfall C. S., C. Zubieta, J. Herrmann, U. Kapp, M. H. Nanao y J. M. Jez (2012). Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins, *Science*, 336: 1708-1711.
- Woodward A. W. y B. Bartel (2005). Auxin: regulation, action, and interaction, *Ann. Bot.*, 95: 707-735.
- Zenk M. H (1962). Aufnahme und Stoffwechsel von α -Naphthyl-Essigsäure durch Erbsenepicotyle, *Planta*, 58: 75-94.

CAPÍTULO III**CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS**

En este trabajo, utilizando como modelo de estudio la ES en *C. canephora*, se cuantificaron los niveles de las auxinas ANA, AIB y AIA durante las etapas de pre-acondicionamiento e inducción de la ES y se determinó que la presencia de una auxina exógena provoca un aumento en la concentración de los reguladores del crecimiento endógenos, así como en la de sus conjugados durante el pre-acondicionamiento de los explantes. Durante la fase de inducción de la ES la concentración de las auxinas libres, así como la de sus conjugados disminuyó rápidamente. Esta dinámica, de aumento y disminución de auxinas, se ve acompañada de una dinámica prácticamente paralela en la expresión de varios de los genes que codifican a algunas de las enzimas involucradas en la homeostasis de las auxinas durante la inducción de la ES.

Durante la etapa de pre-acondicionamiento el ANA actúa como una molécula señal que origina la producción de auxinas endógenas, como AIB y AIA. Para que esto ocurra, es necesario que se expresen genes relacionados a su proceso de biosíntesis, como los miembros de la familia *STY*, los cuales son indispensables para disparar la expresión de los genes de la familia *YUC* (Sohlberg et al., 2006) (Figura 2.11). Estos genes están involucrados en la biosíntesis del AIA (Stepanova et al., 2011).

Posteriormente, en respuesta a los niveles elevados de auxinas endógenas, se promueve la degradación del represor aux/AIA, via el proteosoma 26S (Figura 1.6) resultando en la desrepresión de los activadores ARFs y en la expresión transcripcional de genes de respuesta a auxina. Entre estos genes se encuentran los genes de la familia *GH3*. Estos genes se transcriben y la proteína producto de su transcripción conjuga al AIA con aminoácidos tales como el ácido glutámico y alanina.

Más adelante, cuando se apaga el estímulo (ANA y AIA), la expresión de genes involucrados en su biosíntesis, como los miembros de la familia *YUC*, disminuyen su expresión hasta niveles basales y los represores aux/IAA se vuelven a asociar con los factores ARF lo que impide la expresión de los genes de respuesta a auxina como los *GH3* (Tomas y Perrot-Rechenmann, 2010) y genes relacionados.

Con los datos obtenidos hasta el momento hemos elaborado el modelo propuesto en la Figura 3.1.

