



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**CONSTRUCCIÓN DEL RECEPTOR QUIMÉRICO
BRI1::SERK1 Y SU USO PARA LA
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TEJIDOS DE
Coffea canephora L.**

Tesis que presenta

MIGUEL DAVID MARFIL SANTANA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2012



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: "CONSTRUCCIÓN DEL RECEPTOR QUIMÉRICO BRI1::SERK1 Y SU USO PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE TEJIDOS DE *Coffea canephora* L.", fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar, dentro de la Opción Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela

Director Académico

Mérida, Yucatán, México, 16 de agosto de 2012.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Firma:  _____

Miguel David Marfil Santana

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 "IDENTIFICACIÓN DE PROCESOS CELULARES MODIFICADOS POR LA ACTIVACIÓN ECTÓPICA DEL DOMINIO DE CINASA DEL RECEPTOR SERK1 DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE *Coffea canephora*", bajo la dirección del Dr. José Juan Zúñiga Aguilar.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi asesor Dr. José Juan Zúñiga por permitirme desarrollar mi creatividad e interés por la ciencia y su apoyo durante las etapas diferentes que pase para llegar a este momento.

Agradezco a mi comité evaluador: Dr. Iván Estrada, Dr. Enrique Castaño, Dr. Gregorio Godoy, y la Dra. Renata Rivera. Por su valiosa contribución académica a la versión final de esta tesis y a todos mis profesores de posgrado, por su valiosa influencia y enseñanzas que me dejaron.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para poder realizar mis estudios de posgrado.

Agradezco a los técnicos de laboratorio y amigos M.C. Ramón Sousa, Ing. Wilma Gonzalez, M.C. Adolfo, M.C. Elide Avilés.

Agradezco a mis compañeros y amigos del laboratorio 26, Martha, Juan, Yalien, Lourdes, Yusira, Daniel, Doribet.

Agradezco en especial a la Dra. Maria por la paciencia y apoyo durante este tiempo de estrés y fatiga para poder concluir con éxito este periodo de estudios.

Agradezco a todos mis amigos y compañeros del posgrado de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular.

A mis bebés (Ilka, David, Kaled) que son los que más han sufrido con este periodo y siempre están para alegrarme.

DEDICATORIAS

Les dedico esta tesis a mis hijos Ilka Marfil, David Marfil, Kaled Marfil, que son los que merecen más que nadie este reconocimiento. Que fue por ellos, y para ellos que decidí realizar este posgrado.

El lamento de un Alma, es tan grande

Como sus desesperación por

alcanzar sus sueños

Miguel Marfil

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1 LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	3
1.2 ASPECTOS MOLECULARES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	5
1.3 SEÑALES EMBRIOGÉNICAS.....	7
1.4 SEÑALES EXTRACELULARES.....	9
1.5 PROBLEMÁTICA EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA <i>IN VITRO</i>	11
1.6 RECEPTOR TIPO CINASA EN LAS PLANTAS.....	12
1.7 MOTIVOS EN EL DOMINIO EXTRACELULAR DE LAS RLKS.....	15
1.8 MODO DE ACCIÓN DE LAS RLKS <i>IN VIVO</i>	16
1.9 EL RECEPTOR BRI1.....	18
1.10 EL RECEPTOR SERK1.....	19
1.11 LOS RECEPTORES QUIMÉRICOS.....	21
1.12 OBJETIVO GENERAL.....	23
1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
1.14 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	24
BIBLIOGRAFÍA.....	25

CAPITULO II.....	35
DISEÑO DEL RECEPTOR QUIMÉRICO BRI::SERK1.....	35
2.1 INTRODUCCIÓN.....	35
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
2.2.1 MATERIAL VEGETAL.....	37
2.2.2 VECTOR DE CLONACIÓN PUC 57.....	37
2.2.3 VECTOR BINARIO pCAMex.....	38
2.2.4 DISEÑO DEL RECEPTOR QUIMÉRICO.....	39
2.2.5 REACCIONES DE LIGACIÓN.....	40
2.2.6 VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DEL INSERTO EN pCAMeX.....	41
2.3 RESULTADOS.....	42
2.3.1 DISEÑO DEL RECEPTOR QUIMÉRICO BRISERK1.....	42
2.3.2 VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL DE LA QUIMERA BRISERK1.....	43
2.3.3 SUBCLONACIÓN DE BRISER1 EN EL VECTOR pCAMex.....	45
2.3.4 VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DEL CDNA DE BRISER1 EN pCAMex.....	49
2.4 DISCUSIÓN.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53
CAPÍTULO III.....	55
IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR QUIMÉRICO EN TEJIDOS DE COFFEA CANEPHORA.....	55

3.1 INTRODUCCIÓN.....	55
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	56
3.2.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	56
3.2.2 <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	56
3.2.2.1 PREPARACIÓN DEL CULTIVO DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	56
3.2.3 TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTES DE <i>COFFEA CANEPHORA</i>	57
3.2.4 DETERMINACIONES DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA β -GLUCURONIDASA (GUS)...	58
3.2.5 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN ARN TOTAL.....	58
3.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ADN.....	59
3.2.7 ANÁLISIS DE LA INTEGRACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN BRISER1.....	59
3.2.8 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA B-GLUCURONIDASA Y BRISERK1....	60
3.3 RESULTADOS.....	61
3.3.1 TRASFORMACIÓN DE PLÁNTULAS CON EL ADNc QUIMÉRICO BRISERK1 MEDIANTE INFILTRACIÓN DE <i>AGROBACTERIUM TUMEFACIENS</i>	61
3.3.2 EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN <i>UID A</i> (B-GLUCURONIDASA).....	62
3.3.3 EXTRACCIÓN DE ADN TOTAL DE EMBRIONES TRANSFORMADO.....	63
3.3.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ADNC DE LA B-GLUCURONIDASA Y BRISERK1 A PARTIR DE ADN GENÓMICO.....	63
3.3.5 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL DE EMBRIONES TRANSFORMADOS.....	65
3.3.6 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA B-GLUCURONIDASA Y BRISERK1..	65
3.4 DISCUSIÓN.....	69

BIBLIOGRAFÍA.....	71
CAPÍTULO IV	75
DISCUSIÓN GENERAL.....	75
BIBLIOGRAFÍA.....	79
CAPÍTULO V	81
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	81
ANEXOS	85
ANEXO I. BRI1.....	85
ANEXO II. BRISERK1.....	89
ANEXO III. SITIOS DE UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN.....	93

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Comparación de estructuras embriogénicas entre los diferentes estadios de la embriogénesis somática y cigótica.....	4
Figura 1.2 Representación esquemática de la activación de los receptores RLK...	13
Figura 1.3 Representación esquemática de los dominios de los receptores tipo cinasas, RLK y RLCK.....	14
Figura 1.4 Activación de receptores RTK por reconocimiento de su ligando.....	17
Figura 1.5 Estructura de los dominios del receptor BRI1.....	19
Figura 1.6 Estructura del receptor tipo cinasa SERK1 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	20
Figura 1.7 Esquemización de la construcción de un receptor quimérico tipo LRR.	22
Figura 2.1 Esquema del vector de clonación pUC57.....	37
Figura 2.2 Vector binario pCAMex.....	38
Figura 2.3 Diagrama esquemático de la construcción del receptor quimérico tipo cinasa BRISERK1 a partir de dos RLK diferentes.....	40
Figura 2.4 Esquema de la verificación en la orientación del inserto BRISERK1 en pCAMex.....	42
Figura 2.5 Representación esquemática del receptor tipo cinasa quimérico BRISER1.....	43
Figura 2.6 Amplificación de la quimera BRISERK1.....	44
Figura 2.7 Fraccionamiento de la digestión del plásmido pBRISERK1.....	45
Figura 2.8 Digestión enzimática de los plásmidos pBRISERK1 y pCAMex.....	46

Figura 2.9 Ligación del fragmento BRISER1 en el vector pCAMex.....	48
Figura 2.10 Verificación por PCR de la inserción del fragmento BRISERK1 en el vector pCAMEX.....	49
Figura 2.11 Análisis de la orientación de BRISERK1 en pCAMex.....	50
Figura 3.1 Diagrama de alineamiento de los cebadores con el DNAC de la quimera.	60
Figura 3.2 Prueba histoquímica de la β -glucuronidasa (GUS).....	62
Figura 3.3 Electroforesis del ADN genómico.....	63
Figura 3.4 Amplificación de GUS, Vir E2 y BRISER1.....	64
Figura 3.5 Integridad del ARN extraído de explantes transformados de <i>Coffea canephora</i>	65
Figura 3.6 Detección de transcritos de GUS, VirE2 y BRISER1K.....	67

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1	Clasificación de RLKs en <i>Arabidopsis thaliana</i>	15
-------------------	--	----

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
BRI1	Receptor insensible a brasinoesteroides
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
EMBL	Laboratorio europeo de biología molecular
EP	Proteínas extracelulares
ES	Embriogénesis somática
LRR	Regiones ricas en repeticiones de leucina
MAPK	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
PGRs	Reguladores del crecimiento vegetal
RLKs	Receptor tipo cinasa
RTK	Receptor tipo tirosina-cinasa transmembranal
SERK	Receptor tipo cinasa de la embriogénesis somática
RNAm	Ácido ribonucleico mensajero

RESUMEN

La embriogénesis somática, es un proceso que se produce con cierta asiduidad en la naturaleza, produciéndose de forma espontánea en más de 60 familias. Consiste en el desarrollo de embriones sin la fusión de gametos, produciendo una estructura bipolar (embrión) a partir de una célula somática. Los estadios de desarrollo de los embriones somáticos (globular, acorazonado y cotiledonario) tienen patrones fisiológicos similares a los estadios cigóticos, siendo muy probable que en ambos procesos ocurran los mismos eventos en los niveles molecular y bioquímico.

Durante mucho tiempo se ha investigado la naturaleza de la señal que dispara la embriogénesis, con especial énfasis en la identificación de marcadores moleculares del inicio de este proceso. Uno de los genes cuya expresión marca las células competentes que darán lugar a embriones somáticos es el gen SERK1, que codifica una proteína perteneciente a la familia de receptores tipo cinasas (receptor-like kinases, RLK). SERK1 es considerado actualmente como el mejor marcador molecular de "competencia" embriogénica porque se expresa en células somáticas individuales, las cuales posteriormente se diferenciarán para dar lugar a las primeras estructuras embriogénicas.

El hecho de que la sobreexpresión de SERK1 en tejidos de *Arabidopsis thaliana* incrementa la competencia embriogénica sugiere que su activación podría ser responsable o estar directamente relacionada con la diferenciación celular. No obstante, SERK1 es en la actualidad un receptor "huérfano", es decir no se conoce su ligando, por lo que es muy difícil identificar los eventos celulares involucrados en su señalización. Una alternativa para evidenciar los eventos celulares que ocurren cascada abajo del receptor SERK1 consiste en activar ectópicamente su dominio de cinasa mediante la fusión con el dominio de unión al ligando de un receptor para el que si se conoce el ligando.

En el presente trabajo se implementó la estrategia anterior, diseñando in silico un receptor quimérico constituido por los dominios transmembranal y extracelular (de unión al ligando) del receptor de brasinoesteroides (BRI1) de *Arabidopsis thaliana*, y el dominio intracelular (con actividad de cinasa) del receptor SERK1 de *Coffea canephora*. La eficiencia de esta estrategia pudo ser corroborada al transformar exitosamente embriones somáticos de *Coffea canephora* con el receptor quimérico y demostrar su incorporación estable en el

genoma sin que se observe algún cambio en el correcto desarrollo de la embriogénesis somática en los explantes de *Coffea canephora*; específicamente, el número de embriones presentados no se ve afectado por la transformación con el ADNc del receptor quimérico BRISERK1.

En este trabajo no se evaluó la aplicación de brasinoesteroides para la activación del receptor quimérico BRISERK1.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis is a process that occurs with some regularity in nature, occurring spontaneously in more than 60 families. The development of embryos without the fusion of gametes produces a bipolar structure (embryo) from a somatic cell. The developmental stages of somatic embryos (globular, heart-shaped and cotyledonary) display physiological patterns similar to zygotic stages, and is very likely that in both processes occur the same events at the molecular and biochemical levels.

The nature of the signal that triggers the embryogenesis process has been the matter of intensive research, with special focus in the identification of molecular markers of the starting of the process. One of the genes whose expression marks competent cells that will conduce to somatic embryos is the SERK1 gene, which encodes a protein belonging to the family of receptor-like kinases (RLK). SERK1 is currently regarded as the best molecular marker of embryogenic "competence", because it is expressed in individual somatic cells, which will subsequently differentiate into to the first embryogenic structures.

The fact that overexpression of SERK1 in *Arabidopsis thaliana* tissues increases its embryogenic competence suggests that its activation could be responsible or be directly related to cell differentiation. However, SERK1 is currently a receiver "orphan", for which no ligand is still known, making it very difficult to identify the cellular events involved in its cellular signaling. A feasible alternative to make evident the cellular events occurring downstream of the SERK1 receptor cascade is to induce the ectopic activation of its cytoplasmic kinase domain, by its fusion with the ligand binding domain of a receptor for which the ligand is known.

In the present work we implemented the above strategy, designing *in silico* a chimeric receptor, which consists in the transmembrane and extracellular domains (ligand binding) of the brassinosteroid receptor (BRI1) of *Arabidopsis thaliana* fused to the intracellular domain (with kinase activity) of the SERK1 receptor of *Coffea canephora*. The efficiency of this strategy was corroborated by the successfully transformation of *Coffea canephora* somatic embryos with this chimeric receptor and the demonstration of its stable incorporation into the plant genome, without altering the normal development of the

somatic process in the *Coffea canephora* explants; in fact, the efficiency of the production of somatic embryos was not altered by the transformation with the cDNA of the chimeric receptor BRISERK1.

The application of brassinosteroids to ectopically activate the BRISERK1 chimeric receptor was not evaluated.

INTRODUCCIÓN

En 1902, Haberlandt propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen capacidad para formar plantas completas, es decir, que tienen totipotencialidad. Sin embargo, esta hipótesis no pudo ser demostrada en aquel tiempo (Krikorian *et al.*, 1969).

White (1939) informó acerca de la inducción de yemas adventicias *in vitro* a partir de callos de *Nicotiana glauca* x *N. Langsdorfii* y Nobecourt (1939) obtuvieron raíces adventicias de un callo de zanahoria (*Daucus carota*). Estos experimentos respaldaron indirectamente la teoría de totipotencialidad celular.

La regeneración de las plantas directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la organogénesis o de la embriogénesis somática (ES) se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación. La ES, es el proceso de iniciación y desarrollo completo de un embrión somático a partir de células vegetativas o no gaméticas (Bhojwari y Razdan, 1996).

La primera descripción de ES *in vitro* fue obtenida de forma independiente por Steward (1958) y Reinert (1959), trabajando con zanahoria (*Daucus carota* L.), confirmando la predicción de Haberlandt de que los embriones somáticos pueden formarse de células en cultivo *in vitro* (Jiménez, 2001).

La diferencia principal con la embriogénesis cigótica (EC) radica en que la(s) célula(s) que da(n) origen al embrión somático no es (son) el resultado de la fecundación sexual (Carlota *et al.*, 1997), y que el embrión somático mantiene la misma combinación genética que la de la planta fuente del explante (Parrott, 1993).

El uso de la ES para la propagación seguirá aumentando según hayan protocolos más avanzados y refinados capaces de producir embriones somáticos morfológicamente normales, sin variación somaclonal y con capacidad para germinar y convertirse en plantas rápida y eficazmente (Parrott, 2002).

Durante la inducción de la ES en *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado la expresión ectópica de diferentes genes. Por ejemplo, la expresión de los genes leafy cotyledon I

INTRODUCCIÓN

(*lec1*) (Lotan *et al.*, 1998), leafy cotyledon 2 (*lec2*) (Stone *et al.*, 2001), baby boom (*bbm*) (Boutillier *et al.*, 2002) y *wuschel* (*wus*) (Zuo *et al.*, 2002), conduce a un incremento en la formación espontánea de embriones somáticos en plantas o en explantes.

Otros genes expresados en células competentes en el cultivo de tejido de la zanahoria (*Daucus carota*) es la cinasa tipo receptor 1 de la embriogénesis somática (*DcSERK1*), que codifica un receptor tipo cinasa y es considerado un marcador de la embriogénesis somática (Hecht *et al.*, 2001).

No obstante, con ninguno de los modelos de estudio empleados se ha podido identificar las rutas de señalización que conducen a la expresión génica diferencial. Adicionalmente, las ventajas del conocimiento bioquímico y genético de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* u *Oryza sativa* no pueden ser totalmente aprovechados por la poca eficiencia de los sistemas de ES que se han desarrollado con estos modelos (Jain, 2000). De esta manera, el uso de sistemas de ES más eficientes podría ayudar a identificar los mecanismos que controlan este importante fenómeno biológico. Un modelo de embriogénesis somática eficiente, es el de *Coffea canephora* (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

En la búsqueda de los “genes responsables” del establecimiento de la ES se han implementado diversas metodologías enfocadas a la detección de la expresión diferencial; sin embargo, la mayoría de los genes identificados de esta manera poseen funciones diversas, que no son exclusivas de la embriogénesis (Ikeda *et al.*, 2006).

Los mecanismos que controlan la diferenciación celular durante la embriogénesis somática están lejos de ser clara (Arnold *et al.*, 2002). Fundamentalmente, se desconoce la naturaleza de la(s) señal(es) extracelular(es) que dispara(n) el proceso de diferenciación en las células somáticas, así como las vías de transducción de señales que al ser activadas en las células competentes conducen a la diferenciación (Barranco, 2001).

La determinación precisa de los mecanismos que inducen la embriogénesis somática requiere establecer una ventana de estudio en la que existan mayores probabilidades de ubicar la expresión de los genes regulatorios (Meinke, 1992).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática (ES) en vegetales, un proceso descrito por primera vez en células de zanahoria (Steward *et al.*, 1958), puede definirse como el proceso en el cual se forma una estructura bipolar que asemeja a un embrión cigótico, pero que carece de conexión vascular con el tejido del cual se originó (von Arnold *et al.*, 2002); el embrión somático se genera en ausencia de la fusión de gametos y puede regenerar una planta completa.

La ES *in vitro* se ha convertido en una herramienta de gran utilidad en el estudio de los procesos celulares, bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo durante el desarrollo de los embriones. Ya que los primeros estadios de desarrollo de los embriones somáticos (globular-acorazonado y cotiledonario) tienen patrones fisiológicos similares a los estadios cigóticos como puede apreciarse en la Figura 1.1, por este hecho, es muy probable que en los ámbitos molecular y bioquímico ocurran los mismos eventos. Así, la ES constituye una importante herramienta experimental para el estudio del proceso embriogénico, que además tiene las ventajas de no contar con barreras naturales como el endospermo, además de poder disponer de líneas genéticamente homogéneas y poder ser inducida bajo condiciones controladas (Dodeman *et al.*, 1997).

En el caso de las plantas monocotiledóneas, los embriones somáticos pasan por diferentes etapas de desarrollo embrionario: globular, escutelar y coleoptilar (Noceda, 1999). En dicotiledóneas, la etapa globular es seguida por la etapa corazón que se corresponde con la adquisición de la simetría bilateral, el desarrollo de la epidermis, de los estratos procambiales y, de manera sucesiva, el desarrollo del ápice radical. El ápice del tallo se desarrolla más tarde en la etapa cotiledonar. En los embriones somáticos de algunas especies, existe una etapa intermedia entre globular y corazón llamada oblonga, que corresponde a la individualización del ápice de la raíz y al procambium en respuesta a la elongación axial del embrión somático debido al transporte de auxinas (Radice, 2004).

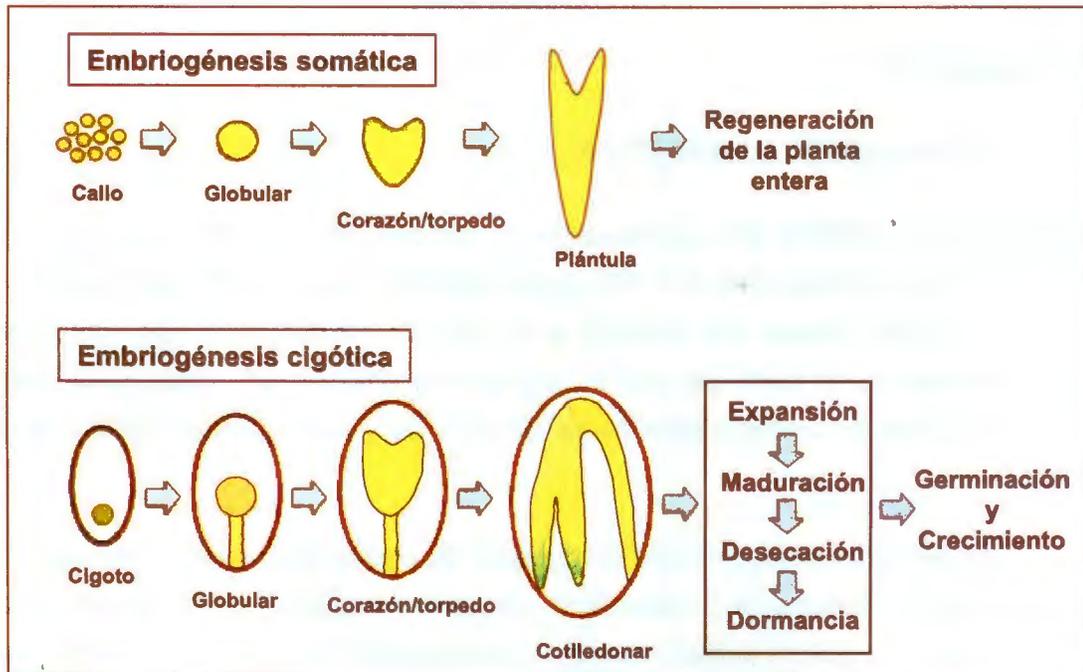


Figura 1.1 Comparación de estructuras embriogénicas entre los diferentes estadios de la embriogénesis somática y cigótica (Traducido de Zimmerman, 1993).

Existen dos vías en el desarrollo del proceso de embriogénesis somática. La vía indirecta, que requiere una fase intermedia de callo formado por un conjunto de diferentes tipos de células no organizadas y que conservan la capacidad de dividirse. Una vez organizado el callo este prolifera, se inicia la formación de pro-embriones, usualmente en un medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas y luego se transfieren los callos a un medio de cultivo con menores concentraciones de reguladores del crecimiento para inducir la formación de los embriones somáticos a partir de los proembriones.

La vía directa involucra la formación de los embriones somáticos en una parte del tejido del explante sin la formación de callos. Ya que las células dentro de un embrión cigótico son de por sí embriogénicas, es posible inducir las para que estas se dividan para formar un embrión somático. En este caso, las células pre-existentes se dividen directamente

para formar un embrión somático. Éstas se conocen como Células Embriogénicas Pre-Determinadas (Parrott, 2002).

