

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

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

CAPÍTULO III

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

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

CAPÍTULO IV

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

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

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

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

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

RESUMEN

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

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

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

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