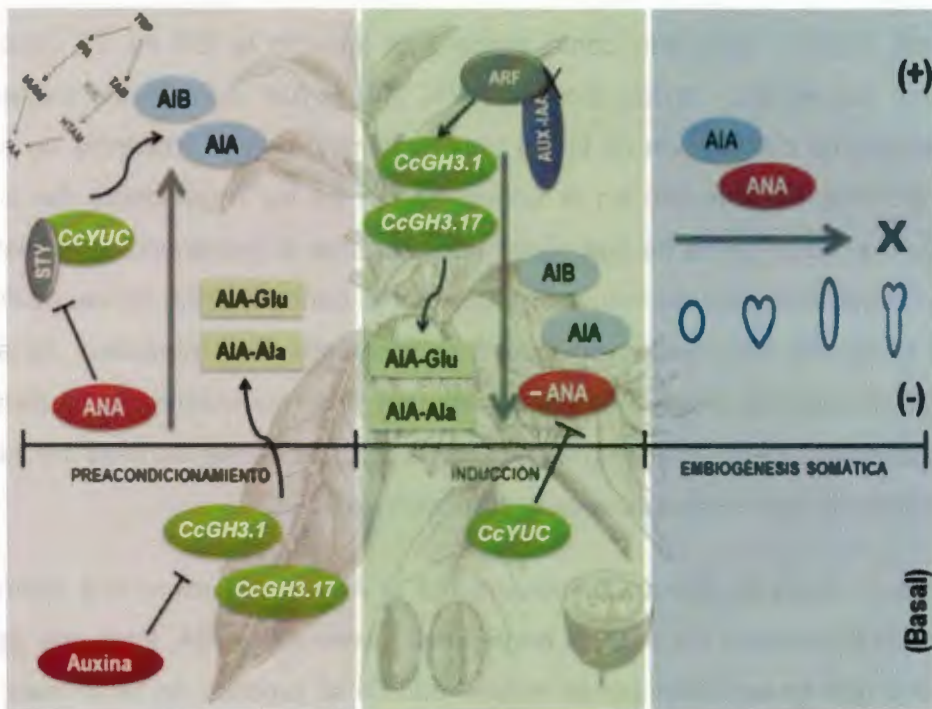


Figura 3.1 Modelo propuesto sobre la participación de las auxinas y sus conjugados durante el proceso de pre-acondicionamiento e inducción de la ES en *C. canephora*. Se propone en este estudio que los reguladores de RCV de tipo sintético como el ANA, participan en la activación de diferentes RCV de origen natural como el AIA, AIB, así como algunos de sus conjugados AIA-Ala y AIA-Glu. Estos son activados por diferentes factores genéticos para su biosíntesis (*CcTAA1*, *CcYUC1*, *CcYUC3*) y conjugación (*CcGH3.1*, *CcGH3.6*, *CcGH3.17*) en ausencia de ANA para dar inicio a la reprogramación de la ES.

Los resultados presentados en este trabajo abren la posibilidad de nuevos estudios que permitan, en primer lugar, entender el papel de la homeostasis de las auxinas en el proceso de ES. En segundo lugar, como parte del proceso de homeostasis, contestar a la pregunta ¿cómo participa el transporte de auxinas en el establecimiento de las estructuras embriónicas? También será importante determinar la concentración de los componentes de la homeostasis de las auxinas *in situ* con el fin de determinar si existen células que acumulen diferencialmente auxinas y de esta forma respondan al proceso de diferenciación, y sobre todo, determinar cuál es la función y relación de las auxinas, tanto endógenas como exógenas en la inducción del proceso embriónico. Un aspecto que deberá analizarse con profundidad en el futuro es la participación del AIB y sus

conjugados y ¿Cuál es su relación durante este proceso? Otro aspecto que aún permanece es, si el dramático aumento en el contenido de AIA endógeno producido por la presencia de ANA proviene de la síntesis *de novo* o se origina de la hidrólisis de los conjugados del AIA almacenados en la célula. Por otra parte también se seguirá el estudio del papel que juegan las citocininas para la comprensión en función de auxinas.

BIBLIOGRAFÍA

- Borkird C., J. H. Choi y Z. R. Sung (1986). Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot, *Plant Physiology*, 81: 1143-1146.
- Halperin W. y D. F. Wetherell, (1965). Ontogeny of adventive embryos of wild carrot, *Science*, 147: 756-758.
- Michalczuk L., T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992a). Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis, *Phytochemistry*, 31: 1097-1103.
- Michalczuk L., D. M. Ribnicky, T. J. Cooke y J. D. Cohen (1992b). Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures, *Plant Physiology*, 100: 1346-1353.
- Schiavone F. M. y T. J. Cooke (1987). Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors, *Cell Differ.*, 21: 53-62.
- Sohlberg J. J., M. Myrenas, S. Kuus, U. Lagercrantz, M. Kowalczyk, G. Sandberg y E. and Sundberg (2006). STY1 regulates auxin homeostasis and affects apical-basal patterning of the *Arabidopsis gynoecium*, *Plant J.*, 47: 112-117.
- Stepanova A. N., J. Yun, L. M. Robles, O. Novak, W. He, H. Guo, K. Ljung y J. M. Alonso (2011). The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis, *Plant Cell*, 23: 3961-3973.
- Tromas A. y C. Perrot-Rechenmann (2010). Recent progress in auxin biology, *C. R. Biol.*, 333: 297-306.
- Zimmerman J. L (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants, *Plant Cell*, 5: 1411-1423.