En general, el proceso de ES puede dividirse en dos fases, la fase de inducción y la fase de expresión. En la fase de inducción ocurre un fenómeno de polaridad celular (Dijak *et al.*, 1990) y se presenta una primera división celular asimétrica (Komamine *et al.*, 1990); una de las dos células somáticas diferenciadas, que es pequeña, isodiamétrica, con núcleo y nucléolo grandes y con un citoplasma denso, adquiere la competencia embriogénica y puede proliferar como célula embriogénica, mientras que la otra célula, que es grande y vacuolizada, fenecerá (Halperin y Jansen, 1967). En la fase de expresión las células embriogénicas desarrollan la competencia embriogénica y establecen el programa de diferenciación para el desarrollo del embrión somático, con todas las etapas anatómicas características de la embriogénesis cigótica (preglobular, globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar) (Jimenez, 2001). Finalmente, al completar la última etapa del proceso de maduración, en los embriones somáticos se establece el proceso de "conversión" (proceso equivalente a la germinación de los embriones cigóticos en las semillas), para dar lugar a los procesos de desarrollo de la planta adulta (Dodeman *et al.*, 1997).

Sin embargo, en la actualidad se desconocen los parámetros que regulan la ES y además existe un limitado número de especies en las cuales se describe un proceso de ES eficiente que permita la aplicación del método con fines de investigación o de proliferación (Jain, 2000).

1.2 ASPECTOS MOLECULARES DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

De la ES se han estudiado sus aspectos morfológicos y algunos fisiológicos, pero los mecanismos moleculares que determinan y controlan el proceso de desarrollo son poco conocidos.

En este sentido, se observó que los cultivos embriogénicos secretaban algunas proteínas específicas que modificaban la diferenciación de embriones y que podían ser utilizadas para caracterizar su potencial embriogénico (de Vries *et al.*, 1988). Debido a esto, el

efecto de un medio condicionado sobre la ES ha recibido mucha atención. En suspensiones celulares de *D. carota*, *Cucumis sativus*, *Vitis vinifera* y *Hordeum vulgare* se ha observado la presencia de proteínas extracelulares específicas durante la ES (Coutos-Thévenot *et al.*, 1992; Nielsen y Hanse, 1992; Filipecki y Przybecki, 1994).

La posible función de las proteínas extracelulares en la ES se ha inferido de las siguientes observaciones:

- a. La velocidad de adquisición del potencial embriogénico de células del hipocótilo de *D. carota* aumenta considerablemente por la adición de proteínas extracelulares de una suspensión embriogénica previamente establecida (de Vries *et al.*, 1988).
- b. La capacidad en la ES de líneas celulares con bajo potencial embriogénico o líneas celulares no embriogénicas puede ser parcialmente restablecida por la adición de componentes secretados por líneas celulares embriogénicas (de Vries *et al.*, 1988).
- c. Durante la ES los mayores cambios detectados ocurren en las proteínas de membrana o las que se secretan al medio de cultivo. Se han aislado genes que codifican diferentes proteínas extracelulares que influyen en la embriogénesis, las cuales han sido denominadas EP1, EP2, EP3, EP4 y EP5, respectivamente (De Jong *et al.*, 1992; Poulsen *et al.*, 1996).

Por otro lado, después de haberse iniciado el proceso de la ES por la adición de factores externos la auxina sintética 2,4-D, ocurre la reprogramación de la expresión génica. Una clasificación de los genes involucrados en la embriogénesis de acuerdo con las etapas del proceso fue realizado por Dure (1985):

- Genes que se expresan durante el desarrollo o constitutivos.
- Genes que se expresan sólo en embriones o específicos de embriones.
- Genes que se expresan durante la embriogénesis temprana.
- Genes que codifican para proteínas de semilla sin madurar.
- Genes que se expresan durante la embriogénesis tardía antes de germinar la semilla.

En la actualidad se desconocen los mecanismos que conducen a la modificación en la expresión génica, pero un posible mecanismo para la regulación de la expresión de genes es la metilación del ADN, que es influenciada por las auxinas (Schiavo *et al.*, 1989). Esto da lugar a una serie de divisiones celulares que inducen un crecimiento desorganizado del callo o el crecimiento polarizado que lleva a la ES (Dudits *et al.*, 1995).

Debido al amplio espectro de los productos codificados por la gran gama de genes que participan en este fenómeno, es difícil hacer un análisis que integre sistemáticamente los resultados publicados, así como la propuesta de un modelo que explique la reprogramación de las células somáticas y su canalización hacia la formación de un embrión somático.

Para aprovechar las potencialidades que el embrión somático ofrece, es vital entender los mecanismos involucrados en la transición de una célula somática o del gametofito en una célula embriogénica (Mordhorst *et al.*, 1997).

1.3 SEÑALES EMBRIOGÉNICAS

Las células somáticas vegetales contienen toda la información genética necesaria para crear una planta completa y funcional. La inducción de la ES debe entonces consistir en la terminación del patrón de la expresión genética en el tejido somático y de su reemplazo con un programa de expresión génica para el inicio de la ES. Un mecanismo posible para esta regulación de la expresión de genes es la metilación del DNA, que es influenciada por las auxinas (Lo Schiavo *et al.*, 1989).

También se ha propuesto que los reguladores del crecimiento vegetal (PGRs, por las siglas en inglés de plant growth regulators) y el estrés influye en la vía de transducción en la cascada de señales, que lleva a la reprogramación de la expresión génica. Esto da lugar a una serie de divisiones celulares que inducen el crecimiento desorganizado del callo o el crecimiento polarizado que lleva a la embriogénesis somática (Dudits *et al.*, 1995). La iniciación de la ruta embriogénica se restringe solamente a ciertas células responsivas, las cuales tienen el potencial para activar esos genes implicados en la generación de las células embriogénicas. Solamente algunas células del explante primario

son competentes para la inducción embriogénica, lo cual según Duditis *et al.* (1995) puede ser el resultado de la variabilidad en la sensibilidad de la auxina de estas células. Eso puede ser debido a la presencia de receptores de auxinas, que serían responsables de la división celular asimétrica, que genera una célula embriogénica (Lo schiavo, 2000).

Dos mecanismos parecen ser importantes para la formación *in vitro* de células embriogénicas: la división de célula asimétrica y el control de su alargamiento (De Jong *et al.*, 1993; Emons, 1994). La división de la célula asimétrica es promovida por PGRs que alteran la polaridad de la célula interfiriendo con el gradiente del pH o con el campo eléctrico alrededor de las células (Smith y Krikorian, 1990). La capacidad para controlar el volumen de la célula se asocia a los polisacáridos de la pared celular y a las enzimas hidrolíticas correspondientes (De Jong *et al.*, 1993; Emons, 1994).

Existen diversos reportes de genes involucrados en la regulación de los estadios tardíos de la ES (Zimmerman *et al.*, 1993; Schmidt *et al.*, 1997), pero se sabe muy poco en el ámbito molecular sobre los procesos de inducción de la ES. Durante la inducción de la ES en *Arabidopsis thaliana* se ha estudiado la expresión ectópica de diferentes genes. Por ejemplo, la expresión de los genes leafy cotyledon 1 (*lec1*) (Lotan *et al.*, 1998), leafy cotyledon 2 (*lec2*) (Stone *et al.*, 2001), baby boom (*bbm*) (Boutillier *et al.*, 2002) y wuschel (*wus*) (Zuo *et al.*, 2002), conduce a un incremento en la formación espontánea de embriones somáticos en plantas o en explantes.

Otros genes expresados en células competentes en el cultivo de tejido de la zanahoria (*Daucus carota*) es la cinasa tipo receptor 1 de la embriogénesis somática (*DcSERK1*; GenBank No. A67796), que codifica un receptor tipo cinasa transmembranal (RLK, transmembrane receptor-like kinase), con regiones con repeticiones ricas de leucinas (LRR, Leucine-rich repeat) (Hecht *et al.*, 2001).

El hecho de que la sobreexpresión de *SERK1* en tejidos de *A. thaliana* incrementa la competencia embriogénica sugiere que la actividad del receptor *SERK1* podría ser responsable o estar directamente relacionada con la diferenciación celular (Hecht *et al.*, 2001).

A pesar del gran cúmulo de información, aún se desconoce la identidad de las cascadas de señalización responsables de la transducción de la señal embriogénica. No obstante, con base en datos obtenidos en sistemas animales, se puede inferir que las proteínas RLK, receptores acoplados a proteínas G, las MAPK y otros componentes de la señalización intracelular podrían interactuar durante la ES.

1.4 SEÑALES EXTRACELULARES

La comprensión de los mecanismos que controlan la diferenciación celular durante la embriogénesis somática está lejos de ser clara. Sin embargo, las moléculas solubles secretadas, juegan un importante papel como señal (Arnold *et al.*, 2002).

Desde hace tiempo se observó que el medio condicionado de cultivos embriogénico puede promover la embriogénesis. Sin embargo, solo unos pocos informes muestran que las proteínas secretadas, pueden influir en el desarrollo de los embriones somáticos (Arnold *et al.*, 2002).

Unas de las proteínas que promueven el desarrollo embrionario en cultivos embriogénicos de *Daucus carota* ha sido identificado como un ácido glucosilado endocinasa (Jong *et al.*, 1992).

El papel exacto de las endocinasas, en la embriogénesis somática todavía no es claro. Se ha sugerido que están implicadas en la escisión de la molécula de señalización de un sustrato aun desconocido.

Las proteínas arabinogalactonadas (AGPs), se han demostrado que son importantes para el desarrollo de los embriones somáticos. Las AGPs son un grupo heterogéneo de macromoléculas estructuralmente complejas, compuestas de un polipéptido, con una gran cadena ramificada de glicano y lípido (Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000).

Las AGPs están presentes en la pared celular y en las membranas plasmáticas. La perturbación de las AGPs se ha reportado, que modifican el establecimiento de la ES, lo que indica la importancia de las AGPs para el desarrollo del embrión (Arnold *et al.*, 2002). Por ejemplo, la adición al medio embriogénico del reactivo Yariv, un fenil-glucósido

sintético que se une específicamente con las AGPs, se ha observado que bloquea la formación de embriones somáticos en cultivos de *Daucus carota* y *Cichorium* (Thompson y Knox, 1998; Chapman *et al*, 2000). La precipitación de moléculas de AGPs con un anticuerpo anti-AGP tiene un efecto inhibitor similar al del reactivo Yariv, sobre la formación de embriones somáticos (Butowt *et al.*, 1999). Además, la adición de las AGPs a los cultivos ha demostrado promover la embriogénesis somática (Arnold V. *et al.*, 2002). La embriogénesis somática (Arnold V. *et al.*, 2002). En diferentes laboratorios se han generado anticuerpos específicos contra cada uno de los diferentes carbohidratos presentes en las células nodriza y embriogénica. Así, los anticuerpos JIM fueron generados por el "The Jonh Innes Centre"; por ejemplo, el anticuerpo monoclonal JIM8 es un anticuerpo monoclonal de idiotipo IgG2c dirigido contra arabinogalactanos de caña de azúcar

(<http://glycomics.ccruc.edu/wall2/jsp/abdetails.jsp?abnumber=80&abname=JIM8>). Por otro lado, los anticuerpos CRC son generados por el "CarboSource Services" (http://cell.ccruc.edu/~carbosource/CSS_home.html), perteneciente a la Universidad de Georgia, teniendo como ejemplo al anticuerpo monoclonal de idiotipo IgG1 específico contra proteínas específicas que se encuentran en la membrana celular, se demostró la existencia de dos tipos de células en cultivos embriogénicos de *Daucus carota*, células que tienen el epítotope JIM8 (JIM8⁺) y las células carentes de él (JIM8⁻) (McCabe *et al.*, 1997). Otros estudios revelaron que subpoblaciones celulares JIM8⁺ son capaces de desarrollar embriones somáticos. Al mismo tiempo, una subpoblación de células JIM8⁻ no puede formar embriones somáticos (McCabe *et al.*, 1997). Sin embargo, si al cultivo de células JIM8⁻ se le adiciona un medio condicionado por células JIM8⁺ el cultivo de células JIM8⁻ son capaces de originar embriones somáticos. El análisis de la estructura química de este compuesto, reveló la presencia de carbohidratos y lípidos (McCabe *et al.*, 1997).

1.5 PROBLEMÁTICA EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA *IN VITRO*

La caracterización de las estructuras embriogénicas y no embriogénicas es útil y necesaria para el establecimiento de diferencias bioquímicas, moleculares e histológicas. Este paso es imprescindible para obtener un cultivo de células homogéneo, que permita futuras manipulaciones en las suspensiones celulares (Noualle y Periard, 1988; Gananapragasam y Vasil, 1992).

Sin embargo, los modelos vegetales que podrían aportar mejores oportunidades experimentales para identificar los procesos regulatorios, como zanahoria y *Arabidopsis*, han sido limitados (Raghavan, 2006).

En zanahoria existe el problema del traslape de los genes que son expresados durante el desarrollo de células somáticas con los genes que se expresan durante la transición embriogénica, dificultando la identificación de los genes regulatorios. Por ello, a pesar de que fue el primer modelo de ES descubierto y que la producción de embriones somáticos es muy alta, el modelo de ES de zanahoria no ha aportado datos relevantes. En *Arabidopsis* se conoce la secuencia del genoma completo y se han identificado genes que promueven un desarrollo tipo embriogénico cuando son expresados ectópicamente en tejidos somáticos; sin embargo, aún con los modelos de ES desarrollados (que son solo aceptablemente eficientes), los resultados de experimentos basados en el cultivo de tejidos han demostrado que las células proembriogénicas son también las precursoras de tejidos foliares (Meinke, 1992), lo que evidentemente genera un problema para separar los genes responsables del establecimiento de la ES de los genes responsables de la biogénesis foliar. La determinación precisa de los mecanismos que inducen la embriogénesis somática requiere establecer una ventana de estudio en la que existan mayores probabilidades de ubicar la expresión de los genes regulatorios (Meinke, 1992).

1.6 RECEPTORES TIPO CINASAS EN LAS PLANTAS

La percepción de señales a través de receptores que se encuentren en la superficie celular es una característica común entre los organismos vivos. En las plantas, diferentes tipos de receptores celulares pueden perciben diversas señales y estímulos del medio ambiente, como se puede observar en la Figura 1.2 (Shiu y Bleecker, 2001).

El secuenciamiento del genoma de *Arabidopsis thaliana* reveló una variedad extensa de genes que codifican receptores tipo cinasas (RLK por sus siglas en ingles), unos 610 miembros de esta familia de RLKs y representan el 2.5 % de los genes codificadores de proteínas (Shiu y Bleecker, 2001). Aunque no se dispone de información funcional para la mayoría de las RLKs. A menos del 2% se les conoce su función, y de las demás, menos se conoce el ligando que las activa (Shiu y Bleecker, 2001). En algunos casos limitados, donde se ha identificado un papel funcional para las RLKs, se les ha implicado en una diversa gama de procesos, tales como la señalización por brasinoesteroides por vía de BRI1 (Li y Chory, 1997), el desarrollo del meristemo apical, controlado por clavata (CLV1) (Clark *et al.*, 1997), la percepción de la flagelina por FLS2 (Gomez-Gomez y Boller, 2000), el control del desarrollo foliar por Crinkly4 (Becraft *et al.*, 1996), la regulación de la abscisión por HAESA (Jinn *et al.*, 2000), la incompatibilidad controlada por SRK (Stein *et al.*, 1991) y la resistencia bacteriana, mediada por Xa21 (Song *et al.*, 1995). Los ligandos para SRK (Schopfer *et al.*, 1999; Takayama *et al.*, 2000), CLV1 (Brand *et al.*, 2000; Trotochaud *et al.*, 2000), BRI1 (Wang *et al.*, 2001) y FLS2 (Gomez *et al.*, 2001) han sido identificados recientemente. También se han identificado proteínas que actúan Proteínas que actúan recíprocamente con los dominios de cinasa de algunos RLKs, *in vivo* e *in vitro*, también se han identificado (Stone *et al.*, 1994).

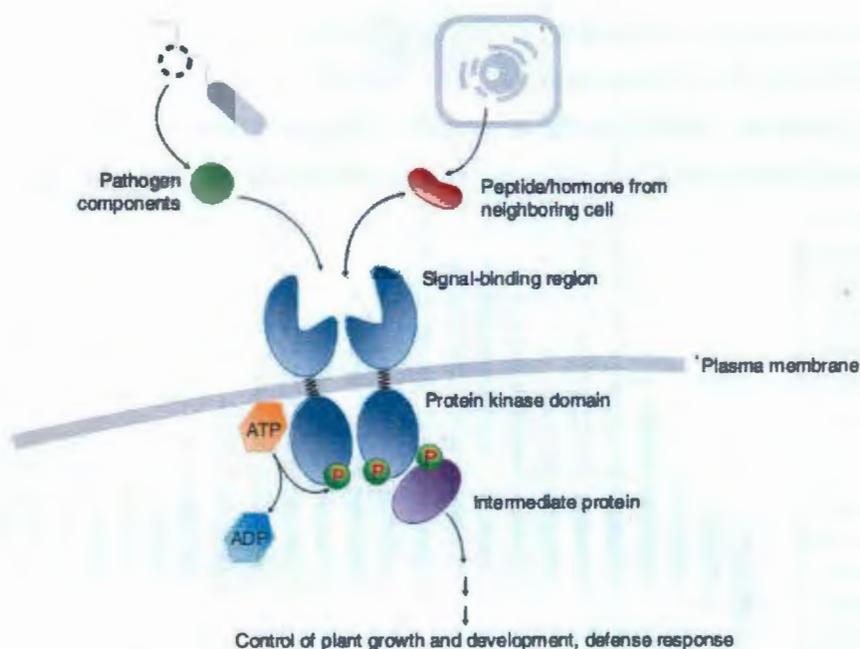


Figura 1.2 Representación esquemática de la activación de las cinasas RLK. Los receptores tipo cinasas son enzimas que se modulan como respuesta a un estímulo extracelular (Shiu y Bleecker 2001).

Hace ya una década desde la primera clonación de un gen de plantas que codifica un receptor tipo cinasa (Walke y Zhang, 1990), mientras que los primeros en reportar la secuencia de un receptor tipo cinasa fueron Lawton *et al.* (1989).

Los primeros receptores tipo cinasas que se identificaron fueron proteínas integrales de membrana plasmática que contienen un dominio transmembranal único. Estas proteínas tipo receptor contienen un dominio extracelular (ectodominio) y un dominio de cinasa citoplasmática (Becraft, 2010).

Las RLKs se pueden clasificar en 44 subfamilias (Cuadro 1.1). Los miembros de la familia RLK varían grandemente en la organización de su dominio y la identidad de la secuencia de sus dominios extracelulares (Figura 1.3). Entre ellos, el 75% de las cinasas tipo receptor tienen una configuración en donde está presente la secuencia señal y la región transmembranal, un sello de las proteínas transmembranales tipo I. Por el contrario, el receptor tipo cinasa de prolina extensina (PERKs) de *Brassica napus* y de *Arabidopsis*

thaliana sólo cuenta con una región transmembranal (Shiu y Bleecker 2001). Las cinasas tipo I, asociadas a la membrana de los tilacoides (*TAK1*), tienen una sola región hidrofóbica cerca del comienzo de la proteína (Snyder y Kohorn, 2000). Las restantes miembros de la familia RLK son cinasas citoplasmáticas (Shiu y Bleecker, 2001).

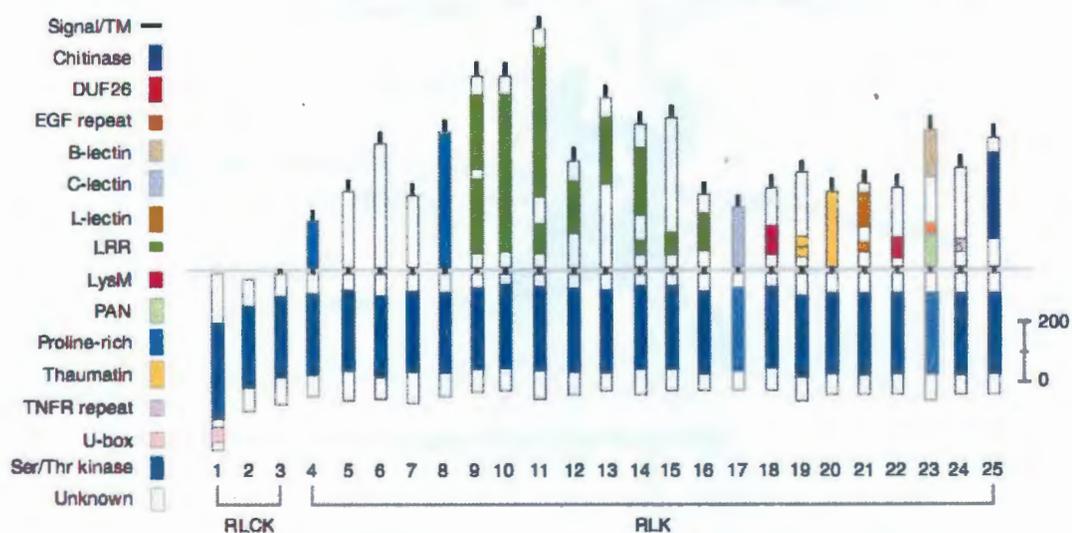


Figura 1.3 Representación esquemática de los dominios de los receptores tipo cinasas, RLK y RLCK. Los miembros de esta familia de genes se clasifican como RLKs (receptores tipo cinasas) o RLCKs (receptores tipo cinasas citoplasmáticas) con base en la presencia o ausencia del dominio extracelular. La línea gris representa la membrana plasmática, a excepción de Tak, que se localiza en la membrana tilacoidal. Los dominios por encima de la línea gris son los dominios extracelular (reconocimientos al ligando). El área debajo de la línea gris representa el lado citoplasmático. PERK es el único representante con un dominio extracelular, pero sin la secuencia señal. Los péptidos señal están presumiblemente ausentes en las proteínas maduras pero se muestran para demostrar su presencia en las RLKs. Estas RLKs están numeradas de la siguiente manera: 1, A5g12000; 2, NAK; 3, Tak; 4, PERK; 5, RKF3; 6, 7 CrRLK1, LRR10; 8, At5g56890; 9, Xa21; 10, CLAVATA1; 11, BRI1; 12, TMKL1; 13, At1g53340; 14, TMK1; 15, LRRPK; 16, SERK; 17, At1g52310; 18, At3g26700; 19, WAK1; 20, PR5K; 21, LecRK1; 22, RKF2; 23, SRK; 24, CRINKLY4; 25, CHRK1. TM, es la región transmembranal; DUF, dominio de función desconocida, EGF, factor de crecimiento epidérmico; B-lectina, aglutinina; lectina-C, lectina tipo C; L-lectina, lectina leguminosas; LRR, repeticiones ricas en leucina; LysM, motivo de lisina; PAN, del plasminógeno/manzana/dominio de la proteína de nematodos; TNFR, receptor del factor de necrosis tumoral (Shiu y Bleecker 2001).

1.7 MOTIVOS EN EL DOMINIO EXTRACELULAR DE LOS RLKS

Diversas secuencias motivos están presentes en los dominios extracelulares de las RLKs (Cuadro 1.1). Varios de estos motivos se encuentran presentes tanto en las RLKs como en los receptores de animales, mientras que otras parecen ser exclusivas de las RLKs. Algunos motivos están implicados en las interacciones proteína-proteína, mientras que otros motivos están implicados en la unión a diferentes ligandos, como carbohidratos de las plantas, componentes de la pared celular microbiana o glicoproteínas de diversos orígenes. Una excepción interesante es BRI1, que puede unir a una hormona esteroide (los brasinoesteroides) (Shiu y Bleecker, 2001).