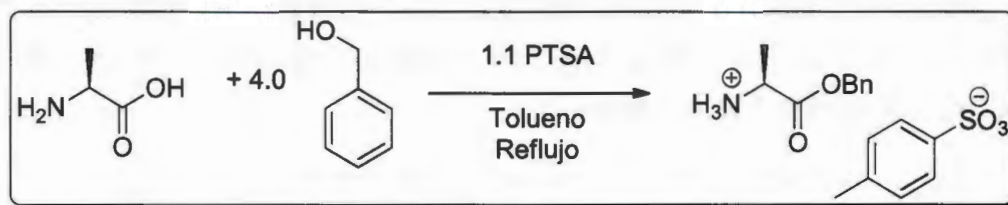
ANEXOS

ANEXO 1.1

1.2 SÍNTESIS DE CONJUGADOS DEL ÁCIDO-3-INDOL ACÉTICO

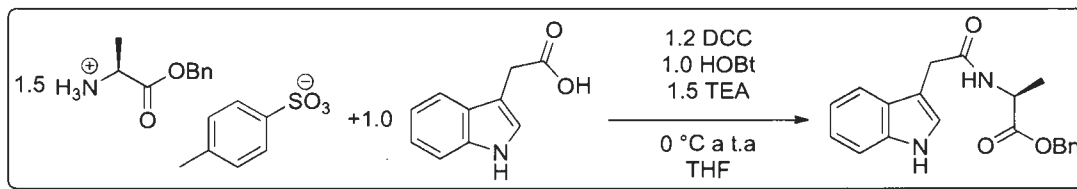
1.2.1. Ácido indol-3-acetil-L-alanina

En un matraz de bola se colocaron 3.36 mmol (300 mg, 1.0 equivalente) de L-alanina, 3.7 mmol (712 mg, 1.1 equivalente) de ácido p-toluensulfónico (PTSA) y 13.4 mmol (1.4 mL, 4.0 equivalente) de alcohol bencilico y se disolvieron en 5.6 mL de tolueno. La mezcla se calentó a reflujo durante 5 horas en una atmósfera de N₂. Una vez transcurrido este tiempo, el disolvente se evaporó en un rotavapor. Se adicionó un volumen de benceno y un volumen de éter etílico frío y se dejó cristalizar. Se obtuvieron cristales blancos con un rendimiento del 36%.



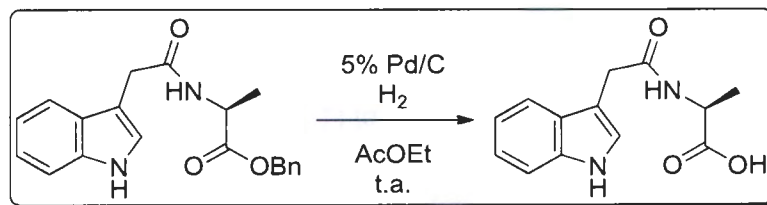
En un matraz balón se disolvieron 4.3 mmol (1.5 g, 1.5 equivalente) de la sal sulfónica de la L-alanina dibencil éster y 2.85 mmol (385 mg, 1.0 equivalente) de hidroxibenzotriazol en 15 mL de tetrahidrofurano (THF) seco. Se dejó homogeneizar y después el matraz fue introducido a un baño de hielo. Se adicionaron 3.42 mmol (705.6 mg, 1.2 equivalente) de diciclohexilcarbodiimida (DCC) y la reacción se llevo a cabo a una temperatura de 0° C durante 1 h. Se adicionaron 2.85 mmol (500 mg, 1.0 equivalente) de AIA y 4.3 mmol (0.6 mL, 1.5 equivalente) de trietiletanolamina (TEA). Se dejó reaccionar durante 60 min y después se espero a que subiera la temperatura hasta temperatura ambiente y se dejó en agitación durante 12 h. El producto de la reacción fue filtrado en un embudo de vidrio sinterizado, utilizando acetato de etilo para hacer los lavados. El líquido filtrado se adsorbió en sílica gel y se purificó a través de una columna de sílica gel utilizando un gradiente de acetato de etilo/hexanos como eluentes. El producto, el AIA-Ala dibencil

éster eluyó con 30% de acetato de etilo/70% hexanos. El rendimiento del producto fue de 80%.



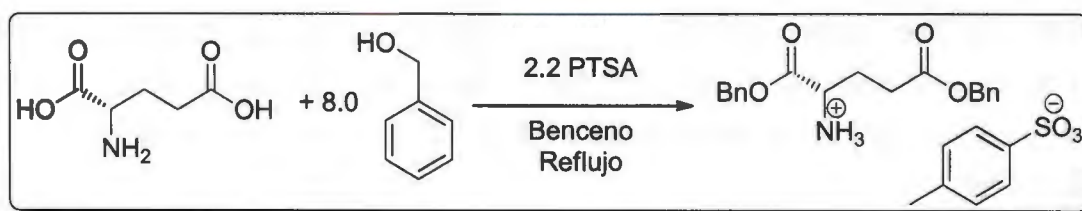
En un matraz balón se adicionaron 1.49 mmol (500 mg, 1.0 equivalente) del ácido-3-(indolilacetil)-DL-aspartico y se disolvieron en 29 ml de AcOEt. Se adicionaron 0.074 mmol (158.1 mg, 0.05 eq) de Pd/C al 5% y se colocó bajo atmósfera de H₂. Se dejó en agitación vigorosa durante 5 h. El crudo se pasó por una cama de celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvieron 286.6 mg (78%) de un sólido de color beige. El producto fue caracterizado por ¹H NMR y GC-MS.