En *Arabidopsis*, 235 RLKs contienen de 1 a 32 regiones con repeticiones ricas en leucina (LRR) en el dominio extracelular. Las LRRs participan en las interacciones proteína-proteína (Kobe *et al.*, 1994). La estructura cristalina del inhibidor de ribonucleasa porcino indica que cada repetición LRR forma una estructura β - α . Un número de LRRs pueden formar una estructura de herradura, proporcionando un sitio de acoplamiento para la unión de la ribonucleasa (Kobe *et al.*, 1995). Por lo tanto, parece que el dominio LRR de las RLKs también puede funcionar en la unión a ligandos proteicos, aunque puede haber excepciones. Hasta ahora, la RLK CLAVATA1 representa el único ejemplo de esta clase para la cual el ligando identificado es un polipéptido, CLAVATA3 (Brand *et al.*, 2000, Trotochaud *et al.*, 2000).

Cuadro 1.1 Clasificación de las RLKs de *Arabidopsis thaliana*.

TIPO DE RLK	NUMERO DE SUBFAMILIAS	MOTIVO ECD	INTERPRO	NUMERO DE GENES
C-lectin	1	C-type lectin	IPR001304	1
CR4-like	1	TNFR repeat	IPR001368	8
CrRLK1-like	2	No known domain	ND	15
DUF26	1	DUF26	IPR002902	45
Extensin-like	1	Proline-rich	ND	5
L-lectin	1	Legume lectin a	IPR000772	46
		Legume lectin b	IPR001220	
LRK10-like*	2	No known domain	ND	13
LRR I	15	Leucine-rich repeats	IPR003590	239
LysM	1	Lysin motif	IPR002482	4

PERK	1	Proline-rich	ND	19
RKF3-like	1	No known domain	ND	2
S domain	3	Agglutinin	IPR001480	40
		EGF	IPR001336	
		PAN	IPR003014	
Thaumatococcus	1	Thaumatococcus	IPR001938	3
URK I	1	No known domain	ND	2
WAK-like	1	EGF repeat	IPR1336	25
RLCK I	11	NA	ND	135
Unknown				9

El número de subfamilias es el número de grupos filogenéticamente distintos en un determinado tipo de RLK. La secuencia de motivos se basa en la anotación de la base de datos de SMART y Pfam. La base de datos InterPro (columna 3) se puede acceder desde el instituto de bioinformática europeo (EMBL- EBI por sus siglas en inglés). El número de genes se basa en los genes de *Arabidopsis* solamente. NA: no aplicable; ND, no determinado. * La asignación de esta subfamilia se basa en la similitud de los dominios cinasa solamente (Shiu y Bleecker 2001).

1.8 MODO DE ACCIÓN DE LAS RLKS *IN VIVO*.

La activación *in vivo* de los receptores con actividad de cinasa se ha estudiado extensamente en animales (Tori, 2000).

Activación del receptor. Requiere tres pasos secuenciales:

- 1) Unión del ligando al receptor.
- 2) La dimerización del receptor.
- 3) La autofosforilación del receptor en residuos de tirosina (Sánchez-Lemus y Arias-Montaño 2004).

La unión del ligando induce cambios conformacionales en el receptor, los cuales favorecen su interacción con otro receptor para formar un dímero. La unión del ligando activa también al dominio cinasa de tirosina del receptor, por lo que al formar el dímero cada receptor fosforila múltiples residuos de tirosina de su homólogo (Figura 1.4) (Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004). A este fenómeno se le conoce como autofosforilación, ya que en ese momento ambas moléculas se encuentran formando un nuevo receptor dimérico, que se autofosforila. Sin embargo, algunos autores prefieren denominar a este proceso transfosforilación (Ullrich *et al.*, 1990).

Una vez activado el receptor, la señalización continúa mediante los residuos de tirosina fosforilados, que se constituyen en el sitio de unión y activación de diversas proteínas (Sánchez-Lemus y Arias-Montaño, 2004).

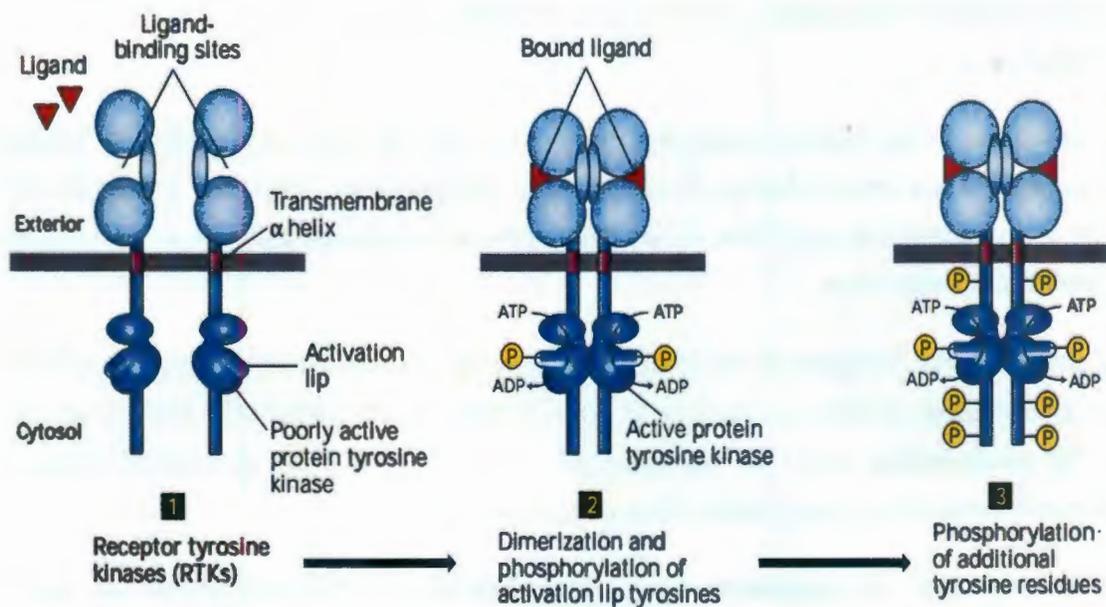


Figura 1.4 Activación de los receptores RTK por el reconocimiento de su ligando. El dominio citosólico de los RTKs contiene una proteína cinasa catalítica de tirosina. En estos receptores, el ligando obliga a un cambio conformacional que promueve la formación de un receptor dimérico, que se fosforilan entre sí, en un residuo de tirosina (paso 1). La Fosforilación causa la salida del sitio catalítico de la cinasa, lo que permite al ATP fosforilar la proteína (paso 2). La cinasa activada fosforila a otros residuos de tirosina en el dominio citosólico del receptor vecino (paso 3). El resultado de la Fosforilación del residuo de tirosina es que funcionan como sitios de atraque para diversas proteínas en la transducción de señales (Molecular Cell Biology - 4° Edición).

1.9 EL RECEPTOR BRI1

El receptor BRI1 de *Arabidopsis* es un miembro de la subfamilia LRR-RLK, que es absolutamente necesario para la señalización de los brasinoesteroides (Kim y Li, 2002).

Los brasinoesteroides juegan un rol muy importante en el crecimiento y el desarrollo de las plantas.

La señalización por brasinoesteroides es uno de las vías de la traducción de señales mejor estudiadas en las plantas. A diferencia de los animales, donde los esteroides son ligados por receptores nucleares, en las plantas los receptores se encuentran anclados en la membrana plasmática.

La proteína BRI1 consiste en un dominio extracelular, un solo dominio transmembranal y una cinasa citoplasmática de Ser/Thr. El dominio extracelular contiene 25 LRRs y una isla de 70 aminoácidos entre los dominios 21 y 22 de LRR, que es esencial para el reconocimiento de los brasinoesteroides (Li y Chory, 1997).

El receptor BRI1 no solamente forma homodímeros; el complejo activo que une a brasinoesteroides y traduce las señales está formado por BRI1 y la RLK BAK1. Adicionalmente, se ha demostrado la asociación con SERK1 mediante experimentos de co-inmunoprecipitación (Karlova *et al.*, 2006).

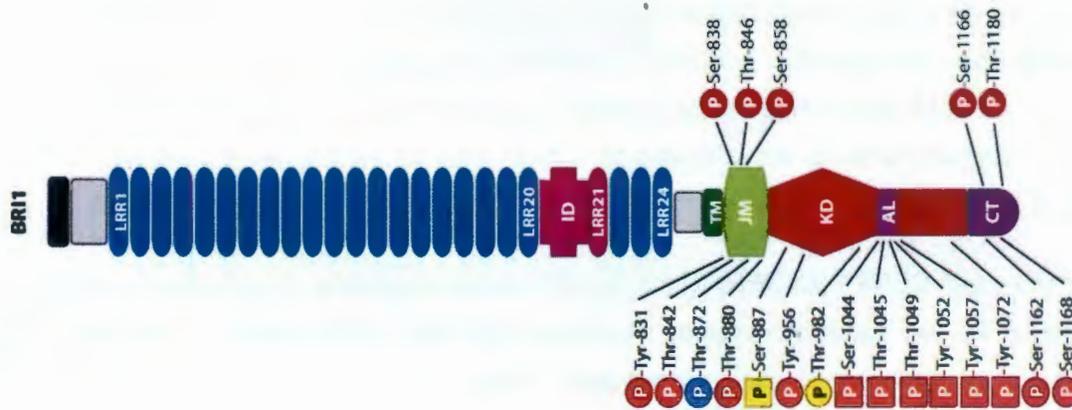


Figura 1.5 Estructura de los dominios del receptor BRI1. La estructura de BRI1 se compone de 24 repeticiones ricas en leucinas (LRR) y una isla de 70 aminoácidos (ID), una única región transmembranal (TM), una región yuxtamembranal (JM), un dominio cinasa (KD), y una región C-terminal (TC). La región péptido señal putativo se muestra como un cuadro de color negro y las regiones no asignadas se muestran como cuadros de color grises. El bucle de activación de las cinasas se designa AL. Los sitios de fosforilación confirmados están marcados con círculos, y los sitios putativos de fosforilación están marcados con cuadrados que contienen la letra P. Los sitios de fosforilación de activación se muestran en color rojos, los inhibitorios en azul, y los residuos sin efecto significativo sobre la actividad cinasa o no examinados experimentalmente en amarillo (Kim y Wang, 2010).

1.10 EL RECEPTOR SERK1

Los receptores tipo cinasas (RLKs por sus siglas en inglés, Receptor-like kinases), son un grupo de proteínas ancladas en la membrana citoplasmática, caracterizadas por tener un dominio extracelular, un dominio transmembranal y un dominio intracelular de cinasa (Becraft *et al.*, 1996). Se piensa que juegan un rol importante en la transducción de señales extracelulares. En presencia de ligandos extracelulares, se piensa que las RLKs experimentan cambios conformacionales que dan lugar a la fosforilación de las proteínas intracelulares.

La secuencia de aminoácidos de los dominios de cinasa de diversas RLKs comparten una alta identidad (mayor del 45%), considerando que la estructura de sus dominios extracelulares son poco semejantes en su secuencia (Hu *et al.*, 2005).

Entre los LRR-RLKs involucrados en el proceso del desarrollo, el receptor tipo cinasa de la embriogénesis somática 1 (SERK1) constituye un grupo especial y se ha asociado con los procesos de la embriogénesis somática, donde la célula competente es responsiva a las señales ambientales en el medio de cultivo para convertirse en un embrión somático (Hu *et al.*, 2005).

El primer gen SERK1 (*DcSERK1*) fue identificado en zanahoria, donde se encontró que la proteína es expresada en células embriogénicamente competentes y disminuye hasta después de la etapa globular (Schmidt *et al.*, 1997).

Los niveles de expresión de *DcSERK1* parecen ser consistentes con la hipótesis de que las proteínas SERK podrían actuar como receptores transmembranales para percibir las señales en el medio de cultivo y del disparador de la embriogénesis. Sin embargo, la evidencia genética o bioquímica no ha podido demostrar el rol de *DcSERK1* en el desarrollo de la embriogénesis somática (Hu *et al.*, 2005).



Figura 1.6 Estructura del receptor tipo cinasa SERK1 de *Arabidopsis thaliana*. La estructura de SERK1 se compone de 5 repeticiones ricas en leucinas (LRR) y una región rica en prolina (Pro-rich), una única región transmembranal (TM), un dominio cinasa (KD), y una región C-terminal (TC), contiene 4 zipper de leucina (LZ). La región péptido señal putativo se muestra como un cuadro de color negro. El bucle de activación de las cinasas se designa AL (Kim and Wang, 2010).

En *Arabidopsis*, un gene de SERK1 (*AtSERK1*) fue caracterizado como un ortólogo funcional de *DcSERK* en la embriogénesis (Hecht *et al.*, 2001). Su localización subcelular como proteína integral de membrana (Shah *et al.*, 2001a) y también fueron reportadas las actividades de fosforilación/desfosforilización con la proteína fosfatasa de cinasas activadas (KAPP) (Shah *et al.*, 2001b, 2002). Además de *AtSERK1*, cuatro genes

adicionales con secuencias similares a SERK1 fueron identificados en el genoma de *Arabidopsis* (Hecht *et al.*, 2001).

Estos resultados sugieren que las SERKs pueden constituir una pequeña familia genética conservada funcionalmente en plantas, con un rol específico en la embriogénesis y posiblemente en otros procesos del desarrollo (Hu *et al.* 2005).

Para la proteína tipo cinasa SERK 1, el posible ligando y los sustratos citosólicos, deben ser aclarados con el fin de definir su papel exacto en la embriogénesis (Attila *et al.*, 2003)

Se ha utilizado una combinación de coimmunoprecipitaciones a bases de GFP y variantes de CFP (cyan fluorescent protein) como etiquetas, para la identificación de proteínas asociadas al receptor SERK1 (Rumyana *et al.*, 2006). Estos experimentos permitieron sugerir que en plántulas de *Arabidopsis*, la señalización mediada por el receptor SERK1 combina elementos de la vía brasinoesteroides con una cadena de transducción de señales corta, en el que, el receptor SERK1 se encuentra en un complejo con sus reguladores transcripcionales afines, como AGL15 (Rumyana K. *et al.*, 2006).

1.11 LOS RECEPTORES QUIMÉRICOS

Los receptores quiméricos tienen un gran potencial como una herramienta analítica para el estudio de las funciones de receptores individuales (Üllrich y Schlessinger, 1990). Esto es especialmente importante para aquellos receptores cuyo ligandos no son conocidos. La capacidad para construir y utilizar receptores quiméricos provee una poderosa herramienta para regular específicamente los eventos celulares activados por un receptor particular.

Los receptores quiméricos pueden ser funcionales cuando se expresan *in vivo*. He *et al.* (2000) pudieron inducir una respuesta de defensa contra patógenos cuando adicionaron brasinoesteroides a células de arroz transformadas con un receptor quimérico, construido por la fusión del dominio citoplásmico (con actividad de cinasa) del receptor XA21, con el dominio extracelular (de unión al ligando) del receptor de brasinoesteroides BRI1 de *Arabidopsis thaliana*. Este receptor quimérico inició efectivamente las respuestas de

defensa de plantas en células de arroz después de una exposición a brasinoesteroides, lo cual prueba que los receptores quiméricos pueden desplegar funciones biológicas cuando se expresan en plantas transformadas.

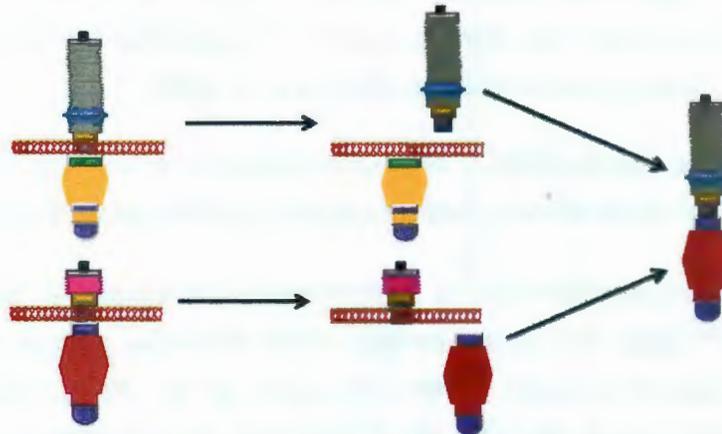


Figura 1.7 Esquematización de la construcción de un receptor quimérico tipo LRR. La conformación de un receptor quimérico es a partir de dos o más receptores entre los cuales se pueden intercambiar dominios.

1.12 OBJETIVO GENERAL

Construir el receptor quimérico BRI1::SERK1 constituido por la región extracelular del receptor BRI1 de *Arabidopsis thaliana* y los dominios transmembranal y citosólico del receptor SERK1 de *Coffea canephora* y transformar explantes embriogénicos de café con esta construcción.

1.13 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Diseñar *in silico* el ADN complementario de la proteína quimérica BRI1::SERK1
2. Verificar la secuencia nucleotídica de la construcción.
3. Subclonar el receptor quimérico hacia un vector binario.
4. Transformar explantes embriogénicos de *Coffea canephora* y verificar la integración del transgen en el genoma.
5. Verificar la expresión del transgen mediante la detección del transcrito.

1.14 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



BIBLIOGRAFÍA

- Attila Fehér, Taras P. Pasternak & Dénes Dudits, (2003). Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant cell tissue and Organ culture* 74: 201-228
- Becraft, P. W, Stinard, P. S and McCarty, D. R, (1996). CRINKLY4: A TNFR-like receptor kinase involved in maize epidermal differentiation. *Science* 273:1406–1409.
- Bhojwani S.S, Razdan M. K, (1996) *Plant tissue culture: theory and practice*. A revised edition. Elsevier, Amsterdam. Pp 467
- Boutilier K., R. Offringa, V.K. Sharma, H. Kieft, T. Ouellet, L. Zhang, J. Hattori, C. M. Liu, A.A.M. van Lammeren, B. L. A. Miki, J.B.M. Custers and M.M. van Lookeren Campagne, (2002). Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *Plant Cell* 14: 1737-1749.
- Brand U., J. C. Fletcher, M. Hobe, E. M. Meyerowitz, R. Simon, (2000). Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 289, 617-619
- Butowt R, Niklas A, Rodrigues–Garcia M.I. & Majewska–Sawka A., (1999). Involvement of JIM13 and JIM8-responsive carbohydrate epitopes in early stages of cell wall formation. *J. Plant Res.* 112: 107–116
- Canche-Moo R.L.R., A. Ku-Gonzalez, C. Burgeff, V.M. Loyola-Vargas, L.C. Rodriguez-Zapata & E. Castaño, (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (2006) 84: 373–377
- Chapman A, Blervacq A-S, Vasseur J & Hilbert J. L., (2000). Arabinogalactan proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211: 305–314

- Clark S. E, Williams R. W, Meyerowitz E. M., (1997). The CLAVATA1 gene encodes a putative receptor kinase that controls shoot and floral meristem size in *Arabidopsis*. *Cell* 89:575–585.
- Coutos-Thévenot P., O. Maës, T. Jouenne, M.C. Mauro, M. Boulay, A. Deloire and J. Guern, (1992). Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Sci.* 86: 137-145.
- Coutos-Thevenot, P. Maes O, Jouennen T, Mauro M. C., Boulay M., Deloire A, Guern J., (1992). Extracellular protein patterns of grapevine cell suspensions in embryogenic and nonembryogenic situations. *Plant Sci.* 86: 137-145
- Dijak M., D.L. Smith, T. J. Wilson, and D. C. W. Brown, (1986). Stimulation of direct embryogenesis from mesophyll protoplasts of *Medicago sativa*. *Plant Cell Reports* (1986) 5: 468- 470
- Dodeman, V. L., G. Ducreux & M. Kreis., (1997). Zygotic embryogenesis versus somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 48:1493-1509.
- Duditis D, Gyorgyeyj, Bogre L. and Bako L., (1995). Molecular biology of somatic emryogenesis. pp. 267-308 in Thorpe T.A. (ed.) *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- Dure L., (1985). Embryogenesis and gene expression during seed formation. *Plant Mol. Cell Biol.* 2: 179-197
- Emons A. M. C., (1994). Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Bot. Neerl.* 43:1-14.
- Enrique Sánchez-Lemus, José A. Arias-montaño., (2004) Transactivación de receptores con actividad de cinasa de tirosina (RTK's) por receptores acoplados a proteínas G. *Rev Biomed*; 15:33-48
- Filipecki M.K. and Z. Przybecki, (1994). Marker proteins of somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Genet. Pol.* 35: 1-9.

- Gananapragasam S. and Vasil I.K., (1992). Cryoconservation of immature embryos, embryogenic callus and cell suspension cultures of gramineous species. *Plant Science* 83: 205-215.
- Gomez-Gomez L. and Boller T., (2000). FLS2: An LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5:1003–1011.
- Halperin W. and Jensen W.A., (1967). Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. *J. Ultrastruct Res* 18:428-443.
- He H, Wang ZY, Li J, Zhu Q, Lamb C. and Ronald P., (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. *Science* 288:2360-2363.
- Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries S.C., (2001). The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor kinase 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol* 127:803–816.
- Hu H, Xiong L. and Yang Y., (2005). Rice SERK1 gene positively regulates somatic embryogenesis of cultured cell and host defense response against fungal infection. *Planta* 222:107–117.
- Jiménez, V.M., (2001). Review, regulation of *in vitro* somatic embryogenesis with emphasis on the role of endogenous hormones. *Sociedade Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13 (2): 196 - 223.
- Jinn T, Stone J, Walker J., (2000). HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev* 2000, 11:108-117.
- Jinn, T L, Stone, J M and Walker, J. C., (2000). HAESA, an *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor kinase, controls floral organ abscission. *Genes Dev.* 14, 108–117.

CAPÍTULO I

- Jong AJ, Cordewener J, Lo Shiavo F, Terzi M, Vandekerckhove j, van Kammen A & de Vries S. C., (1992). A *Daucus carota* somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 4: 425-433
- Jong AJ, Heidstra R, Spaik HP, Hartog MV, Meijer EA, Hendriks T, Lo Shiavo F, Terzi M, Bisseling T, Van Kammen A and De Vries S.C., (1993). *Rhizobium* lipooligosaccharides rescue a *Daucus carota* somatic embryo variant. *Plant Cell* 5, 615-620.
- Karlova R, Boeren S, Russinova E, Aker J, Vervoort J and de Vries S.C., (2006) The *Arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-Like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *The Plant Cell* 18:626–638.
- Keiko U Torii, (2000). Receptor kinase activation and signal transduction in plants: an emerging picture. *current opinion in plant biology* 2000, 3:361–367.
- Kobe B., J. Deisenhofer, (1995). A structural basis of the interactions between leucine-rich repeats and protein ligands. *Nature* 374, 183-186
- Kobe B., J. Deisenhofer, The leucine-rich repeat, (1994). A versatile binding motif. *Trends Biochem. Sci.* 19, 415-421
- Komamine A., (1990). *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 307-313.
- Komamine A., Matsumoto M., Tsukahara M, Fujiwara A., Kawahara R., Ito M., Smith J., Nomura K., Fujimura T., (1990). Mechanisms of somatic embryogenesis in cell cultures—physiology, biochemistry and molecular biology. In: Nijkamp HJ, Van der Plas LHW, Van Aartrijk J (eds). *Progress in plant cellular and molecular biology*. Kluwer academic publishers, Dordrecht, Netherlands, pp 307–313
- Krikorian, A.D. and Berquam, D.L., (1969). Plant cell and tissue cultures: the role of Haberlandt. *But Rev.* 35: 59-88.