¹H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.82 (s, ¹H), 8.22 (d, *J* = 7.1 Hz, ¹H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, ¹H), 7.29 (d, *J* = 8.0 Hz, ¹H), 7.16 (s, 1H), 7.09 – 6.98 (m, ¹H), 6.97 – 6.87 (m, ¹H), 4.32 – 4.06 (m, ¹H), 3.50 (s, ²H), 1.36 – 1.16 (m, ³H).

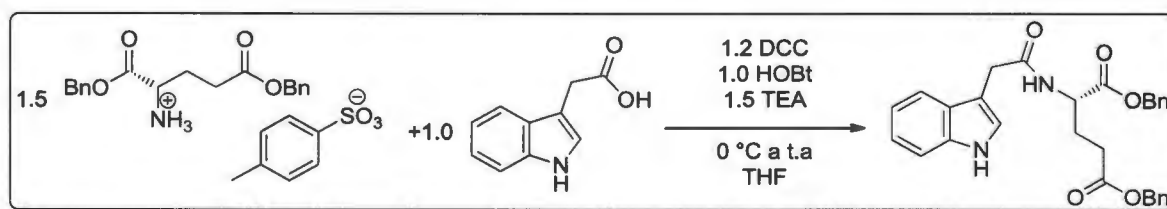


1.2.2. Ácido indol-3-acetil-L-glutámico

En un matraz de bola conteniendo una barra de agitación se colocaron 1.6 mmol (300 mg, 1.0 equivalente) del hidrocloreuro del ácido L-glutámico, 3.6 mmol (862 mg, 2.2 equivalente) de ácido *p*-toluensulfónico y 13 mmol (1.7 mL, 8.0 equivalente) de alcohol bencílico y se disolvieron en 4 mL de benceno y se dejó en agitación para homogenizar la mezcla. La mezcla se calentó a reflujo durante 5 h. Una vez transcurrido este tiempo, se evaporó el disolvente en un rotavapor. Se adicionó un volumen de benceno y un volumen de éter etílico frío y se dejó cristalizar. Se obtuvo el producto como cristales blancos con un rendimiento cuantitativo.



En un matraz balón se disolvieron 0.85 mmol (427.7 mg, 1.5 equivalente) de la sal sulfónica del ácido L-glutámico dibencil éster y 0.57 mmol (77.2 mg, 1.0 equivalente) de hidroxibenzotriazol en 3 mL de THF seco. Se dejó homogenizar. El matraz fue introducido a un baño de hielo y se adicionaron 0.68 mmol (141 mg, 1.2 equivalente) de DCC y la reacción se llevo a cabo a 0° C durante 1 h. A 0 °C se adicionaron 0.57 mmol (100 mg, 1.0 equivalente) de AIA y 0.86 mmol (0.12 mL, 1.5 equivalente) de TEA. Se dejó reaccionar durante 15 min y después se dejó que la temperatura subiera hasta temperatura ambiente, manteniendola en agitación durante 12 h. El producto de la reacción fue filtrado en un embudo de vidrio sinterizado, utilizando acetato de etilo para hacer los lavados. El líquido filtrado se lavó con HCl al 10% (2x 10 mL), con K₂CO₃ al 5% (2x 10 mL) y salmuera (3x 10 mL). La fase orgánica se secó con MgSO₄ anhidro, se filtró y se adsorbió en sílica gel para su purificación por columna de sílica gel utilizando una mezcla de acetato de etilo/hexanos. Se obtuvo el producto como un sólido blanco con un 66% de rendimiento.



En un matraz balón se adicionaron 0.206 mmol (100 mg, 1.0 equivalente) del ácido-indol-3-acetil-L-glutámico dibencil éster y se disolvió en 4.1 mL de acetato de etilo. Se adicionaron 0.0103 mmol (21.9 mg, 0.05 eq) de Pd/C al 5% y se colocó bajo una atmósfera de H₂. Se dejó en agitación vigorosa durante 5 h. El producto se pasó por una cama de celita y el disolvente se evaporó a presión reducida. Se obtuvieron 28.4 mg (48 %) de un sólido color beige. El producto fue caracterizado por 1H NMR y GC-MS.

^1H NMR (300 MHz, DMSO) δ 10.82 (s, ^1H), 8.23 (d, $J = 7.8$ Hz, ^1H), 7.51 (d, $J = 7.7$ Hz, ^1H), 7.30 (d, $J = 8.0$ Hz, ^1H), 7.15 (d, $J = 1.9$ Hz, ^1H), 7.09 – 6.97 (m, ^1H), 6.97 – 6.86 (m, ^1H), 4.18 (td, $J = 7.9, 4.8$ Hz, ^1H), 3.52 (s, ^2H), 2.28 – 2.20 (t, ^2H), 2.00 – 1.86 (m, ^2H), 1.83 – 1.69 (m, ^2H).