- Lawton M.A, Yamamoto R.T., Hanks S.K., Lamb C.J., (1989). Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3140–44
- Li, J., and Chory, J., (1997). A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signaling transduction. Cell 90, 929-938.
- Lo Schiavo F., (1994). The genetics and physiology of the totipotent cell. pp 73-84 in Couzzi G. and Puigdomenech P. (eds.) *Plant Molecular Biology*. SpringerVerlag, Berlin, Heidelberg.
- Lo Schiavo, F., Giuliano, G., De Vries, S.C., Genga, A., Bollini, R., Pitto, L., Cozzani, G., Nuti-Ronchi, V., and Terzi, M., (1990). A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. Mol. Gen. Evol. 223, 385-393.
- Lotan T., M.A. Ohto, K.M. Yee, M.A.L. West, R. Lo, R.W. Kwong, K. Yamagishi, R.L. Fischer, Goldberg R.B. and J.J. Harada, (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. Cell 93: 1195–1205.
- Majewska–Sawka A. & Nothnagel E.A., (2000). The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. Plant Physiol. 122: 3–9
- Mark Schena, Alanm. Lloy D. and Ronaldw. Davis (1991). A steroidinducible gene expression system for plant cells Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp.10421-10425, December 1991
- McCabe PF, Valentine TA, Forsberg L.S. & Pennell R.I., (1997). Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. Plant Cell 9: 2225–2241
- Meinke D.W., (1992). A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. Science 258: 1647-1650.

CAPÍTULO I

- Nielsen K.A. and I.B. Hansen, (1992). Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Plant. Physiol. 139: 489-497.
- Noualle CH and Petiart V., (1988). Semecens artificielles: rêves et réalités. Biofutur 67: 33-38.
- Philip W. Bercraft, (2002). Receptor kinase signaling in plant development. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2002. 18:163-92
- Poulsen GB, Frugis G, Albrechten M, Marroti, D., (1996). Synthesis of extracellular proteins in embryogenic and non-embryogenic cell cultures of alfalfa. Plant Cell Tiss Org Cult 44: 257-260.
- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos and V.M. Loyola Vargas, (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 86: 285-301.
- Raghavan V., (2006). Can carrot and Arabidopsis serve as model systems to study the molecular biology of somatic embryogenesis? Curr Sci 90: 1336-1343.
- Reinert, j. (1958). Untersuchungen über die morphogenese and gewebeulturen. Ber. Dtsen. But. Ges 71:15.
- Sara von Arnold, Izabela Sabala, Peter Bozhkov, Julia Dyachok & Lada Filonova, (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69: 233-249, 2002.
- Sara von Arnold, Izabela Sabala, Peter Bozhkov, Julia Dyachok y Lada Filonova, (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant cell 69: 233-249
- Schmidt E.D.L., F. Guzzo, M.A.J. Toonen and de Vries S.C., (2001). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Develop. 124: 2049-2062.

- Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries S.C., (1997). A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 124:2049–2062
- Schopfer, C., Nasrallah, M. and Nasrallah, J. (1999). The male determinant of self-incompatibility in Brassica. *Science* 286, 1697–1700.
- Shah K, Gadella TW Jr, van Erp H, Hecht V, de Vries S.C., (2001a). Subcellular localization and oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein. *J Mol Biol* 309:641–655
- Shah K, Russinova E, Gadella TW Jr, Willemse J, de Vries S.C., (2002). The *Arabidopsis* kinase-associated protein phosphatase controls internalization of the somatic embryogenesis receptor kinase 1. *Genes Dev* 16:1707–1720
- Shah K, Vervoort J, de Vries S.C., (2001b). Role of threonines in the *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 activation loop in phosphorylation. *J Biol Chem* 276:41263–41269
- Shin-Han Shiu and Anthony B. Bleeker, (2001). Plant Receptor-Like Kinase Gene Family: Diversity, function, and Signaling. *Struct Biol*, 11 (6): 725–732 DOI: 10.1126/stke.2001.113.re22
- Smith D.L. and Kirkorian A.D., (1990). Somatic proembryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal. *Plant Cell Rep.* 9, 468–470.
- Snyders S., B. D. Kohorn, (1999). TAKs, thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *J. Biol. Chem.* 274, 9137–9140
- Song W.-Y, G.-L. Wang, L.-L. Chen, H.-S. Kim, L.-Y. Pi, T. Holsten, J. Gadner, B. Wang, W.-X. Zhai, L.-H. Zhu, C. Fauquet, P. Ronald, (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 270, 1804–1806

CAPÍTULO I

- Song W-Y, Wang G-L, Chen L-L, Kim H-S, Pi L-Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W-X, Zhu L-H., (1995). A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* 1995, 270:1804-1806.
- Stein J C, Howlett B, Boyes D C, Nasrallah M E and Nasrallah J. B., (1991). SRK, the stigma-specific S locus receptor kinase of *Brassica*, is targeted to the plasma membrane in transgenic tobacco. *The Plant Cell* 8:429-445.
- Steward, F. C.; mapes, M. O. y Mears, K., (1958). Growth and organized development of cultured cells; 2: organization in cultures grown from freely suspended cells. *Amer. J. bot.* 45: 705-708.
- Stone JM, Collinge M.A., Smith R.D., Horn M.A. and Walker J.C., (1994). Interaction of a protein phosphatase with an *Arabidopsis* serine-threonine receptor kinase. *Science* 266:793-795.
- Stone S.L., L.W. Kwong, K.M. Yee, J. Pelletier, L. Lepiniec, R.L. Fischer, R.B. Goldberg and J.J. Harada, (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 11806–11811.
- Stone SL, Kwong LW, Yee KM, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer R.L., Goldberg RB, and Harada J.J., (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98:11806–11811.
- Tae-Wuk Kim and Zhi-Yong Wang, (2010). Transduction from Receptor Kinases to Transcription Factors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010.61:681-704
- Takayama S, Shiba H, Iwano M, Shimosato H, Che F-S, Kai N, Watanabe M, Suzuki G, Hinata K and Isogai A., (2000). The pollen determinant of selfincompatibility in *Brassica campestris*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97:1920-1925.

- Thompson HJM & Knox J.P., (1998). Stage-specific responses of embryogenic carrot cell suspension cultures to arabinogalactan protein-binding β -glucosyl Yariv reagent. *Planta* 205: 32–38
- Trotochaud A. E., S. Jeong, S. E. Clark, (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* 289, 613-617
- Trotochaud A.E., Jeong J. and Clark S.E., (2000). CLAVATA3, a multimeric ligand for the CLAVATA1 receptor-kinase. *Science* 289, 613–617.
- Ullrich A, Schlessinger J., (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990: 61: 203-12.
- Villanueva Alonzo, H.J., (2006). Aspectos bioquímicos y moleculares en el inicio de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. *Tesis de maestría*. Centro de investigación científica de Yucatán (CICY). p 64-65.
- Vries, S. C., Booij H, Meyerink P., Huisman G., Wilde HD., Thomas TL., Van Kammen A., (1988). Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta* 176: 196-204
- Walker JC, Zhang R., (1990). Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of *Brassica*. *Nature*, 345:743-746.
- Wang Z-Y, Seto H, Fujioka S, Yoshida S and Chory J., (2001). BRI1 is a critical component of a plasma-membrane receptor for plant steroids. *Nature* 410:380383.
- William M. Roca, Luis A. Mroginski., (1993). Cultivos de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones. Editorial CIAT publicación 151 Pag. 314-1327
- Zimmerman J.L., (1993). Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell* 5: 1411-1423
- Zuo J., Q.-W. Niu, G. Frugis and N.-H. Chua, (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *Plant J.* 30: 349-359.

CAPÍTULO I

Libros.

Harvey Lodish Arnold Berk S. Lawrence Zipursky. Molecular Cell Biology - 4°
Edición. Ed., Freeman. I.S.B.N : 0-7167-3706-X

CAPÍTULO II

DISEÑO DEL RECEPTOR QUIMÉRICO BRI1::SERK1

2.1 INTRODUCCIÓN

En nuestro laboratorio estamos interesados en estudiar las funciones de la cinasa tipo receptor SERK1 de *Coffea canephora* (*CcSERK1*). Para ello, utilizamos un protocolo de ES directa extremadamente eficiente, en el que el inicio de la ES se consigue adicionando citocininas a explantes foliares previamente "condicionados" (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio se ha determinado que en este modelo el gen *CcSERK1* se expresa entre los cinco y los diez días después de la adición de citocininas, y que las primeras estructuras macroscópicas aparecen alrededor de los diez días (Villanueva-Alonzo, 2006).

Sin embargo en este modelo de ES, la aparición de los embriones somáticos es un proceso asincrónico, lo que limita el estudio del proceso de transición, por lo que para estudiar la activación de *CcSERK1* se pretende sincronizar su activación durante el inicio de la embriogénesis somática, mediante la construcción de un receptor quimérico, constituido por el dominio extracelular, con unión al ligando, del receptor de brasinoesteroides (BRI1) de *Arabidopsis* y los dominios transmembranal e intracelular con actividad de cinasa de SERK1 de café. De esta forma, se propone que la adición de brasinoesteroides a los tejidos transformados de café permitirá la activación del dominio de cinasa de *CcSERK1*. Esta es una estrategia cuya utilidad ha sido demostrada en otros modelos (He *et al.*, 2000).

Esta propuesta experimental aprovecha la ventaja de que SERK1 pertenece a la familia de receptores tipo cinasas (RLKs: Receptor-like kinases), cuyos miembros poseen una extraordinaria similitud tanto en la estructura como en el mecanismo de activación de los RLK de una misma sub-familia, lo cual facilita la generación y el uso de receptores quiméricos, fusionando mediante ingeniería genética el dominio extracelular de unión del ligando de un receptor cuyo ligando es conocido, con los dominios transmembranal e

intracelular de un receptor “huérfano”; esta estrategia ha sido ampliamente utilizada en animales y en levaduras (Nishiya y De Franco, 2004).

Los receptores quiméricos tienen un gran potencial como una herramienta analítica para el estudio de las funciones de receptores individuales (Üllrich and Schlessinger, 1990). Esto es especialmente importante para aquellos receptores cuyo ligando no son conocidos. La capacidad para construir y utilizar receptores quiméricos provee una poderosa herramienta para regular específicamente los eventos celulares activados por un receptor particular.

Los receptores quiméricos pueden ser funcionales cuando se expresan *in vivo*. He *et al.* (2000) pudieron inducir una respuesta de defensa contra patógenos cuando adicionaron brasinoesteroides a células de arroz transformadas con un receptor quimérico, construido por la fusión del dominio citoplásmico (con actividad de cinasa) del receptor XA21, con el dominio extracelular (de unión al ligando) del receptor de brasinoesteroides BRI1 de *Arabidopsis thaliana*. Este receptor quimérico inició efectivamente las respuestas de defensa de plantas en células de arroz después de una exposición a brasinoesteroides, lo cual prueba que los receptores quiméricos pueden desplegar funciones biológicas cuando se expresan en plantas transformadas.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado para esta investigación fueron plántulas de *C. canephora* donadas por el grupo del Dr. Víctor Loyola, propagadas *in vitro* por el método de microesquejes por 3 meses. Posteriormente, las plántulas fueron cultivadas *in vitro* bajo condiciones de fotoperiodo (16/8 h luz/oscuridad) a 25 °C en un medio de cultivo que contenía 4.33 g·L⁻¹ de sales MS, mio-inositol 0.55 mM, tiamina 0.012 mM, cisteína 0.158 mM, sacarosa 0.0876 mM, ácido naftalenacético 0.054 mM, cinetina 0.00232 mM, pH ajustado a 5.8.

2.2.2 VECTOR DE CLONACIÓN PUC57

El vector pUC57 es el portador de la secuencia nucleotídica de la quimera BRI1::SERK1 (BRISERK1), la cual fue sintetizada artificialmente mediante un proceso químico (GenScript®). El tamaño del vector es de 2,710 pb y el del inserto (BRISERK1) es de 3,899 pb, obteniendo un tamaño final del plásmido (vector + inserto) de 6,609 pb.

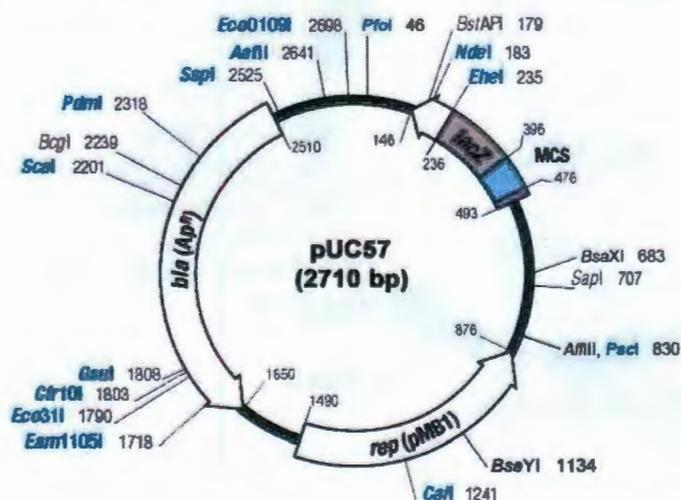


Figura 2.1 Esquema del vector de clonación pUC57. El vector presenta un gen de resistencia para ampicilina (*bla*), un gen para la selección de transformantes (*lacZ*), así como un sitio múltiple para clonación (MCS).

2.2.4 DISEÑO DEL RECEPTOR QUIMÉRICO

La quimera BRISERK1 se diseñó *in silico* utilizando herramientas bioinformáticas (multialin, plantCare, BLAST etc.), a partir de la secuencia del ADN complementario del gen BRI1, reportada en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI, NM_120100.2) y de la secuencia del ADN complementario del gen *CcSERK1*, obtenida en nuestro laboratorio (Pérez Pascual, comunicación personal).

Mediante el diseño *in silico* se generó una construcción que tuviera la secuencia nucleotídica correspondiente a los dominios extracelular y transmembranal de BRI1 de *A. thaliana* unidas a la secuencia nucleotídica correspondiente al dominio yuxtamembranal e intracelular con actividad de cinasa de *CcSERK1* como se especifica en la Figura 2.3 y anexo II. Después de verificar la ausencia de errores en la secuencia de la quimera (BRISERK1), se mandó a sintetizar en la empresa GenScript®.

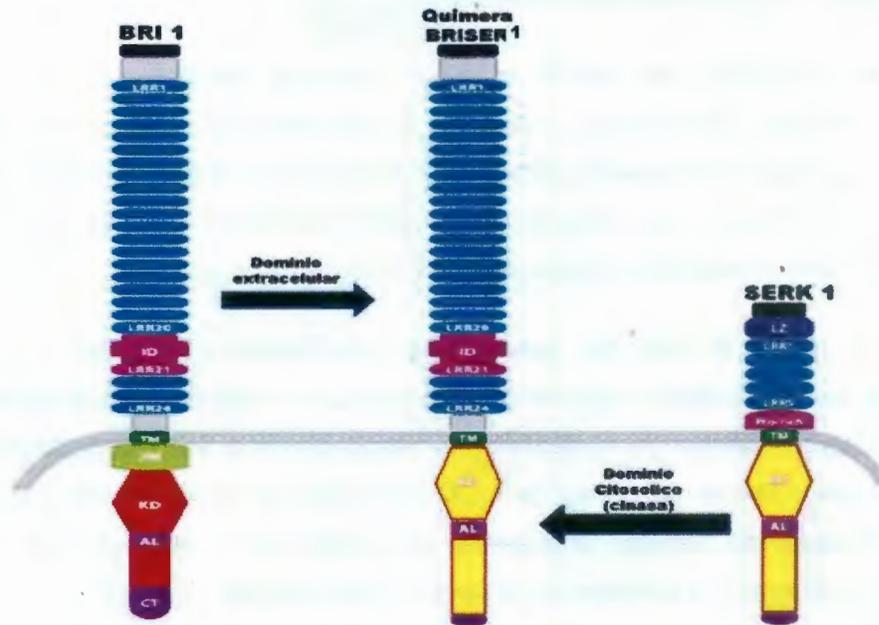


Figura 2.3 Diagrama esquemático de la construcción del receptor quimérico tipo cinasa BRISERK1 a partir de dos RLK diferentes. La secuencia del ADN complementario del dominio extracelular de unión al ligando de la RLK donadora (BRI1) es ligada *in vitro* a la secuencia de ADNc del dominio intracelular con actividad de cinasa de la RLK receptora (SERK1). La nueva RLK (BRISERK1) contiene las secuencias para localización en la membrana (Diseñado con base en información de Kim y Wang, 2010).

2.2.5 REACCIONES DE LIGACIÓN

La estrategia de subclonación consistió en digerir los receptores donador y receptor con una única enzima (*Kpn* I) para realizar la ligación directa del inserto sin purificar las bandas del gel de agarosa, se realizó una digestión adicional del plásmido pUC57 con la enzima *Apa* I, para eliminar los segmentos con extremos cohesivos *Kpn* I - *Kpn* I, generando dos segmentos con extremos *Apa* I - *Kpn* I, lo cual elimina la posibilidad de que el plásmido donador se inserte en el plásmido receptor, debido a que el sitio de restricción de la enzima *Apa* I solo se encuentra en la estructura del vector pUC57. Para las reacciones de ligación del inserto en el vector pCAMex, se mezcló concentraciones

conocidas de los productos de digestión de los plásmidos pCAMex y pBRISERK1; a la mezcla se adicionó 6 μ L de la ligasa de T4 (invitrogen), 14 μ L de amortiguador de ligasa 5X, 40 μ L del inserto, 10 μ L de vector para obtener un volumen total de reacción de 70 μ L. La reacción de ligación se incubó a 4 °C por 12 horas, posteriormente a esta misma mezcla de ligación, se le adicionó 6 μ L de ligasa T4, 2 μ L de amortiguador de ligasa 5X, 2 μ L de agua libre de nucleasas, y se incubó por 12 horas a 4 °C.

2.2.6 VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DEL INSERTO EN pCAMex

Debido a que la subclonación se realizó con una sola enzima de restricción, existía la probabilidad estadística de que en las clonas recombinantes existiera 50% de inserto en orientación correcta y 50% en orientación antisentido. Para determinar cuál es la orientación correcta se realizaron digestiones con enzimas de restricción y mediante el análisis de los patrones de digestión se identificaron las dos orientaciones. Debido a que en el vector pCAMex existen dos sitios de reconocimiento para la enzima *Xho* I y en el inserto solo existe un sitio, los patrones esperados empleando la enzima de restricción *Xho* I fueron los siguientes.

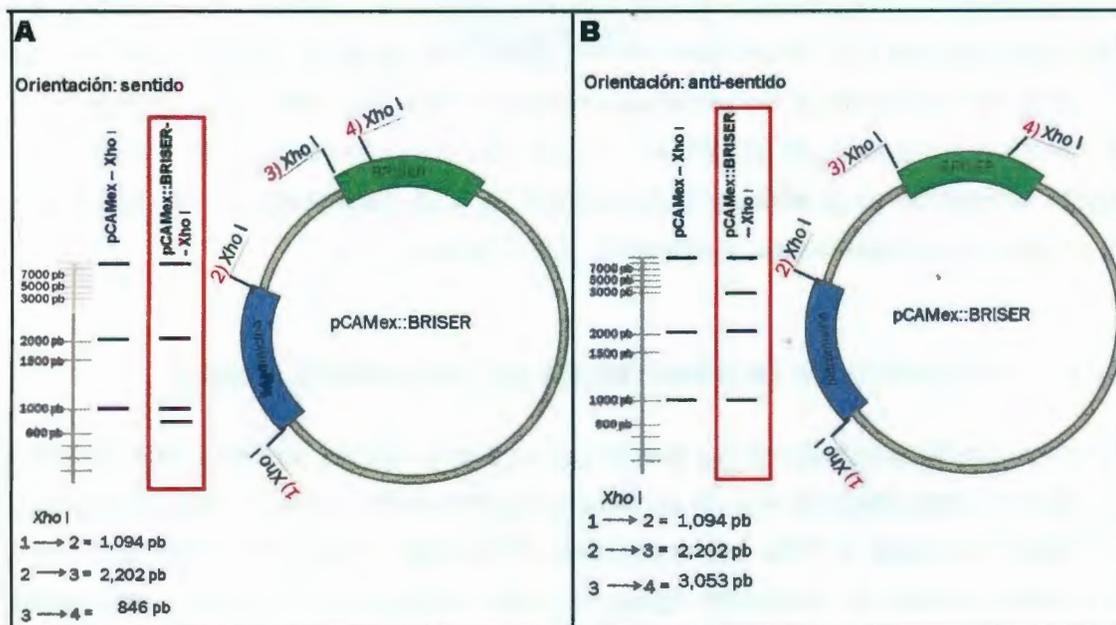


Figura 2.4 Esquema de la verificación de la orientación del inserto BRISERK1 en pCAMex. Panel **A**. El diagrama muestra la conformación y despliegue electroforético esperado para el inserto en el vector pCAMex, determinado tres tamaños esperados que son de 1,094 pb, 2,202 pb y 846 pb. Panel **B**. El diagrama muestra la conformación y despliegue electroforético esperado para el inserto en anti-sentido el vector pCAMex, esperando tres bandas de tamaño 1,094 pb, 2,202 pb, 3,053 pb.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 DISEÑO DEL RECEPTOR QUIMÉRICO BRISERK1

La quimera BRISERK1 está constituida por un fragmento de cDNA de 2,700 pb del gen BRI1 que corresponde a los dominios extracelular y transmembranal del transcrito de BRI1 y un fragmento de cDNA de 1,199 pb que corresponde al dominio catalítico de cinasa del transcrito de SERK1 (Figura 2.4 y anexo II). La región 5' no traducible contiene elementos regulatorios para el inicio de la transcripción (Anexo III).

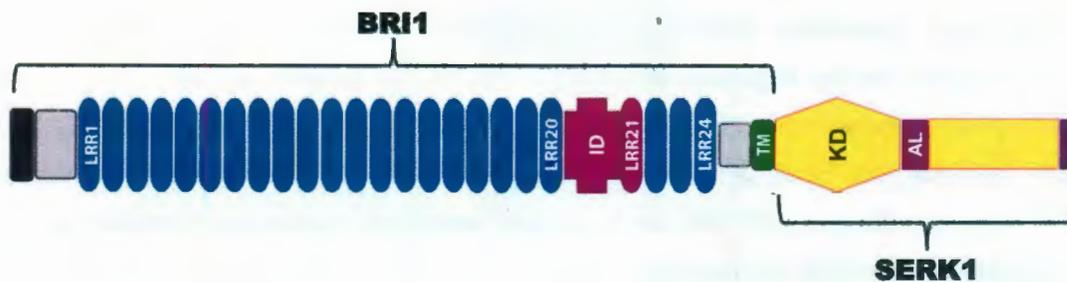


Figura 2.5 Representación esquemática del receptor quimérico tipo cinasa BRISERK1. La quimera se compone de una región extracelular con 24 repeticiones ricas en leucina (LRR) y una isla de 70 aminoácidos (ID), una única región transmembranal (TM) y una región citosólica con un dominio de cinasa (KD), una región C-terminal (TC) y un bucle de activación de las cinasas (AL). La región del péptido señal putativo se muestra como un cuadro de color negro y las regiones no asignadas se muestran como cuadros de color gris.

2.3.2 VERIFICACIÓN EXPERIMENTAL DE LA QUIMERA BRISERK1

La empresa GenScript® proporcionó 4 µg del cDNA de la quimera sintetizada, insertada en el vector de clonación pUC57. El plásmido conteniendo al inserto BRISERK1 se nombró pBRISERK1.

Para verificar la identidad del cDNA, después de transformar células competentes de *E. coli*, cepa DH5α, con el plásmido resuspendido (protocolo en anexos), se llevaron a cabo dos tipos de experimentos confirmatorios. Primero se realizó una amplificación del inserto mediante PCR, usando oligonucleótidos específicos que alinean en el dominio extracelular de BRI1 (BRI-FWD) y en el dominio de cinasa de *CcSERK1* (SERK-RWD). El tamaño del amplicón es de 2,861 pb. Como segundo experimento comprobatorio se realizaron digestiones secuenciales con las enzimas *Kpn* I y *Xho* I. El inserto está flanqueado por dos sitios *Kpn* I y solo cuenta con un sitio de reconocimiento para la enzima *Xho* I en su interior.

En la Figura 2.5 se observa el fraccionamiento de los productos de la amplificación por PCR. En los carriles 2 al 4 se observa el amplicón de 2,891 pb, que es el tamaño esperado, lo que confirma la amplificación del fragmento de la quimera con los

oligonucleótidos específicos BRI-FWD y SERK-RWD. En el carril 5 se encuentra el producto obtenido con los oligonucleótidos M13, con los que se debe amplificar la quimera completa y aproximadamente 200 pb flanqueándola en ambos extremos, pertenecientes al vector de clonación. En el carril 6 se observa un amplicón de 2,089 pb correspondiente al cDNA completo del gen *AtSERK1* de *A. thaliana*, empleado como testigo positivo de los componentes de la mezcla de reacción.

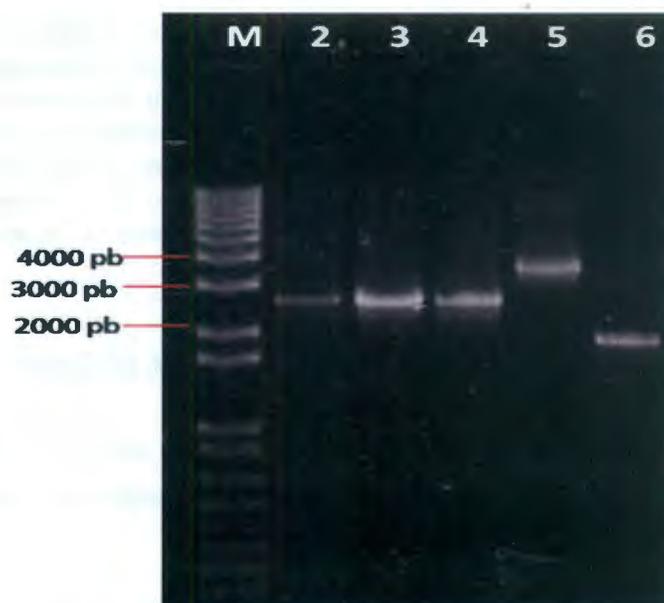


Figura 2.6 Amplificación de la quimera BRISERK1. Alícuotas de 2 μL de los productos de PCR obtenidos con la combinación de cebadores BRI-FWD y SERK-RWD, con diferentes temperaturas de alineamiento, fueron **fraccionados** en un gel nativo de agarosa y teñidos con $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. Carril M: escalera de ADN de 1 Kb; carril 2: BRISERK1 (65 °C); carril 3: BRISERK1 (60 °C); carril 4: BRISERK1 (55 °C); carril 4: oligonucleótidos M 13 como testigo; carril 6: *AtSERK1* como testigo.

De la Figura 2.5 se desprende que la mejor temperatura para la amplificación por PCR de la quimera BRISERK1 es entre 55 y 60 °C, ya que con estas se presentó una mayor concentración del amplicón.

Con respecto a los análisis de digestión con las enzimas *Kpn* I y *Xho* I, en el carril 1 de la Figura 2.6 se observa un único fragmento de alrededor de 6,609 pb como resultado de la

digestión con *Xho* I, este resultado es esperado ya que el inserto BRISERK1 solo cuenta con un sitio único para la enzima *Xho* I. En el carril 2 se observan dos fragmentos, de 3,899 pb y 2,700 pb, correspondientes al inserto (BRISERK1) y al vector (pUC57), respectivamente.

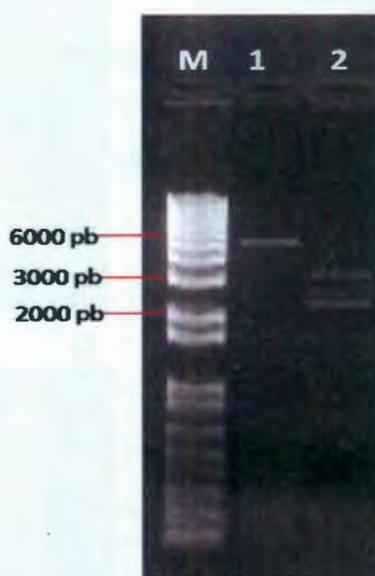


Figura 2.7 Fraccionamiento de la digestión de pBRISERK1. Alícuotas de 5 μ L de los productos obtenidos de la digestión enzimática fueron fraccionados en un gel nativo de agarosa y teñidos con μ g·mL⁻¹ de bromuro de etidio. Carril M: escalera de ADN de 1 Kb; carril 1: pBRISERK1 digerido con *Xho* I; carril 2: pBRISERK1 digerido con *Kpn* I.

2.3.3 SUBCLONACIÓN DE BRISERK1 EN EL VECTOR PCAMEX

Para subclonar el cDNA de la quimera BRISERK1 en el vector pCAMex, se utilizó el sitio de restricción de la enzima *Kpn* I, localizado en ambos lados de la quimera y también en el sitio múltiple de clonación de pCAMex.

Lo primero que se realizó fue verificar la calidad de los plásmidos donador (pBRISERK1) y receptor (pCAMex). En la figura 2.8A se puede visualizar la buena calidad y cantidad de los plásmidos obtenidos; en los carriles 2 al 4 se observa pCAMex con tamaño de 14 kb, mientras tanto en los carriles 5 al 7 se observa pBRISERK1 con un tamaño de 6,609 pb.

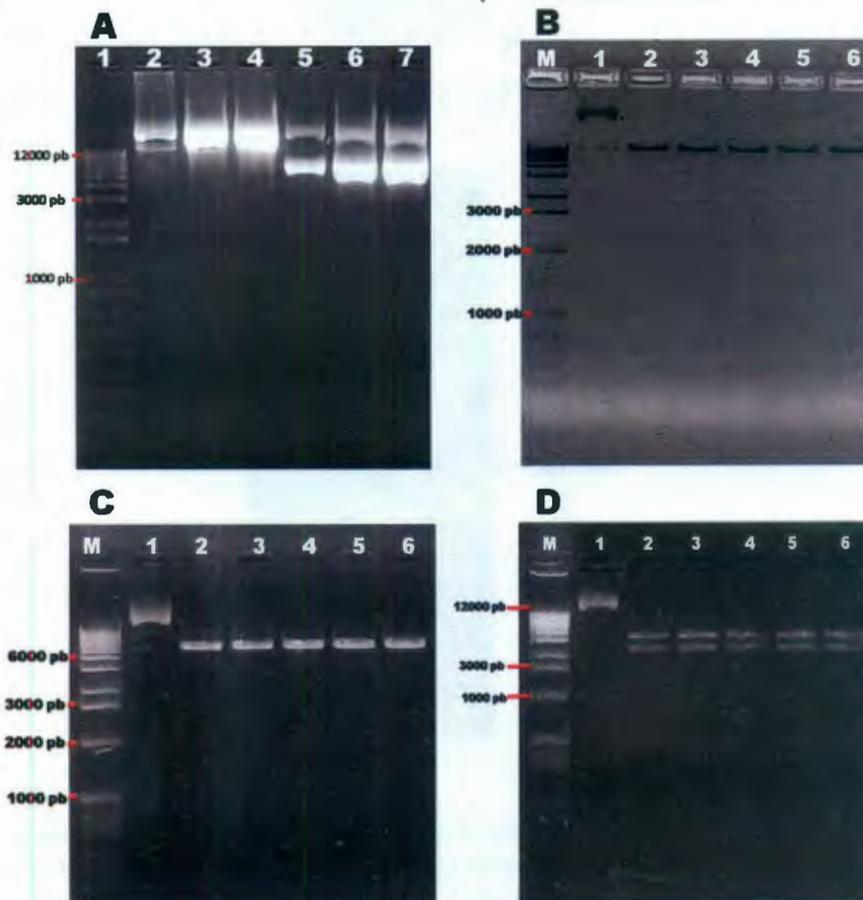


Figura 2.8 Digestión enzimática de los plásmidos pBRISERK1 y pCAMex. Panel A. plásmidos nativos; carril 1: escalera de ADN de 1 kb; carriles 2-4: plásmido pCAMex; carriles 5-7: plásmido pBRISERK1. Panel B. Digestión de pCAMex con la enzima *Kpn* I; carril 1: pCAMex sin digerir; carriles 2-6: pCAMex digerido. Panel C. digestión de pBRISERK1 con la enzima *Apa* I; carril 1: pBRISERK1 sin digerir; carriles 2-6: pBRISERK1 digerido con la enzima *Apa* I. panel D. digestión de pBRISERK1 con la enzima *Kpn* I; carril 1: pBRISERK1 sin digerir; carriles 2-6: pBRISERK1 digerido. Carriles M: escalera de ADN de 1 Kb.

Después de comprobar la integridad del plásmido donador pBRISERK1 y del plásmido receptor pCAMex, se procedió a la digestión enzimática.

El plásmido receptor pCAMex se digirió con la enzima *Kpn* I. En la figura 2.7B, se observa el producto obtenido de la digestión de pCAMex. Se puede visualizar una única banda en los carriles 2 al 6 de aproximadamente 14 Kb; en el carril 1 se observan dos bandas, correspondientes al plásmido pCAMex nativo sin digerir, que se utilizó como testigo para la digestión.

Posteriormente. En la figura 2.7C se observa el fraccionamiento del producto obtenido de la digestión de pBRISERK1 con la enzima *Apa* I. En el carril uno se puede visualizar dos bandas que corresponden a pBRISERK1 nativo sin digerir, que se considera como control negativo. En los carril 2 al 6 se observa una única banda correspondiente a pBRISERK1 digerido con la enzima *Apa* I con un tamaño de 6609 pb, el cual es el esperado.

Después de digerir el plásmido donador con la enzima *Apa* I, se procedió a la segunda digestión consecutiva con la enzima *Kpn* I, para liberar el inserto BRISERK1 y subclonarlo en pCAMex.

El plásmido donador pBRISERK1 cuenta con dos sitios para la enzima de restricción *Kpn* I, los cuales se encuentran flaqueando a BRISERK1 en los extremos 5' y 3'. Con esta digestión se libera un fragmento de 3,899 pb, correspondiente al gen quimérico completo. Se procedió a la digestión del plásmido donador pBRISERK1 con las enzimas *Apa* I y *Kpn* I para realizar las reacciones de ligación, como se describe en Materiales y Métodos.

En la figura 2.8 D, se puede observar la electroforesis de los productos de la segunda digestión, fraccionado en un gel de agarosa donde en los carriles 2 al 6 se visualizan dos bandas que corresponden a las muestras sometidas al proceso de digestión con la enzima *Kpn* I; una banda superior que cuenta con un tamaño de 3,899 pb una banda inferior de 2,710 pb, aproximadamente. En el carril uno se puede apreciar dos bandas pertenecientes a pBRISERK1 si digerir que se utilizó como testigo de la digestión.

Contando con los plásmidos receptor y donador digeridos con las diferentes enzimas antes mencionadas, se procedió a la ligación del inserto BRISERK1 en el vector de expresión pCAMex.

Para la ligación, se utilizaron concentraciones con una proporción 1:4 de vector-inserto. En la primera parte del ensayo, los amortiguadores, la enzima, las sales y los cebadores

CAPÍTULO II

remanentes de las reacciones de digestión se eliminaron pasando las mezclas por una columna de purificación de productos de PCR. Con la mezcla desalada se procedió al proceso de ligación.

En la figura 2.9, se observa el fraccionamiento por electroforesis en un gel de 1.5 % de concentración, del producto obtenido por el evento de ligación. Donde se puede visualizar perfectamente la evolución del proceso de ligación en los carriles 3 al 5. En el carril 3 se observa la mezcla de ligación sin la ligasa T4, se puede percibir tres bandas bien definidas, mientras tanto en el carril cuatro se percibe como las bandas inferiores disminuyen, en tanto que la banda superior es más amplia. En el carril cinco las bandas inferiores son tenues, la banda superior es más gruesa y aparecen bandas pequeñas intermedias entre la banda superior y las inferiores. Los carriles uno y dos son controles de plásmidos pCAMex y pBRISERK1 respectivamente.

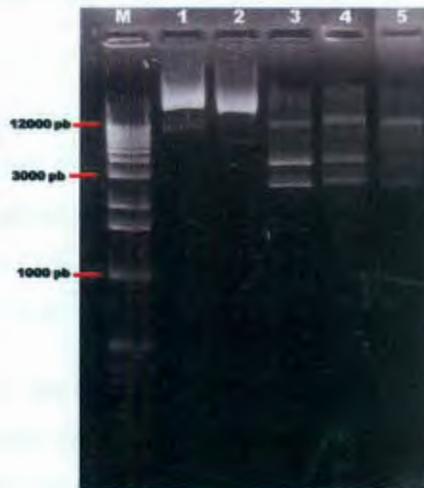


Figura 2.9 Ligación del fragmento BRISERK1 en el vector pCAMex. En el Carril 1: pCAMex; carril 2: pBRISERK1; carril 3: mezcla sin la ligasa T4; carril 4: mezcla de ligación a las 12 horas; carril 5: mezcla de ligación a las 24 horas.

Para la verificación de la inserción del gen BRISERK1 en el vector de expresión pCAMex, se procedió a la amplificación del gen BRISERK1 utilizando oligonucleótidos específicos para un fragmento de BRISERK1. El resultado de la amplificación por PCR demuestra

que, de todos los eventos de amplificación, solo cuatro, de las 50 colonias picadas resultaron positivos; éstas clonas fueron nombradas pC04, pC10, pC13 y pC15.

En la figura 2.10 se observa el fraccionamiento únicamente de los productos de las amplificaciones de las colonias positivas, de un control negativo (pCAMex sin inserto) y de un control positivo (pBRISERK1). Se visualiza una amplicón de 2,861 pb, correspondiente a un fragmento específico del gen quimérico BRISERK1.



Figura 2.10 Verificación por PCR de la inserción del fragmento BRISERK1 en el vector pCAMEX. Carril 1: control negativo; carril 2: control positivo (pBRISERK1); carriles 3-4: fragmento del inserto BRISERK1 en las clonas pC04, pC10, pC13 y pC15; carril M: escalera de ADN de 1 kb.

2.3.4 VERIFICACIÓN DE LA ORIENTACIÓN DEL cDNA DE BRISERK1 EN PCAMEX

Debido a que se subclonó mediante la digestión con una única enzima de restricción (*Kpn* I), el fragmento liberado del plásmido donador se puede orientar en dirección sentido y en antisentido. Por tal motivo se procedió a la verificación de la orientación del inserto clonado en el plásmido receptor pCAMex.

Los plásmidos pCAMex, pBRISERK1, pC04, pC10, pC13 y pC15 fueron sometidos al proceso de digestión con la enzima *Xho* I. Con base en los tamaños de las bandas obtenidas se puede saber la orientación del inserto en el vector pCAMex.

CAPÍTULO II

En la figura 2.11 se observa el patrón esperado para cada caso de inserción del gen quimérico en el vector pCAMex. Se visualiza en el carril uno, el vector pCAMex digerido con *Xho* I al fraccionarlo presenta, tres bandas de 11,234, 2,502 y 1,094 pb. En tanto, en los carriles dos y tres se fracciona el pC 04, que presenta 4 bandas de 11, 234, 2,502 y 3053 pb. En el carril 4 y 5 se fracciona pC 10 y pC 15 respectivamente y donde se observo cuatro bandas de 11,234, 2,502 y de 846. De esa forma se comprobó que en las clonas pC04 y pC13 el inserto se encuentra en antisentido, mientras que en pC10 y pC15 el inserto se encuentra en sentido.

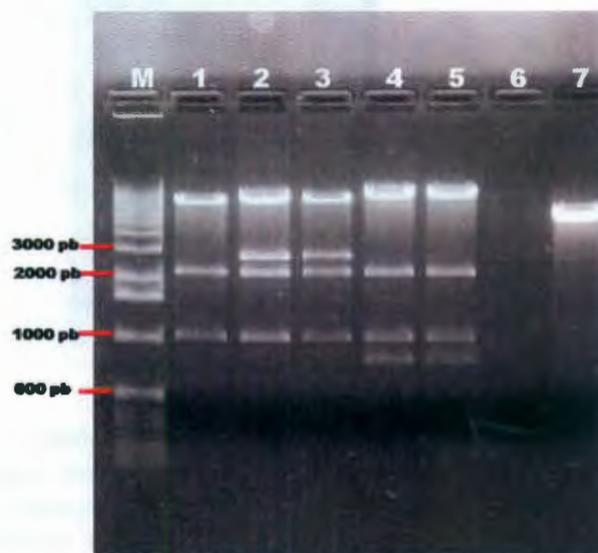


Figura 2.11 Análisis de la orientación de BRISERK1 en pCAMex. Alícuotas de los productos de digestión con la enzima *Xho* I fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa. Carril 1: pCAMex; carril 2: pC04; carril 3: pC13; carril 4: pC10; carril 5: pC15; carril 6: testigo negativo; carril 7: pBRISER como testigo positivo.

2.4 DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue el diseño de la quimera BRISERK1 permita activar exógenamente y de manera sincronizada la actividad enzimática del dominio de cinasa del receptor SERK1. Esto podría permitir el planteamiento de experimentos para conocer la función de este receptor durante la embriogénesis somática y en otras etapas del desarrollo de las plantas.

Una quimera es una proteína creada artificialmente uniendo dos o más fragmentos de proteínas diferentes; por tanto, para el diseño de una quimera funcional es importante considerar los dominios indispensables para su buen funcionamiento *in vivo*. A este respecto, es importante mencionar que muchos receptores tipo cinasas requieren fosforilarse en una treonina que se encuentra en la región yuxtamembranal (Karlova *et al.*, 2006). Un ejemplo de este caso es SERK1 de *Arabidopsis thaliana*, donde el primer residuo que se fosforila tras la activación del receptor se encuentra en la región yuxtamembranal (Karlova *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha reportado que la supresión de la región yuxtamembranal citosólica del receptor BRI1 ocasiona una pérdida de la señalización (Kim and Wang, 2010). En esta región es donde se encuentra una treonina fundamental para su actividad de este receptor.

He *et al.* (2000) construyeron cuatro receptores quiméricos entre el dominio extracelular de BRI1 y el dominio citosólico de Xa21. La expresión *in vivo* demostró que la única construcción capaz de desencadenar la señalización en su modelo, fue el que contenía la región yuxtamembranal del receptor BRI1. Estos resultados pueden ser específicos en el modelo que emplearon, por lo que es posible que en nuestro caso se deba revisar la funcionalidad de otras combinaciones también.

Nosotros tomamos en cuenta la localización de los posibles sitios de poliadenilación, para conseguir que el transcrito se poliadenile y se traduzca en las células eucariotas, así como lo reportan Li and Hunt (1997).

Para determinar las regiones regulatorias para la transcripción eficiente de la quimera BRISERK1, se introdujo la secuencia de nucleótidos en el software PlantCARE

CAPÍTULO II

(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>), con la finalidad de localizar secuencias consenso para factores de transcripción, como las cajas TATA.

BIBLIOGRAFÍA

- Berthouly, M., (1997). Biotecnología así y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. en: Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura. Heredia, Costa Rica. pp 2549.
- Cohen, S. N., Chang, A. C. Y. & Hsu, L., (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:2110
- Conley, E. C. & Saunders, J. R., (1984). Recombination-dependent recircularization of linearized pBR322 plasmid DNA following transformation of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 194:211.
- Etienne H., Barry- Etienne D., Vasquez N., Berthouly M., (1999). Aportes de la biotecnología al mejoramiento genotipo del café. EN: Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Bertrand B, Rapidel B, eds. IICA.. San José, Costa Rica. pp 457-495.
- García, E. y Rafael, M., (1989). Propagación clonal de plantas de cafe (*Coffea arabica* L. 'catimor') a partir de microesquejes cultivados *in vitro*. (en línea) Agronomía Tropical 39(4-6): 249-268. Disponible en: http://www.redpav-fpolar.info.ve/agrotrop/v39_4-6/v396a004.html
- He H., Wang ZY, Li J, Zhu Q, Lamb C. and Ronald P., (2000). Perception of brassinosteroids by the extracellular domain of the receptor kinase BRI1. Science 288:2360-2363
- Kim T.W., Wang Z.Y., (2010). Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. Annual Review of Plant Biology 61:681-704.
- Nishiya T. and De Franco A.L., (2004). Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the Toll-like receptors. Journal of Biological Chemistry 279:19008–19017.

CAPÍTULO II

- Qingshun Li and Arthur G. Hunt, (1997). The polyadenylation of RNA in plants. *Plant Physiol* 115: 321-325
- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos and V.M. Loyola Vargas, (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86: 285-301.
- Rumyana Karlova, Sjef Boeren, Eugenia Russinova, Jose Aker, Jacques Vervoort, and S.C. de Vries, (2006). The *arabidopsis* somatic embryogenesis receptor-like kinase1 protein complex includes brassinosteroid-insensitive1. *The Plant Cell*, Vol. 18, 626–638
- Singer M. and Berg., (1991). Genes and ADN: a changing perspective. In: genes and genome. University Science books. Mill Valley, CA. Pp. 23, 883.
- Tae-Wuk Kim and Zhi-Yong Wang., (2010). Transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010.61:681-704
- Ullrich A, Schlessinger J., (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* 1990: 61: 203-12
- Villanueva Alonzo, H.J., (2006). Aspectos bioquímicos y moleculares en el inicio de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. Tesis de maestria. Centro de investigaciones científica de Yucatán (CICY). p.j 64-65.

CAPÍTULO III

IDENTIFICACIÓN Y ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DEL RECEPTOR QUIMÉRICO EN TEJIDOS DE *COFFEA CANEPHORA*

3.1 INTRODUCCIÓN

La transformación genética de las plantas puede ser definida como la transferencia de genes aislados de bacterias, animales y virus dentro de un nuevo material genético. El proceso de transformación involucra distintas etapas como la inserción, la integración, expresión y en algunos casos la heredabilidad del nuevo ADN (Lewin, 2001).

La mayoría de las plantas transgénicas han sido obtenidas usando dos métodos generales: la transferencia mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y la transferencia directa de ADN, esta última involucra métodos como bombardeo por partículas y la electroporación (Fisk y Dandekar, 1993).

Los resultados de diversas líneas de estudio han demostrado que el café puede ser transformado usando varias técnicas de transferencia de genes, entre las que se incluye la electroporación de protoplastos de callos embriogénicos de *C. arabica* (Fernández-Da Silva y Menéndez, 2003), el co-cultivo de embriones somáticos de *C. canephora* con *Agrobacterium rhizogenes* (Spiral *et al.*, 1993; Perthuis *et al.*, 2005) y el bombardeo de explantes de hojas de *C. canephora* y *Arabusta* (Nagai *et al.*, 1992, Van Bostel *et al.*, 1995, Ribas *et al.*, 2005). Canche-Moo *et al.* (2006) aportaron un avance en los procesos de transformación del café, mediante la técnica de agroinfiltración al vacío de explantes de hoja sometidos al proceso de embriogénesis somática (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002). Dicho método ha proporcionado las bases para el mejoramiento de las metodologías para la generación de plantas transgénicas de *C. canephora*. Hatanaka *et al.* (1999) reportaron la identificación de callos y las plantas transformadas de *Coffea canephora* mediante la reacción histoquímica de la β -glucuronidasa (*GUS*), así como por la detección por PCR de los ADNc de la β -glucuronidasa y la higromicina fosfotransferasa (HPT).

En esta parte del trabajo se pretendió establecer un protocolo de transformación para la expresión constitutiva del receptor quimérico BRISERK1 en explantes de hojas de *Coffea*

canephora sometidos al proceso de embriogénesis somática, mediante una modificación introducida por Pérez Pascual (datos sin publicar) al protocolo reportado por Canché-Moo *et al.* (2006).

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Para la inducción de la embriogénesis somática se empleó el protocolo previamente establecido por Quiroz-Figueroa *et al.* (2006). En resumen, las plántulas cultivadas *in vitro* fueron pre-inducidas por 15 días en medio de cultivo suplementado con ácido naftalenacético 0.54 μM y cinética 2.33 μM , pH 5.8. Posteriormente, a partir del material foliar se cortaron explantes homogéneos con un sacabocados de 100 mm de diámetro. Los explantes fueron colocados en un matraz de 250 mL con 50 mL medio Yasuda modificado (Yasuda *et al.*, 1985), en presencia de benciladenina 1.5 mM.

3.2.2 AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

La cepa de *A. tumefaciens* utilizada en este trabajo fue LBA4404 (tipo octopina), que posee el plásmido Ti desarmado pAL4404, con resistencia a estreptomicina. LBA4404 tiene resistencia cromosomal a rifampicina (Ooms *et al.*, 1982). *A. tumefaciens* fue transformada con el método de congelamiento-descongelamiento (Zhang *et al.*, 1999; Ballina *et al.*, 2002), con los plásmidos pCAMBIA2301, pCAMex, pC04 y pC10.

3.2.2.1 PREPARACIÓN DEL CULTIVO DE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

Se plaqueó una azada de *A. tumefaciens* LBA4404 a partir de un resguardo celular en glicerol conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, en una placa con medio YEB (5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ extracto de carne, 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ extracto de levadura, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ peptona, 2mM sulfato de magnesio, pH 7.2) el cual contiene los antibióticos apropiados (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ estreptomicina, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ rifampicina, 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamicina) y se incubó por 48 horas a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se picó una colonia y se inoculó en 5 mL de medio YEB (5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ extracto de carne, 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ extracto de levadura, 5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ peptona, 2mM sulfato de magnesio, pH 7.2) el cual contiene los antibióticos apropiados

(100 mg·L⁻¹ estreptomina, 50 mg·L⁻¹ rifampicina, 50 mg·L⁻¹ kanamicina) y se incubó en oscuridad a 28 °C con agitación de 200 rpm durante 48 h. Posteriormente se tomó una alícuota de 250 µL del cultivo bacteriano crecido y se subcultivó en un matraz Erlenmeyer de 50 mL conteniendo 25 mL de medio YEB, suplementado con los antibióticos requeridos, y acetosiringona a una concentración final de 100 µM. El cultivo bacteriano se incubó a 28 °C en oscuridad con una agitación de 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptima de OD₆₀₀=0.3-0.5. Posteriormente, se centrifugó a 2,500 x g durante 10 min. La pastilla se resuspendió en 25 mL de medio YEB suplementado con acetosiringona a una concentración final de 200 µM y 0.05% de Silwet L-77 (Clough y Bent, 1998).

3.2.3 TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTES DE *C. canephora*

Se empleó el método descrito por Canché-Moo *et al.*, (2006) modificado por Daniel Perez (datos no publicados). A partir de hojas jóvenes de plántulas *in vitro* pre-acondicionadas durante 15 días. Se cortaron explantes de 100 mm de diámetro evitando los bordes de las hojas con ayuda de un sacabocados.

Los explantes se cocultivaron en medio YEB con *A. tumefaciens* y se sometieron a infiltración a un vacío de 400 mm de Hg durante 10 minutos. Posteriormente, los explantes se enjuagaron con agua estéril y se secaron brevemente en papel absorbente estéril para eliminar el exceso de líquido. Los explantes fueron cultivados en medio MS sin antibióticos (Murashige y Skoog, 1962), con agitación de 100 rpm en oscuridad a 28 °C durante 48 h.

Posteriormente, *A. tumefaciens* se eliminó de los explantes mediante lavados con cefotaxima 400 mg·L⁻¹ en agitación durante 2 h, los lavados se realizaron cada 12 horas (3 lavados). En el último lavado, se infiltró la solución de agua conteniendo una concentración de 400 mg·L⁻¹ de cefotaxima. Posteriormente, los explantes transformados fueron nuevamente cortados con la ayuda de un sacabocado estéril más pequeño (90 mm de diámetro) y colocados en un matraz Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de cultivo de Yasuda modificado (Yasuda *et al.*, 1985), para la inducción de la embriogénesis somática de *Coffea canephora*.

3.2.4 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA β -GLUCURONIDASA (GUS)

Los ensayos de actividad histoquímica de la β -glucuronidasa (GUS) *in situ* fueron realizados siguiendo la metodología descrita por Stomp (1992). Quince explantes de *Coffea canephora* fueron sometidos al proceso de transformación. Tres explantes seleccionados al azar fueron sumergidos en una solución de 100 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM de Na_2EDTA , 0.5 mM $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 0.5 mM de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, Triton X-100 al 0.1% 1mg/mL de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -ácido glucurónico (x-gluc). Luego de 1min de infiltración por vacío y 2 minutos por presión positiva, mediante una jeringa de 5 mL, se incubaron durante 24 horas a 37 °C protegiéndolo de la luz. Para una mejor visualización de los tejidos, se eliminó la clorofila mediante incubaciones con metanol::acetona 3:1 v/v respectivamente.

Las muestras decoloradas fueron fotografiadas usando una cámara Leica DFC 320 montada sobre un estereoscopio Leica.

3.2.5 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN ARN TOTAL

Las extracciones de ARN fueron realizadas usando el método de Chomczynski y Sacchi (1987) con soluciones preparadas en el laboratorio. Para dichas extracciones, entre 50-100 μg de tejido vegetal se pulverizaron con N_2 líquido en un mortero libre de nucleasas, hasta conseguir un polvo fino, inmediatamente se agregó 1 mL del reactivo Trizol casero. Se continuo macerando hasta conseguir una mezcla homogénea, la cual fue colectada y dosificada en tubos ependorf 1.5 mL. Tras mezclar por vórtex, se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, posteriormente se centrifugo a 14,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. Se recuperó el sobre nadante y se transfirió a un tubo limpio en donde se le adicionó 0.3 volúmenes de cloroformo:isoamílico 49:1 respectivamente, se agitó vórtex e incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4 °C. se recuperó la fase acuosa y fue precipitada con 0.5 volumen de isopropanol y 0.5 volúmenes de 0.8 M de Citrato de sodio y 3 M de NaCl por 30 min a -20 °C. Se centrifugó para obtener la pastilla de ARN y tras un lavado con etanol 70% v/v y secado del precipitado, se disolvió en 30 μL de agua bidestilada estéril tratada con DEPC.

3.2.6 EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ADN

Cinco explantes en forma de disco de plántulas de *C. canephora* transformadas, fueron macerados con nitrógeno líquido hasta conseguir un polvo fino, se le adicionó 1 mL de amortiguador de extracción SDS (1 M tris HCl pH 7.4, 5 M NaCl, 0.5 M EDTA pH 8, 10 % SDS), 500 μ L de fenol y 500 μ L cloroformo, se maceró la mezcla hasta conseguir una suspensión. La suspensión se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos, se recuperó la parte superior o acuosa, y se pasó en un tubo limpio. Se le adicionó 0.8 v/v de isopropanol frío, se incubó en hielo por 30 minutos y se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla fue lavada con 500 μ L de etanol al 70 % y se centrifugó a 14000 por 15 minutos. Posteriormente se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 10 μ L de tris-RNAsas 10 μ g/mL y 20 μ L de agua libres de nucleasas. Se incubó por 10 minutos con la RNAsas y se le adicionó 20 μ L de NaCl 5 M, 2.5 volúmenes de etanol absoluto y posteriormente se incubó toda la noche a -20 °C. Se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos y se procedió a eliminar el sobrenadante. La pastilla se secó por 10 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas.

3.2.7 ANÁLISIS DE LA INTEGRACIÓN Y EXPRESIÓN DEL GEN BRISERK1

El proceso de transformación temporal de los explantes fue monitoreado mediante el ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa.

La integración estable de los ADNc de la β -glucuronidasa y BRISERK1 en el genoma de *C. canephora*, así como la ausencia de contaminación bacteriana fue evaluada mediante ensayos de PCR, utilizando oligonucleótidos diseñados específicamente para la amplificación de la β -glucuronidasa, BRISERK1 y VIR E2.

Para llevar a cabo la identificación y el análisis del gen quimérico BRISERK1, se diseñó el cebador BRI-FWD (5'-GTCTTTTGACTCTCTCTCTCTCC-3'), que alinea en el dominio extracelular del receptor quimérico (extremo 5' de BRI1 de *A. thaliana*) y el cebador SERK-RWD (5'-TGCAGCTCTCCACCTGGTGTTCCG-3') que alinea en el dominio

citoplasmático de la quimera (extremo 3' de SERK1 de *C. canephora*). De esta forma solo podrá amplificarse la secuencia de la quimera y no de los receptores nativos (Figura 3.1).



Figura 3.1 Diagrama de alineamiento de los cebadores con el ADNc de la quimera.

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 3 minutos de desnaturalización a 94 °C, 30 segundos de alineamiento a 45 °C (GUS), 55 °C (VIR E2), 60 °C (BRISERK1), 4 minutos de polimerización a 72 °C y un tiempo adicional de polimerización de 10 minutos a 72 °C. Finalmente, 4 °C en un tiempo α . Todo el procedimiento se repitió por 30 ciclos.

3.2.8 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA B-GLUCURONIDASA Y BRISERK1

El análisis de la expresión de los ADNc de la β -glucuronidasa y BRISERK1 se realizó por medio de RT-PCR con el paquete comercial SuperScript-RT-One Step (Invitrogen®), utilizando el ARN total de los embriones somáticos provenientes de explantes sometidos al proceso de transformación.

Las condiciones de amplificación estándar fueron: un ciclo de síntesis de ADNc a 55 °C por 30 minutos; un ciclo de desnaturalización a 94 °C por 3 minutos; seguido por 40 ciclo de amplificación 94°C por 15 segundos, 45-60 °C por 30 segundos, 68 por 3 minutos; un ciclo de 72 °C por 10 minutos y 4 °C por α .

3.3 RESULTADOS

3.3.1 TRASFORMACIÓN DE PLÁNTULAS CON EL ADNC QUIMÉRICO BRISERK1 MEDIANTE INFILTRACIÓN CON *Agrobacterium tumefaciens*

Los tratamientos planteados para los ensayos de transformación consistieron en someter al tejido vegetal al proceso de transformación en medio YEB con los antibióticos rifampicina, estreptomina y kanamicina y los siguientes plásmidos:

- **Testigo (-).** Protocolo de transformación en ausencia de la bacteria.
- ***A. tumefaciens*.** Protocolo de transformación en presencia de *A. tumefaciens* LBA4404 sin transformar.
- **pCAMBIA2301.** Protocolo de transformación en presencia de la cepa LBA4404 transformada con el vector de expresión pCAMBIA2301 vacío. Este vector se utilizó como testigo de transformación para descartar falsos positivos debido a la bacteria, pues el gen GUS posee un intrón.
- **pCAMex.** Protocolo de transformación en presencia de la cepa LBA4404 transformada con el vector de expresión pCAMex vacío.
- **pC04.** Protocolo de transformación en presencia de la cepa LBA4404 transformada con el vector de expresión pCAMex conteniendo el ADNc del receptor quimérico BRISERK1 en antisentido.
- **pC10.** Protocolo de transformación en presencia de la cepa LBA4404 transformada con el vector de expresión pCAMex conteniendo el cDNA del receptor quimérico BRISERK1 en sentido.

3.3.2 EXPRESIÓN TRANSITORIA DEL GEN *UID A (B-GLUCURONIDASA)*

Como puede observarse en la figura 3.2, la actividad histoquímica de GUS fue detectada a los 4 y a los 15 días en los explantes transformados con los vectores pCAMBIA2301, pCAMex, pC04 y pC10, pero no se observa en los testigos negativos. Para los 60 días, se puede visualizar que no todos los embriones de 60 días dieron positiva la prueba de GUS; esto puede deberse a que no todo el explante fue transformado de manera homogénea, como puede observarse en los explantes evaluados a los 15 días.

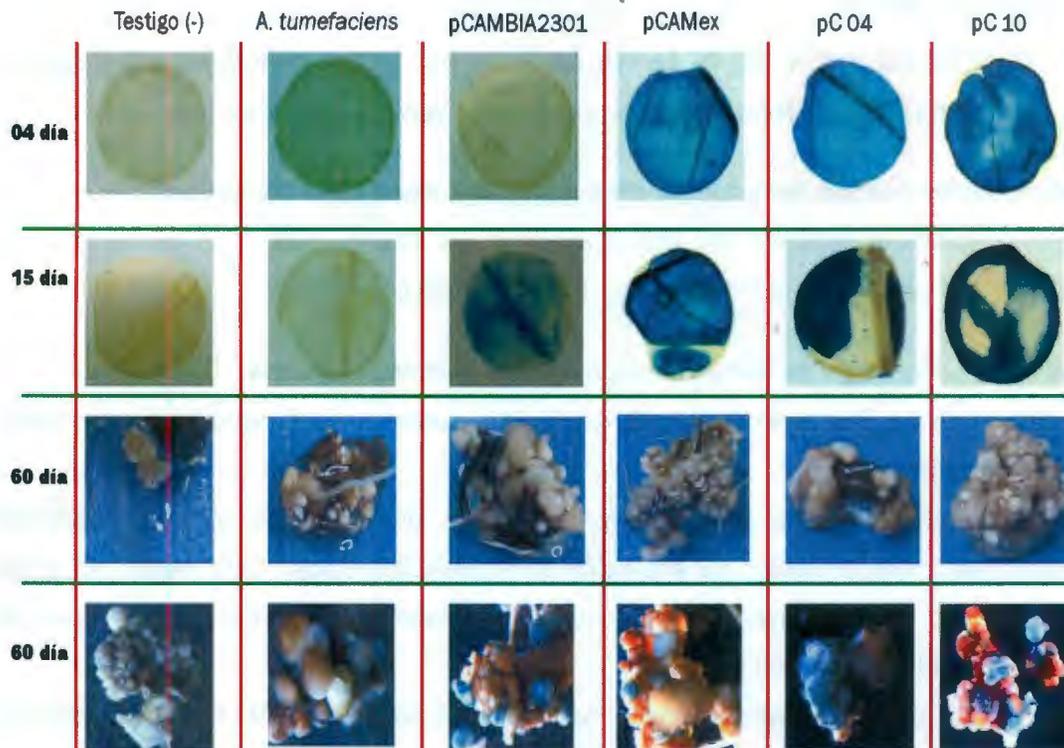


Figura 3.2 Prueba histoquímica de la β -glucuronidasa (GUS). Los tratamientos individuales se describen en Materiales y Métodos. Muestras de tres explantes sometidos al proceso de transformación fueron seleccionadas al azar y sometidas a la tinción histoquímica de GUS. La evaluación se realizó a los 4, 15 y 60 días después del cocultivo con *A. tumefaciens*. En la cuarta fila se muestra explantes con embriones antes de la prueba y en la cuarta después de la tinción de GUS.

3.3.3 EXTRACCION DE ADN TOTAL DE EMBRIONES TRANSFORMADOS

El ADN total fue aislado a partir de 0.1 g de tejido embrionario obtenido a partir de explantes sometidos al proceso de transformación con las diferentes construcciones. El ADN fue resuspendido en H₂O libre de nucleasas y almacenado a -20 °C hasta su uso. Como puede observarse en la figura 3.3, la calidad del ADN fue óptima pues se observa una sola banda en la electroforesis en gel de agarosa, lo cual indica ausencia de degradación.



Figura 3.3 Electroforesis del ADN genómico. Muestras de ADN extraído de explantes transformados con diferentes construcciones fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Escalera de ADN de 1 kb; 1: testigo (-); 2: *A. tumefaciens*; 3: pCAMBIA2301; 4: pCAMex; 5: pC04; 6: pC10.

3.3.4 AMPLIFICACIÓN POR PCR DEL ADN_c DE LA B-GLUCURONIDASA Y BRISERK1 A PARTIR DE ADN GENÓMICO

Mediante la amplificación por PCR empleando cebadores específicos y ADN genómico extraído de explantes de los diferentes tratamientos, se demostró que en los explantes transformados con pCAMBIA2301, pCAMex, pC04 y pC10 se amplificó un amplicón de 586 pb correspondiente al ADN_c de la β -glucuronidasa (Figura 3.4B). En tanto que los explantes transformados con pC04 y pC10 fueron los únicos que presentaron un fragmento de 3,899 pb correspondiente al ADN_c de la quimera BRISERK1. Se pudo observar que en ninguno de los explantes se amplificó el fragmento de 800 pb del gen VirE2, lo que demuestra que la expresión de la β -glucuronidasa y de BRISERK1 corresponde al tejido vegetal y no a un falso positivo de la bacteria.

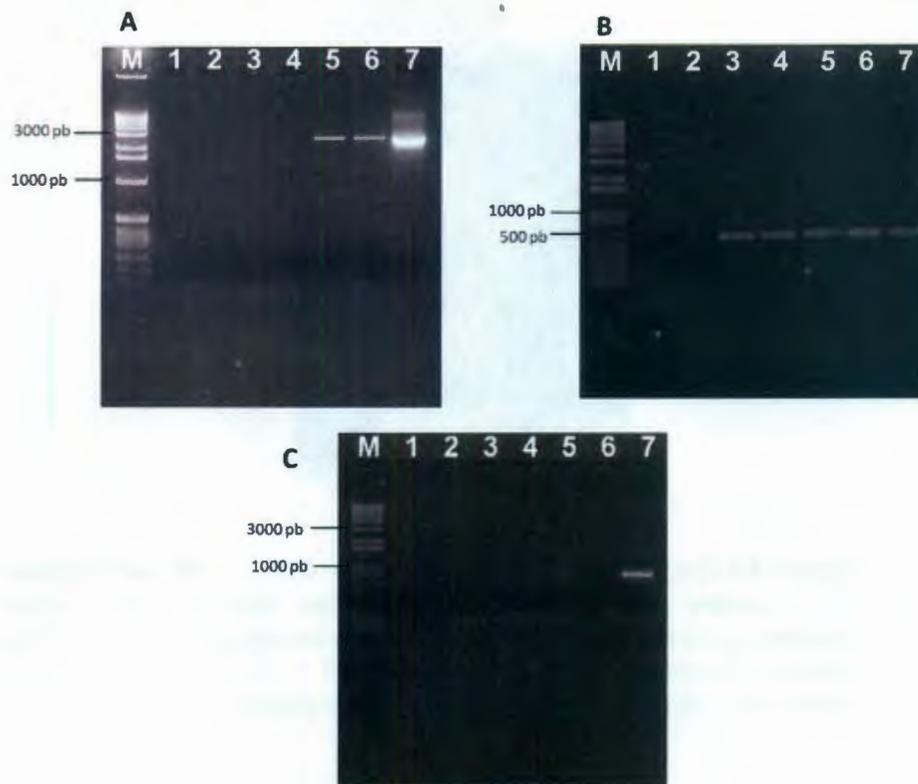


Figura 3.4 Amplificación de GUS, VirE2 y BRISERK1. Alícuotas de la amplificación por PCR, empleando cebadores específicos a partir de ADN genómico de explantes transformados de *Coffea canephora* fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: escalera de ADN de 1 kb; A: BRISERK1; B: GUS; C: VirE2; 1: testigo (-); 2: *A. tumefaciens*; 3: pCAMBIA; 4: pCAMex; 5: pC04; 6: pC10; 7: testigo (+).

Estos resultados demuestran la integración del ADNc de los transgenes quiméricos en el genoma de *Coffea canephora*. Con esto, se han generado tejidos transgénicos de café modificados con el ADNc del receptor quimérico BRISERK1 en orientación positiva y en antisentido. A continuación se intentó determinar si los transgenes se expresaban en los tejidos transformados.

3.3.5 EXTRACCION DE ARN TOTAL DE EMBRIONES TRANSFORMADOS

Para determinar los niveles de transcrito de la quimera BRISERK1, como primer paso se procedió a la extracción de ARN total, partiendo de 0.1 g de embriones provenientes de tejidos transformados. La calidad del ARN total se evaluó por electroforesis en gel de agarosa. En la figura 3.5 se puede observar las dos bandas características de los ARN ribosomales 26S y 18S, lo cual significa que las muestras de ARN total tienen la integridad requerida para proseguir con los análisis de expresión.



Figura 3.5 Integridad del ARN extraído de explantes transformados de *Coffea canephora*. Alícuotas de ARN total extraído de explantes transformados con diferentes construcciones fueron fraccionadas por electroforesis en gel de agarosa teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Marcador de ADN de 1 kb; 1: testigo (-); 2: *A. tumefaciens*; 3: pCAMBIA; 4: pCAMex; 5: pC04; 6: pC10.

3.3.6 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESION DE LA B-GLUCURONIDASA Y BRISERK1

Una vez extraído el ARN total se efectuaron ensayos de RT-PCR con el fin de determinar la presencia del transcrito de la quimera en los tejidos transformados. Como se observa en la figura 3.4B, en este evento de transformación no se pudo detectar la presencia de transcritos de la quimera en las muestras pC04 y pC10, pero si se observa una banda correspondiente al testigo positivo, que es pBRISERK1 (quimera en el plásmido pUC57).

Este resultado sugiere que el gen quimérico no se está expresando en los tejidos transformados, posiblemente a causa de alguna regulación de las redes transcripcionales, o un posible silenciamiento del promotor 35S. Ya que el vector de expresión pCAMex cuenta con tres promotores 35S. Para evaluar las diferentes causas para esta respuesta, se analizó la expresión de los tratamientos testigo. En el panel A de la figura 3.6 se puede observar los niveles de expresión del gen ribosomal 18S, demostrando que para la amplificación por RT-PCR se cargaron concentraciones equivalentes de ARN molde. En el panel C se muestra la amplificación del transcrito del gen *uid A* (GUS), con lo que se puede asegurar que los ADNc del ADN-T se transfirieron eficientemente al genoma de la planta. En el panel D, correspondiente al gen bacteriano VirE2, se muestra que únicamente en el testigo positivo se amplificó una banda de ~1,000 pb, mientras que en los carriles 2 al 6, correspondientes a las muestras de interés, esta banda no está presente. Esto es indicativo de que en los explantes de 60 días ya no existe presencia de *A. tumefaciens*.

Debido a que los testigos de este experimento funcionaron bien, la ausencia de transcritos de la quimera puede deberse a varias razones, como se discutirá a continuación. Unas de las causas del porque no se está transcribiendo la quimera BRISER, se puede deber a las regulaciones trasccripcionales en las células de *Coffea canephora*, o también puede deberse a la localización de la integración ADNc de de BRISERK1. Ya que el silenciamiento del promotor 35S queda descartado al observa que hay presencia de transcritos del gen *uid A* (GUS), el cual está bajo el control de otro promotor 35S.

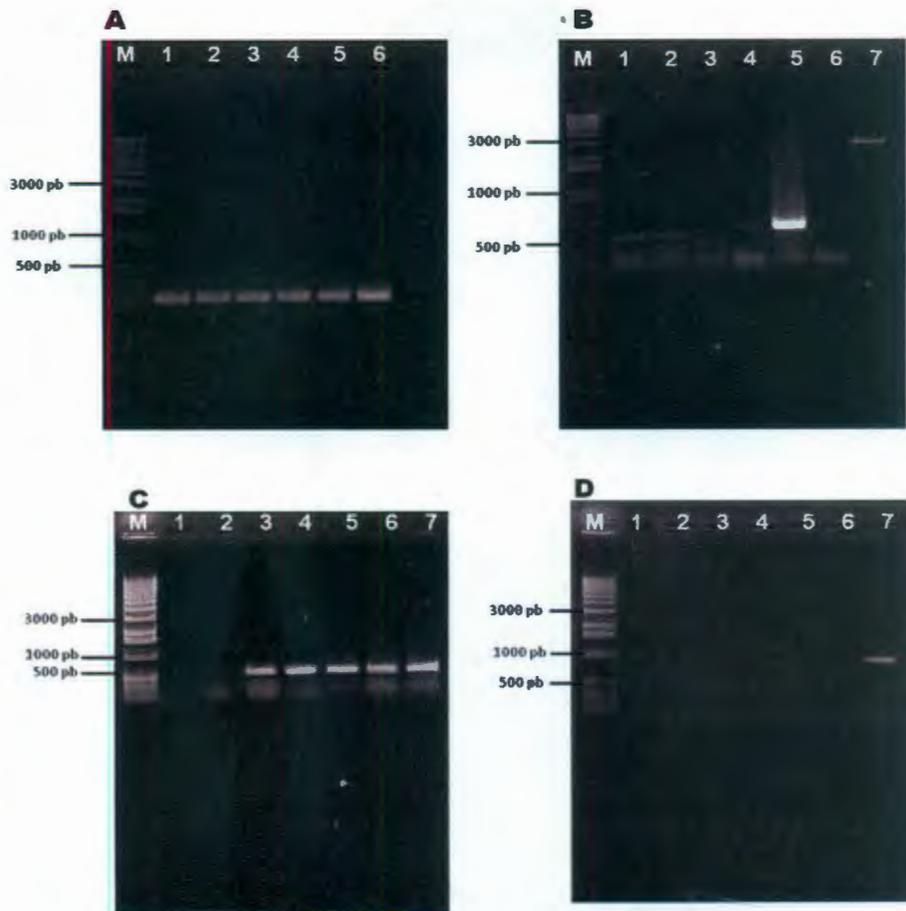


Figura 3.6 Detección de transcritos de GUS, VirE2 y BRISER1K. Alícuotas de 3 μL de los productos de RT-PCR con cebadores específicos para cada gen fueron fraccionados por electroforesis en gel de agarosa teñido con $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de bromuro de etidio. M: Escalera de ADN de 1 kb; A: gen ribosomal 18S; B: quimera BRISERK1; C: gen reportero GUS; D: gen bacteriano VirE2. Las muestras de ARN provinieron de explantes de 60 días transformados con: 1: testigo (-); 2: *A. tumefaciens*; 3: pCAMBIA2301; 4: pCAMex; 5: pC04; 6: pC10; 7: testigo (+).

3.4 DISCUSIÓN

A. tumefaciens es una bacteria gram negativa del suelo, que tiene la capacidad de integrar su ADN a las células vegetales, alterando permanentemente el genoma de la planta. Esta característica única la ha convertido en una poderosa herramienta para la transformación genética de plantas, con aplicaciones en la investigación básica y para el desarrollo agrícola (Kan Wang. 2006). Numerosos artículos reportan el uso de diferentes concentraciones de cefotaxima (Cheng *et al.*, 1998) sola o en combinación (Hammershlang *et al.*, 1995) como antibiótico para eliminar la incidencia bacteriana en diferentes especies de plantas transformadas con *A. tumefaciens* (Torn *et al.*, 1992; Buckley & Reed 1994).

Existen diversos reportes de varios grupos de investigación sobre transformación de *C. canephora* mediante *A. tumefaciens*, en donde la mayoría están enfocados a la transformación de callos embriogénicos para la obtención de plántulas genéticamente modificadas; no obstante, hay pocos reportes donde la transformación se realiza justo antes de inducir la embriogénesis, por lo que tampoco se ha evaluado cómo el proceso de transformación por cocultivo con *A. tumefaciens* afecta el desarrollo del proceso embrionario, dando lugar a un bajo índice de embriones producidos.

Un ejemplo relativamente eficiente de transformación de *C. canephora* fue reportado por Canche-Moo *et al.*, (2006), quienes reportaron la transformación de explantes circulares de 1 cm a partir de hojas de plántulas de *C. canephora* pre-inducidas hormonalmente por 15 días. En nuestras manos, ese protocolo abatió la eficiencia en la producción de embriones somáticos en un 40%, con relación al proceso embrionario normal reportado por Quiroz-Figueroa *et al.* (2006). Modificaciones a este protocolo permitieron eliminar el abatimiento del proceso embrionario ocasionado por el proceso de transformación por cocultivo (Pérez-Pascal, comunicación personal), lo cual fue aprovechado en el presente trabajo para generar embriones transgénicos con mayor eficiencia.

Los resultados de este capítulo demuestran que sí se generaron embriones transgénicos transformados con los diferentes genes reporteros y quiméricos lo cual pudo ser observado por la tinción histoquímica de GUS y mediante la amplificación del ADN transgénico por PCR. El hecho de que estos experimentos se hayan realizado hasta los

CAPÍTULO III

60 días, así como la ausencia de genes bacterianos en estos períodos, son indicativos sólidos de que el protocolo de transformación realizado para *Coffea canephora* funcionó eficientemente, ya que como se observa en la figura 3.4, se generaron los amplicones correspondientes a los ADNc de la β -glucuronidasa y BRISERK1, pero no la presencia de los fragmentos del gen VirE2 en el genoma de la planta.

Lamentablemente, en este evento de transformación no se pudo observar los transcritos de la quimera BRISERK1, aunque sí se detectaron transcritos de la β -glucuronidasa. Como ya se ha mencionado, posiblemente la regulación transcripcional en las células de *Coffea canephora* o la posición de la integración en el cromosoma del ADNc de BRISERK1, está provocando la represión del transcrito de la quimera BRISERK1. Estudios previos han indicado que la actividad del promotor 35S depende del sitio de inserción cromosómica (Nagy *et al.*, 1985; Sanders *et al.*, 1987; Odell *et al.*, 1987).

Es probable que el promotor que regula la expresión del transgen no esté funcionando y esto puede ser debido a varias razones:

1. Que no todo el ADN de la región Ti haya sido transferido. Esto se descarta porque si puede detectarse la integración del transgen en el genoma mediante ensayos de PCR.
2. Que el transgen esté siendo silenciado debido a que el vector tiene tres promotores 35S.
3. Que el promotor no funcione en la construcción original y que este problema no haya podido ser detectado en anteriores procesos de transformación en donde se utilizó este vector de clonación (Arcos-Ortega *et al.*, 2010).

La inserción de los ADNc de β -glucuronidasa y BRISERK1 en el genoma de *C. canephora*, no afectó el establecimiento de la embriogénesis.

En este proceso de transformación, no todas las células del tejido vegetal blanco fueron transformadas; por tal motivo, es necesario eficientizar el protocolo para reducir la aparición de escapes (embriones no transformados), para conceder una ventaja a las células que han sido modificadas genéticamente para que esta lleguen a diferenciarse y dar una plántula completa.

BIBLIOGRAFIA

- Ballina-Gómez H, Zaldívar-Cruz JM, Avilés-Berzunza E y Godoy-Hernández G., (2000). Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* tipo octopina son más adecuadas para la transformación de achiote (*Bixa orellana* L.) 1er. Congreso Regional de biotecnología y bioingeniería. Mérida, Yucatán, Mexico.
- Bukley P.M.; and B.M. Reed (1994) Antibiotic susceptibility of plant-associated bacteria. HortScience 29:434
- Canché-Moo R., A. Kú-González, C. Burgeff, V. Loyola-Vargas, L. Rodríguez-Zapata and E. Castaño. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84(3):373-377
- Cheng Z. Schnurr and J. Kapaun (1998). Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. Plant cell Reports 17: 646-649
- Chomczynski p. and Sacchi N., (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. Analytical Biochemistry, 162: 156-159.
- Fernández-Da Silva R. and A. Menéndez., (2003). Transient gene expression in secondary somatic embryos from *Coffea* tissues electroporated with the genes gus and bar. Elect J. Biotechnology 6:29-38
- Fisk, H. J. and Dandekar, A.M., (1993). The introduction and expression of transgenes in plants. Scientia Horticulturae 55:5-36.
- Hammerschlag F. R. Zimmerman, U. Yadava, S. Hunsucker, P. Gercheva (1995) An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants *in vitro* and for the effect of regeneration. HortScience 30:876

CAPÍTULO III

- Hoekema, P.W. Roelvink, P. J.J. Hooykass and R.A. Schilperoot (1984), Delivery of T-DNA from the *Agrobacterium tumefaciens* chromosome into plant cells. The EMBO Journal vol 3 No. II pp. 2485-2490
- Kan Wang. (2006) *Agrobacterium* protocols vol. I (Methods in molecular biology; 343) pj. Vii.
- Lewin B., (2001). Rearrangement of DNA. In: Genes. Oxford University Press, Inc. New York. 7th Edition. Pp. 524-530
- Murashinge T. and Skoog F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:437-497
- Nagai C., Z. Mai and J. Jong, (1992). Development of transformation system for *Coffea Arabica* using particle gun method. *HortScience* 27 (Abstract): 661.
- Nagy, F., Boutry, M., Hsu, M. Y., and Chua, N., (1985). In biotechnology in plant science: Relevance to Agriculture in the Eighties, M. Zaitlin, P. Day, and A. Hollaender, eds (New York: Academic Press), pp. 227-236
- Odell, J. T., Nagy, F., and Chua, N. H (1987). Variability in 35S promoter expression between independent transformants. In *Plant Gene Systems and Their Biology*, L. McIntosh and J. Key, eds (New York: Alan R. Liss, Inc.), 62, pp. 329-331
- Ooms G., Bakker A., Molendijk L., Wullems G.J., Gordon M.P., Nester E.W., Schilperoot R. A. (1982). T-DNA organization in homogeneous and heterogeneous octopine-type crown gall tissues of *Nicotiana tabacum*. *Cell.* 1982 Sep;30(2):589-97.
- Perthuis B., J. Pradon, C. Montagon, M. Dufour and T. Leroy, (2005). Stable resistance against the leaf miner *Leucoptera coffeella* expressed by genetically transformed *coffea canephora* in a pluriannual field experiment in french Guiana. *Euphytica* 144:321-329.
- Quiroz-Figueroa F., C. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V. Loyola-Vargas. (2002). Histological studies on developmental stages and differentiation on two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 20:1141-1149

- Quiroz-Figueroa, F.R., R. Rojas-Herrera, R.M. Galaz-Avalos and V.M. LoyolaVargas (2006) Embryo production through somatic embriogénesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 86: 285-301.
- Ribas A., A. Kobayashi, L. Pereira and L. Vieira, (2005). Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. *Biol Plant.* 49:493-497
- Sanders, P. R., Winter, J.A., Zarnason, A.R., Rogers, S.G., and Fraley R.T., (1987). Comparison of cauliflower mosaic Virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plant. *Nucleic Acids Res.* 15, 1543-1558.
- Spiral J., C. Thierry, M. Paillard and V. Petiard, (1993). Regeneration of plantlets of *Coffea canephora* Pirre (robusta) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. *C. R. Acad Sci (Paris) Sér III* 316: 1-6.
- Steven J. clough Andrew F. Bent (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* (1998) 16(6), 735-743
- Stomp A. M., (1992) Histochemical localization of β -glucuronidase activity. In: Gallagher SR, ed. *GUS Protocols: Using GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. San Diego, CA, Academic Press Inc.
- Hatanaka T., Y.E. Choi, T. Kusano, H. Sano, (1999) Transgenic plants of *coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plan Cell Reports* 19:106-110
- Tor M. H. Mantell, C. Ainsworth (1992) Endophytic bacteria expressing β -glucuronidase cause false positive in transformation of *Dioscorea* species. *Plant Cell Rep* 11:452-456.
- Van Boxtel J., M. Berthouly, C. Carasco, M. Dufour and A. Eskes, (1995). Transient expression of β -glucuronidase following biobalistic delivery of foreign DNA into *coffea* tissues. *Plant Cell Rep.* 14:748-752

CAPÍTULO III

Yasuda T., Y. Fujii and T. Yamaguchi, (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*. 26(3):593-597

Zhang H and Zeevaart J (1999) An efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration system for cotyledons of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plan Cell Rep*. 18:640-645

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN GENERAL

La embriogénesis somática es un proceso natural que se presenta en diferentes variedades de plantas, especialmente en el género *Kalanchoe* (Pretová and Obert, 2003). Su desarrollo *in vitro* constituye una alternativa eficiente para la propagación masiva de plantas (Celestino *et al.*, 2005). Las ventajas del proceso, como son el control de las condiciones de cultivo, la facilidad de seguir visualmente el proceso, la disponibilidad del tejido y los altos rendimientos en la producción de embriones hacen de la embriogénesis somática un sistema ideal para realizar estudios a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular (Quiroz-Figueroa, 2002). En la literatura se reporta que existen diferencias significativas entre los procesos embriogénicos en distintas especies y en muchos casos, los resultados que se obtienen no pueden ser aplicados a otras especies e inclusive entre variedades de la misma especie (Quiroz-Figueroa, 2003).

Entre los elementos comunes de los diferentes procesos embriogénicos, se ha encontrado que el inicio de la ES requiere de la presencia de un factor externo, el cual ha sido caracterizado como un elemento de estrés ambiental, nutricional o regulatorio que causa una acumulación intracelular de auxina (Pasternak *et al.*, 2002). Se sabe que la célula embriogénica requiere de la presencia de una célula nodriza de la cual se ha propuesto que son generadas señales embriogénicas, que en muchos casos han sido identificadas como proteínas arabinogalactonadas (Toonen *et al.*, 1997).

También se ha demostrado que un tema recurrente en todas las especies estudiadas es la inducción en etapas tempranas de un receptor tipo cinasa específico de la embriogénesis, cuyo gen se ha nombrado SERK1 (Somatic Embriogenesis Receptor-like Kinase 1). Aunque este fue propuesto inicialmente como un gen expresado específicamente durante el proceso embriogénico (Schmidt *et al.*, 1997), en la actualidad se sabe que se encuentra expresado en tejidos vasculares, florales y del desarrollo (Kwaaitaal *et al.*, 2005; Mark *et al.*, 2007; Lewis *et al.*, 2010); inclusive, se han propuesto funciones diferentes para este gen, incluyendo algunas relacionadas con la defensa contra microorganismos patógenos (Song *et al.*, 2008; Santos y Aragão 2009).

CAPÍTULO IV

A pesar de la gran cantidad de estudios que se han dedicado para conocer los mecanismos que regulan el establecimiento de la embriogénesis somática, no se conoce cuál es la señal embriogénica ni dónde se genera; tampoco se sabe cuáles son los mecanismos de traducción de señales que conducen al establecimiento de la diferenciación en las células con potencial embriogénico. De la misma manera no se conocen el ligando extracelular ni los sustratos citosólicos del receptor SERK1.

EL receptor tipo cinasa transmembranal SERK1 de *Coffea canephora* pertenece a la subfamilia de las LRR, ya que cuenta en su estructura con un dominio extracelular compuesto por cinco regiones con repeticiones ricas en leucinas, un dominio transmembranal y un dominio citosólico en donde se encuentra el bucle de activación de la cinasa.

La presente propuesta experimental aprovecha la ventaja de que el receptor SERK1 de café pertenece a la familia LRR de las RLKs, cuyos miembros poseen una extraordinaria similitud tanto en la estructura como en el mecanismo de activación de los RLK de una misma sub-familia. Esto facilita la generación y el uso de receptores quiméricos, fusionando mediante ingeniería genética el dominio extracelular de unión del ligando de un receptor cuyo ligando es conocido, con los dominios transmembranal e intracelular de un receptor "huérfano".

Con base en lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un sistema inducible por brasinoesteroides mediante la construcción de un receptor quimérico, que está constituido por el dominio extracelular y el dominio transmembranal del receptor BRI1 de *Arabidopsis thaliana* y el dominio citosólico del receptor tipo cinasa SERK1 de *Coffea canephora*, nombrado como la quimera BRISERK1.

Los resultados mostraron que los tejidos fueron transformados y que el gen reportero GUS sí se expresa; sin embargo, no pudieron detectarse transcritos del a quimera. Esto nos lleva a proponer la utilización de un nuevo vector de clonación en donde la expresión del transgen sea dirigida por un promotor diferente del 35S. En nuestro laboratorio se ha construido el vector pMARTex, un vector binario alternativo al pCAMex, en donde el promotor 35S ha sido sustituido por el promotor constitutivo GD1 de arroz (Hernández Ozuna, comunicación personal).

Cuando este modelo se genere, la activación ectópica del receptor BRISERK1 se conseguirá mediante la aplicación de brasinoesteroides. Con eso se podrá sincronizar la activación de la cinasa, con lo que en principio deberá ser más fácil estudiar los mecanismos regulatorios de la embriogénesis somática en los explantes de *Coffea canephora*.

La activación del dominio citosólico de la quimera BRISERK1, por la posterior aplicación de brasinoesteroides nos permitirá realizar análisis de cambios moleculares mediante técnicas de proteómica y transcriptómica, por mencionar algunos.

BIBLIOGRAFÍA

- Celestino C., I. Hernández, E. Carneros, D. López-Vela y M. Toribio, (2005) La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For* (2005) 14(3), 345-357
- Donghui Song, Guojun Li, Fengming Song, Zhong Zheng, (2008). Molecular characterization and expression analysis of OsBISERK1, a gene encoding a leucine-rich repeat receptor-like kinase, during disease resistance responses in rice. *Mol Biol Rep* (2008) 35:275–283
- Kwaaitaal M. A. C. J., S. C. de Vries, and E. Russinova, (2005). *Arabidopsis thaliana* somatic embryogenesis receptor kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. *Protoplasma* (2005) 226: 55–65
- Marcelo O. Santos and Francisco J.L. Aragão (2009). Role of SERK genes in plant environmental response. *Plant Signaling & Behavior* 4:12, 1111-1113
- Mark A. C. J. Kwaaitaal and Sacco C. de Vries, (2007). The SERK1 gene is expressed in procambium and immature vascular cells. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, No. 11, pp. 2887–2896
- Michael W. Lewis, Michelle E. Leslie, Emilee H. Fulcher, Lalitree Darnielle, Patrick N. Healy, Ji-Young Youn and Sarah J. Liljegren, (2010). The SERK1 receptor-like kinase regulates organ separation in *Arabidopsis* flowers. *The Plan journal* (2010) 62, 817-828
- Nishiya T. and DeFranco A.L.,(2004). Ligand-regulated chimeric receptor approach reveals distinctive subcellular localization and signaling properties of the toll-like receptors. Vol. 279, No. 18, Issue of April 30, pp. 19008–19017, 2004.
- Pasternak T., E. Prinsen, F. Ayaydin, Pmiskolczi, G. potters, H. Asard, H. Van Onckelen, D. Dudits and A. Feher (2002) The role of auxin, pH and stress in the activation of embryogenic cell división in leaf protoplast-derived cells of alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol.* 129: 1807-1819

CAPÍTULO IV

Pretová A. and B. Obert, (2003). Flax (*Linum usitatissimum L.*) – a plant system for study of embryogenesis. Acta biol. Crac. Series Bot. 45: 15-18.

Quiroz-Figueroa F., (2003). Estudio de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*. Tesis de doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán., Mérida, México Pp 6-8

Quiroz-Figueroa F., C. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V. Loyola-Vargas, (2002). Histological studies on developmental stages and differentiation on two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. Plant cell rep 20:1141-1149.

Schmidt EDL, Guzzo F, Toonen MAJ, de Vries SC (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. Development 124:2049–2062

Toonen M.A.J., T. Hendriks, E.D.L. Schmidt, H.A. Verhoeven, A. van Kammen and S.C. de Vries (1994) Description of somatic-embryo forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Plant Cell 194: 565-572

CAPÍTULO V CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

Se cumplió el objetivo general, que consistió en construir el receptor quimérico BRI1::SERK1 constituido por la región extracelular del receptor BRI1 de *Arabidopsis thaliana* y los dominios transmembranal y citosólico del receptor SERK1 de *Coffea canephora*.

Este receptor quimérico fue subclonado eficientemente del vector de construcción pUC57 hacia el vector binario pCAMex.

Se desarrolló exitosamente la transformación genética, mediada por el cocultivo con la cepa recombinante de *Agrobacterium tumefaciens*, de los explantes embriogénicos de café con esta construcción. Así lo demuestra la amplificación por PCR de un segmento del ADNc del gen quimérico a partir de ADN genómico extraído de embriones somáticos de 60 días de desarrollo, lo cual demostró la integración del transgen en el genoma de *Coffea canephora*.

En el proceso de generación de la quimera se generó también una construcción testigo, la cual servirá para expresar el gen quimérico en antisentido, constituyendo un testigo negativo del proceso de transformación, lo cual complementa el modelo de estudio.

En este evento de transformación no pudieron detectar los transcritos del gen quimérico en los embriones transformados. La falta de presencia de transcritos se pudo deber a la regulación transcripcional de las células de *Coffea canephora* impidiendo que la quimera BRISER1 se transcriba. Pero no hay que descartar una posible falla en el diseño de la quimera.

Este experimento deberá ser analizado y repetido con las modificaciones indicadas para conseguir la expresión del transgen en los explantes embriogénicos.

PERSPECTIVAS

Como hasta el momento no se ha logrado la detección de transcritos del receptor quimérico BRISERK1 en embriones transformados, pero sí se pudo comprobar la inserción del transgen en el genoma de *Coffea canephora*, será necesaria la introducción del receptor quimérico en otros vectores de expresión, así como la transformación de otros tipos de tejidos vegetales para poder descartar un mal funcionamiento del vector de excreción pCAMex o algún evento regulatorio que no permita la transcripción correcta del ADNc de BRISERK1.

También se debe considerar la construcción de otras variantes del receptor quimérico, ya que hay reportes de que para la mayoría de los receptores tipo cinasas la fosforilación está determinada por un residuo o por un grupo de aminoácidos (tirosina, treonina y serina), localizados en la región yuxtamembranal y en diversos sitios en el dominio de cinasas.

Debido a que en el proyecto global se utilizarán brasinoesteroides para inducir la actividad del receptor quimérico, es necesario determinar las concentraciones efectivas para la activación del receptor sí que se vea afectada la respuesta embriogénica en los explantes de *Coffea canephora in vitro*. Es muy importante que se establezca una metodología para evaluar la activación del dominio cinasa de SERK1 de *Coffea canephora* inducción, mediante RT-PCR en tiempo real después de la aplicación de brasinoesteroides.

En trabajos futuros se activará el dominio de cinasa de SERK y se podrá analizar su efecto sobre la expresión génica de diferentes maneras, incluyendo entre otras la secuenciación masiva y el análisis del transcrito, así como la evaluación de los niveles de transcrito de genes homeóticos, como WUSCHEL, BABY BOOM y LEC1.

ANEXO

Tctacttgacagagctcaagttggtgaaacatctcta^ataaccaattcgtcggaccaatc 1020
S T C T E L K L L N I S S N Q F V G P I
Cctccgctaccgcttaaaagtctccaatacctctctctggccgagaacaaattcaccggc 1080
P P L P L K S L Q Y L S L A E N K F T G
Gagatccctgactttctctccggcgcgtgtgatacactcactggctcgcgatctctctgga 1140
E I P D F L S G A C D T L T G L D L S G
Aatcatttctacgggtgcggttcctccattcttcggttcatgttctcttctcgaatcactc 1200
N H F Y G A V P P F F G S C S L L E S L
Gcgttgctcgagtaacaacttctctggcgagttaccgatggatacgttggtgaagatgaga 1260
A L S S N N F S G E L P M D T L L K M R
Ggactcaaagtacttgatctgtctttcaacgagttttccggcgaattaccggaatctctg 1320
G L K V L D L S F N E F S G E L P E S L
Acgaatctatccgcttcggttgtaacgtagatctcagctccaacaatttctccgggtccg 1380
T N L S A S L L T L D L S S N N F S G P
Attctcccaaactctctgccagaaccctaaaaacactctgcaggagctttaccttcagaac 1440
I L P N L C Q N P K N T L Q E L Y L Q N
Aatggcttcaccgggaagattccaccgactttaagcaactgttctgagctggtttcgctt 1500
N G F T G K I P P T L S N C S E L V S L
Cacttgagcttcaattacctctccgggacaatcccttcgagcttaggctctctatcgaag 1560
H L S F N Y L S G T I P S S L G S L S K
Cttcgagatctgaaactatggctgaatatgtagaaggagagatccctcaggagctcatg 1620
L R D L K L W L N M L E G E I P Q E L M
Tatgtcaagaccttagagactctgatcctcgacttcaacgatttaaccgggtgaaatccct 1680
Y V K T L E T L I L D F N D L T G E I P
Tccggtttaagtaactgtaccaatcttaactggatttctctgtcgaataaccgggttaacc 1740
S G L S N C T N L N W I S L S N N R L T
Ggtgagattccgaaatggattggccggttagagaatctcgctatcctcaagctaagcaac 1800
G E I P K W I G R L E N L A I L K L S N
Aattcattctccgggaacattccggctgagctcggcgactgcagaagcttaatctggctt 1860
N S F S G N I P A E L G D C R S L I W L
Gatctcaacaccaatctcttcaatggaacgattccggcggcgatgtttaacaatccggg 1920
D L N T N L F N G T I P A A M F K Q S G
Aaaatcgctgccaatttcatcgccggtaagaggtacgtttatatcaaaaacgatgggatg 1980
K I A A N F I A G K R Y V Y I K N D G M
Aagaaagagtgatcatggagctggtaatttacttgagtttcaaggaatcagatccgaacaa 2040
K K E C H G A G N L L E F Q G I R S E Q
Ttaaaccggctttcaacgaggaacccttgtaatatcactagcagagtctatggaggtcac 2100
L N R L S T R N P C N I T S R V Y G G H
Acttcgccgacgtttgataacaatggttcgatgatgtttctggacatgtcttacaacatg 2160
T S P T F D N N G S M M F L D M S Y N M
Ttgtctggatacataccgaaggagattggttcgatgccttatctgtttattctcaatttg 2220
L S G Y I P K E I G S M P Y L F I L N L
Ggtcataacgatatctctggttcgattcctgatgaggttaggtgatctaagaggtttaaac 2280

G H N D I S G S I P D E V . G D L R G L N
 Attcttgatctttcaagcaataagctc gatgggaggattcctcaggctatgtcagctctt 2340
 I L D L S S N K L D G R I P Q A M S A L
 Actatgcttacggaatcgatttgtcgaataataatttgtctgggtccgattcctgagatg 2400
 T M L T E I D L S N N N L S G P I P E M
 Ggtcagtttgagacttttccaccggctaagttcttgaacaatcctgggtctct **gtggttat** 2460
 G Q F E T F P P A K F L N N P G L **C G Y**
Cctcttccgcggtgtgatccttcaa atgcagacgggttatgctcatcatcagagatctcat 2520
P L P R C D P S N A D G Y A H H Q R S H
Ggaaggagaccagcgctcccttgctggtagtgtggcgatgggattggttctcttttgtg 2580
G R R P A S L A G S V A M G L L F S F V
Tgtatatttgggctgatccttgttggttagagagatgaggaagagacggagaaagaaagag 2640
C I F G L I L V G R E M R K R R R K K E
 Gcggagttggagatgtatgcggaaggacatggaaactctggcgatagaactgctaacaac 2700
 A E L E M Y A E G H G N S G D R T A N N
 Accaattggaagctgactgggtgtgaaagaagccttgagtatcaatcttgctgctttcgag 2760
 T N W K L T G V K E A L S I N L A A F E
 Aagccattgcggaagctcacgtttgcggatcttcttcaggctaccaatggtttccataat 2820
 K P L R K L T F A D L L Q A T N G F H N
 Gatagtctgattggttctgggtgggttggagatgtttacaaagcgattttgaaagatgga 2880
 D S L I G S G G F G D V Y K A I L K D G
 Agcgcggtggctatcaagaaactgattcatgttagcggtaagggtgatagagagttcatg 2940
 S A V A I K K L I H V S G Q G D R E F M
 Gcggagatggaaccattgggaagatcaaacatcgaaatcttgtgcctcttcttggttat 3000
 A E M E T I G K I K H R N L V P L L G Y
 Tgcaaagttggagacgagcggcttcttgtgtatgagtttatgaagtatggaagtttagaa 3060
 C K V G D E R L L V Y E F M K Y G S L E
 Gatgttttgcacgaccccaagaaagctgggggtgaaactaaactgggtccacacggcggag 3120
 D V L H D P K K A G V K L N W S T R R K
 Attgcgataggatcagctagagggccttgctttccttcaccacaactgcagtcgccatatac 3180
 I A I G S A R G L A F L H H N C S P H I
 Atccacagagacatgaaatccagtaatgtgttgcttgatgagaatttggagctcggggtt 3240
 I H R D M K S S N V L L D E N L E A R V
 Tcagattttggcatggcgaggctgatgagtgcgatggatacgcatttaagcgtcagtaca 3300
 S D F G M A R L M S A M D T H L S V S T
 Ttagctggtacaccgggttacgttcctccagagtattaccaagtttcaggtgttcaaca 3360
 L A G T P G Y V P P E Y Y Q S F R C S T
 Aaaggagacgtttatagttacggtgtgggtcttactcgagctactcacgggtaaacggcca 3420
 K G D V Y S Y G V V L L E L L T G K R P
 Acggattcaccggatttttgagataacaaccttgttgatgggtgaaacagcagcaaaa 3480
 T D S P D F G D N N L V G W V K Q H A K
 Ctgcggattagc gatgtgtttgaccccgagcttatgaaggaagatccagcattagagatc 3540
 L R I S D V F D P E L M K E D P A L E I

ANEXO

Gaactttttacaacattttaaagttgcggttgcggtgtttggatgatcgggcttggagacga 3600
E L L Q H L K V A V A C L D D R A W R R
Ccgacaatggtacaagtcattgcatggccatgtttaaggagatacaagccgggtcagggatagat 3660
P T M V Q V M A M F K E I Q A G S G I D
Tcacagtcaacgatcagatcaatagaggatggagggttcagtacaatagagatggttgat 3720
S Q S T I R S I E D G G F S T I E M V D
Atgagtataaaagaagttcctgaaggaaaattatgagagttagaacagagccaaagcag 3780
M S I K E V P E G K L - E L E T E P, K Q
Attctttgaaatcaaaatcatctaagggtcagtcggatcttcttgggtctatctttttt 3840
I L - T S K S S K G Q S D F P W V Y F F
Tgtatttttctactatatgctaagtgtatgtatctatgttatttatacataagacggatgt 3900
C I F Y Y M L S V C I Y V I Y T - D G C
Tttttttttcgggctcgggtcgaattgggggtgggtggagaatagaactaagtaataacttt 3960
F F F R A R S N W G W W R I E L S N N F
Gttaagaatgtaaatatacagttttttggggagggatttgtaatgttttcgttttttag 4020
V K N M - I Y S F L G R D L - C F R F -
Ttctatggaaatttctacgttgctaacaaattaaatttataatgaatcatgaagaacaa 4080
F Y G N F Y V A N K L N L - - I M K K Q
Agagccaatgtgtattaaatttcgactgatcatgttcatgtaaatgcacgtgacctatta 4140
R A N V Y - I S T D H V H V N A R D L L
Attcattattgtcgggaattaatttgg 4166
I H Y C R N - F

ANEXO II. BRISERK1

Secuencia nucleotídica y deducida de aminoácidos del receptor quimérico BRI1::SERK1. Las secuencias de BRI1 *Arabidopsis thaliana* están en verde y las de SERK1 de *Coffea canephora* en rojo. Los aminoácidos subrayados y en negritas corresponden al dominio transmembranal. Se muestran los dominios característicos para la cinasa en los cuadros rojos en gris se encuentran las secuencias para la enzima de restricción *Kpn I*.

```

CCGTACGGTACCGTCTTTTGACTCTCTTCTCTCTCCTCTCTTTCTGCTTTCCCTCAATCTCTCTCTTTCTATCTCTAGAGCTTCCACTT
P Y G T V F - L S S L S P L F L L S S I S L F L S L E L P L
CCTCTCTAATGGTGGAAACAAAACCCCTAGATTCCCCCTTTTCATCTTCTCTACTTCCCACACTTTTCTCTCTCACAAACTCTTGAGAAATG
P L - W W N Q N P R F P L S S S L L P T L F S L T N S - E M
AAGACTTTTTCAAGCTTCTTTCTCTCTGTAACAACTCTCTTCTTCTCCTTCTTTTCTCTTTTCATTTCAAGCTTCACCATCTCAGTCT
K T F S S F F L S V T T L F F F S F F S L S F Q A S P S Q S
TTATACAGAGAAATCCATCAGCTTATAAGCTTCAAAGCGTTCTTCTGACAAGAATCTTCTCCAGACTGGTCTTCCAACAAAACCCG
L Y R E I H Q L I S F K D V L P D K N L L P D W S S N K N P
TGTACTTTTCGATGGCGTTACTTGCAGAGACGACAAAGTTACTTCGATTGATCTCAGCTCCAAGCCTCTCAACGTCGGATTCAAGTCCGCTG
C T F D G V T C R D D K V T S I D L S S K P L N V G F S A V
TCTCGTCTCTCCTGTCTCTCACCGGATTAGAGTCTCTGTTTCTCTCAAACCTCACACATCAATGGCTCCGTTTCTGGCTTCAAGTGCTCT
S S S L L S L T G L E S L F L S N S H I N G S V S G F K C S
GCTTCTTTAACCAGCTTGGATCTATCTAGAAACTCTCTTTCCGGTCTGTAACGACTCTAACAAGCCTTGGTTCTTGTCTCCGGTCTGAAG
A S L T S L D L S R N S L S G P V T T L T S L G S C S G L K
TTTCTTAACGCTCTTCCAATACACTTGATTTTCCCGGAAAGTTTCAGGTGGGTTGAAGCTAAACAGCTTGGAAAGTTCTGGATCTTTCT
F L N V S S N T L D F P G K V S G G L K L N S L E V L D L S
GCGAATCAATCTCCGCTGCTAACGTCGTTGGTTGGGTTCTCTCCGATGGGTGTGGAGAGTTGAAACATTTAGCGATTAGCGGAAACAAA
A N S I S G A N V V G W V L S D G C G E L K H L A I S G N K
ATCAGTGGAGACGTCGATGTTTCTCGCTGCGTGAATCTCGAGTTTCTCGATGTTTCTCCAACAATTTCTCCACTGGGATTCTTTCTCTC
I S G D V D V S R C V N L E F L D V S S N N F S T G I P F L
GGAGATTGCTCTGCTCTGCAACATCTTGACATCTCCGGGAACAAATTATCCGGCGATTCTCCCGTGCTATCTCTACTTGACACAGAGCTC
G D C S A L Q H L D I S G N K L S G D F S R A I S T C T E L
AAGTGTGTAACATCTCTAGTAACCAATTCGTCGGACCAATCCCTCCGCTACCCTTAAAAGTCTCCAATACCTCTCTCTGGCCGAGAAC
K L L N I S S N Q F V G P I P P L P L K S L Q Y L S L A E N
AAATTCACCGCGGAGATCCCTGACTTTCTCTCCGGCGCGTGTGATACACTCACTGGTCTCGATCTCTCTGGAAATCATTCTACGGTGGC
K F T G E I P D F L S G A C D T L T G L D L S G N H F Y G A
GTTCTCCATTCTTCGGTTCATGTTCTTCTCTCGAATCACTCGCGTTGTGCGAGTAACAACCTTCTCTGGCGAGTTACCGATGGATACGTTG
V P P F F G S C S L L E S L A L S S N N F S G E L P M D T L
TTGAAGATGAGAGGACTCAAAGTACTTGATCTGTCTTTCAACGAGTTTCCCGGGAATTACCGGAATCTCTGACGAATCTATCCGCTTCG
L K M R G L K V L D L S F N E F S G E L P E S L T N L S A S

```

ANEXO

TTGCTAACGTTAGATCTCAGCTCCAACAATTCTCCGGTCCGATTCTCCAAATCTCTGCCAGAACCCTAAAAACACTCTGCAGGAGCTT
L L T L D L S S N N F S G P I L P N L C Q N P K N T L Q E L

TACCTTCAGAACAATGGCTTCACCGGAAGATTCCACCGACTTAAAGCAACTGTTCTGAGCTGGTTTCGCTTCACTTGAAGCTTCAATTAC
Y L Q N N G F T G K I P P T L S N C S E L V S L H L S F N Y

CTCTCCGGGACAATCCCTTCGAGCTTAGGCTCTCTATCGAAGCTTCGAGATCTGAAACTATGGCTGAATATGTTAGAAGGAGAGATCCCT
L S G T I P S S L G S L S K L R D L K L W L N M L E G E I P

CAGGAGCTCATGTATGTCAAGACCTTAGAGACTCTGATCCTCGACTTCAACGATTTAACCGGTGAAATCCCTTCGGTTTAAAGTAACTGT
Q E L M Y V K T L E T L I L D F N D L T G E I P S G L S N C

ACCAATCTTAACTGGATTCTCTGTGCAATAACCGGTTAACCGGTGAGATCCGAAATGGATTGGCCGGTTAGAGAATCTCGCTATCCTC
T N L N W I S L S N N R L T G E I P K W I G R L E N L A I L

AAGCTAAGCAACAATTCAATCTCCGGGAACATTCCGGCTGAGCTCGCGACTGCAGAAGCTTAATCTGGCTTATCTCAACACCAATCTC
K L S N N S F S G N I P A E L G D C R S L I W L D L N T N L

TTCAATGGAACGATTCCGGCGCGATGTTTAAACAATCCGGGAAATCGCTGCCAATTTATCGCCGGTAAGAGGTACGTTTATATCAAA
F N G T I P A A M F K Q S G K I A A N F I A G K R Y V Y I K

AACGATGGGATGAAGAAAGAGTGCATGGAGCTGGTAATTTACTTGAGTTTCAAGGAATCAGATCCGAACAATTAACCGGCTTTCAACG
N D G M K K E C H G A G N L L E F Q G I R S E Q L N R L S T

AGGAACCCCTGTAATATCACTAGCAGAGTCTATGGAGTCCACTTCGCCGACGTTTGATAACAATGGTTCGATGATGTTTCTGGACATG
R N P C N I T S R V Y G G H T S P T F D N N G S M M F L D M

TCTTACAACATGTTGTCTGGATACATACCGAAGGAGATTGGTTCGATGCCTTATCTGTTTATTCTCAATTTGGGTCATAACGATATCTCT
S Y N M L S G Y I P K E I G S M P Y L F I L N L G H N D I S

GGTTCGATTCTGATGAGGTAGGTGATCTAAGAGTTTAAACATCTTGATCTTTCAAGCAATAAGCTCGATGGGAGGATTCTCAGGCT
G S I P D E V G D L R G L N I L D L S S N K L D G R I P Q A

ATGTCAGCTCTTACTATGCTTACGGAAATCGATTTGTGCAATAATAATTTGTCTGGTCCGATTCTGAGATGGGTCAGTTTGAAGCTTTT
M S A L T M L T E I D L S N N N L S G P I P E M G Q F E T F

CCACCGCTAAGTCTTGAACAATCCTGGTCTCTGTGGTTATCCTCTCCGGGTGTGATCCTTCAAATGCAGACGGTTATGCTCATCAT
P P A K F L N N P G L C G Y P L P R C D P S N A D G Y A H H

CAGAGATCTCATGGAAGGAGACCAGCTCCCTTGCTGGTAGTGTGGCGATGGGATTGTTGTTCTCTTTTGTGTATATTTGGGCTGATC
Q R S H G R R P A S L A G S V A M G L L F S F V C I F G L T

CTTGTGGTCTGTCGGCGAAAACCAAGAATATTTCTTTGATGTACCAGCTGAGGAGGATCCTGAGGTGCATCTAGGGCAGCTTAAAGG
L V G R R R K P Q E Y F F D V P A E E D P E V H L G Q L K R

TTCTCCCTGAGAGAATTACAAGTTCACCGGATAGTTTTAGTAATAAAAAACATCTGGGTAGAGGTGGGTTTGGGAAGGTTTACAAGGGT
F S L R E L Q V A T D S F S N K N I L G R G G F G K V Y K G

I

CGACTTGCTGATGGTTCCTTAGTGGCTGTTAAGCGACTAAAGGAGGAGCGAACACCAGGTGGAGAGCTGCAGTTTCAAACGGAAGTTGAG
R L A D G S L V A V K R L K E E R T P G G E L Q E Q T E V E

* II III

ATGATCAGCATGGCAGTGCATAGGAATCTCCTTCGACTGCGTGGTTTTTGTATGACACCAACTGAACGGTTGCTTGTATCCATACATG
M I S M A V H R N L L R L R G F C M T P T E R L L V Y P Y M

IV V

GCCAAATGGAAGTGTGCATCGGTTTGGAGGAACGGCCACCAATGAACCACCCTAAATGGTCAACAGGAAGCGCATTGTATTGGGA
A N G S V A S R L R E R P P N E P P L N W S T R K R I V L G

TCTGCAAGAGGATTGTCTTATTGTCATGATCATTGCGACCCAAAGATTATTCACCGTGATGCCAAAGCTGCCAACATTTGTTAGATGAA
 S A R G L S Y L H D H C D P K I I H R D A K A A N I L L D E
 VIa VIb

GAGTTTGAGGCTGTGGTTGGAGATTCGGCTTGGCTAAACTCATGGATTATAAGGATACCCATGTTACAACCTGCTGTACGCGGTACAATT
 E F E A V V G D F G L A K L M D Y K D T H V T T A V R G T I
 VII

GGGCATATCGCTCCAGAGTACCTGTCTACTGGTAAATCTTCTGAGAAAACCTGATGTCTTTGGGTACGGGATCATGCTTCTTGAGCTTATC
 G H I A P E Y L S T G K S S E K T D V F G Y G I M L L E L I
 VIII IX

ACCGACAAGGGCATTGATCTTGCTCGCCTTGCAAATGATGATGATGTCATGTTGCTTGATTGGGTCAAGGGACTCCTAAAGGAGAAA
 T G Q R A F D L A R L A N D D D V M L L D W V K G L L K E K
 X

AAATTGAAATGCTGGTTGATCCTGATTTGCAGAACAAATTATGTCGAGTTTGAAGTTGAGCAATTAATACAGGTTGCCTTGCTATGCACT
 K L E M L V D P D L Q N N Y V E F E V E Q L I Q V A L L C T
 *

CAGGGCAATCCAATGGATCGGCCAAAAATGTCGGAAGTGGTGAGAATGCTTGAAGGTGGCGGCTTGGCTGAAAGATGGGATGAGTGGCAA
 Q G N P M D R P K M S E V V R M L E G G G L A E R W D E W Q
 XI

AAGGTAGAAGTTTTTCGTCAGGAGGTGGAAGTGGCACCCCTCCAAACTCGGATTGGATTGTTGACTCAACAGAGAATTTACATGCAGTC
 K V E V F R Q E V E L A P P P N S D W I V D S T E N L H A V

GAACTGTCTGGTCCTAGGTGACCTTTTATAGCCAAATTCAGAAATGAAAATGTTAGGATCTTTCCTTTTTAAATTTTTTCCTCCT
 E L S G P R - P F I A K F K K - K L L G S F L F L N F F P P

TTTTTGGGGTATAATGTTTTCTTTTGTTCGTTATTTATTATGATCATGAAATTTATGACATTCAGGCCGCTGCAAGCCCATTGTGAAA
 F L G Y N V F F C S V I Y Y D H E I I D I Q A A C K P I V K

TGTATTTCAATTTGTGCGGTACC:GTACGG
 C I S I C A V P Y

ANEXO III. SITIOS DE UNIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN

Posibles sitios de unión de factores de transcripción en la secuencia de DNAc de BRISERK1.

<u>Site Name</u>	<u>Organism</u>	<u>Position</u>	<u>Strand</u>	<u>Matrix score.</u>	<u>sequence</u>
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	52	+	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Brassica rapa</i>	96	+	5	CAAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	175	-	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Brassica rapa</i>	199	-	5	CAAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	573	+	5	CCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	574	+	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Brassica rapa</i>	612	+	5	CAAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Glycine max</i>	629	-	5	CAATT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	630	-	5	CCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	650	-	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	655	-	5	CCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	673	-	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Brassica rapa</i>	681	-	5	CAAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	693	-	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Petunia hybrida</i>	730	+	7	TGCCAAC
<u>CAAT-box</u>	<i>Glycine max</i>	837	+	5	CAATT
<u>CAAT-box</u>	<i>Glycine max</i>	838	-	5	CAATT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	839	-	5	CCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Brassica rapa</i>	946	-	5	CAAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Brassica rapa</i>	966	+	5	CAAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	993	-	5	CCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Glycine max</i>	1023	-	5	CAATT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1024	-	5	CCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Brassica rapa</i>	1047	-	5	CAAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Glycine max</i>	1057	+	5	CAATT
<u>CAAT-box</u>	<i>Glycine max</i>	1082	+	5	CAATT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1115	+	6	gGCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	1117	+	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1121	+	5	CCAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Hordeum vulgare</i>	1122	+	4	CAAT
<u>CAAT-box</u>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	1154	-	5	CCAAT