

## MECANISMOS ENDÓGENOS IMPLICADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS CIGÓTICA Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA: GENERALIDADES Y ULTIMOS DESCUBRIMIENTOS

*Antonietta Gutiérrez Rosati<sup>1</sup>*  
*Sandy Espinoza*  
*Danilo Arias*  
*Víctor Caro*

### RESUMEN

Haberlandt en 1902 propuso la teoría que todas las células de las plantas pueden llegar a formar otras plantas, es decir, la totipotencia, pero en ese tiempo no pudo ser demostrado. White en 1939 informó sobre la inducción de brotes adventicios *in vitro* de callos en *Nicotiana glauca* con *N. langsdorfii* y Nobercourt obtuvo raíces adventicias de brotes en callo de la zanahoria, estos experimentos endosaron la teoría de la totipotencia celular.

Más adelante y en forma simultánea, demostraron Reinert y Steward en 1958 sobre la producción de embriones somáticos, más adelante demostró que estos embriones fueron originados de las células aisladas, demostrando la totipotencia de las células de la planta. La regeneración de plantas directamente de explantes o de callos, por medio de la embriogénesis somática se ha utilizado como alternativa en los métodos de la propagación; sin embargo, ese uso se ha limitado debido a estabilidad genética limitada en las culturas de callos. Tiene, no obstante la necesidad regenerar las plantas de selecciones de las células, como también la necesidad para establecer métodos genéticos celulares aplicables en la mejora de las plantas y la recuperación de las variantes somaclonales; por lo tanto un interés considerable en definir las rutas de la regeneración para varias plantas de la importancia económica aún existe

**Palabras Claves:** *embriogénesis somática, embriogénesis cigotica, regeneración, variante somaclonal, totipotencia celular.*

### SUMMARY

In 1902 Haberlandt proposed the theory that all cells of the plants are able to form complete plants that is to say, that have the totipotency, but in that time it was not demonstrated.

White in 1939 I inform about the induction of in Vitro adventitious buds from calluses in *Nicotiana glauca* with *N. langsdorfii* and Nobercourt obtained adventitious buds roots in carrot callus, these experiments endorsed the theory of cellular totipotency.

Later and in simultaneous form, Reinert and steward in 1958 informed about the production of somatic embryos, later was demonstrated that these embryos were originated from isolated cells, demonstrating the totipotency of plant cells. The regeneration of plants directly from explantes or from calluses, by means of the somatic embryogenesis has been used as an alternative in the propagation methods; nevertheless, that application has been limited because of limited genetic stability in the cultures of calluses. It has, however the necessity to regenerate plants from cells selections, as also the necessity to establish applicable cellular genetic methods in the improvement of the plants and the recovery of somaclonales variants; consequently a considerable interest in defining the routes of regeneration for several plants of economic importance exists

<sup>1</sup> Universidad Nacional Agraria La Molina, P.O.Box 456 La Molina, Lima 12- Perú.  
E-mail: antonietta@lamolina.edu.pe

**Key Words:** *somatic embryogenesis, cigotic embryogenesis, regeneration, somaclonal variation, celular totipotency.*

## INTRODUCCIÓN

En 1902 Haberlandt propuso la teoría que todas las células de las plantas son capaces de formar plantas completas es decir que tienen la totipotencialidad, pero en ese tiempo no fue demostrado.

White en 1939 informo acerca de la inducción de yemas adventicias *in Vitro* a partir de callos de *Nicotiana glauca* con *N. langsdorfii* y Nobercourt obtuvo raíces adventicias de un callo de zanahoria estos experimentos respaldaron la teoría de totipotencia celular.

Posteriormente y en forma simultánea, Reinert y Steward en 1958 informaron acerca de la producción de embriones somáticos, mas tarde se demostró que estos embriones eran originados a partir de células aisladas, demostrándose la totipotencia de las células vegetales.

La regeneración de plantas directamente de explantes o a partir de callos, por medio de la embriogénesis somática se ha utilizado como una alternativa en los métodos de propagación; sin embargo, esa aplicación ha sido limitada a causa de la poca estabilidad genética en los cultivos de callos. Hay, en cambio la necesidad de regenerar plantas a partir de células selectas, como también la necesidad de establecer métodos genéticos celulares aplicables en el mejoramiento de las plantas y en la recuperación de variantes somaclonales; en consecuencia existe un considerable interés en definir las vías de regeneración para varias plantas de importancia económica.

## ASPECTOS TEÓRICOS GENERALES:

La embriogénesis somática (asexual o adventicia) consiste en el desarrollo de embriones a partir de células que no son el producto de una fusión gamética, en este proceso se produce una estructura bipolar con eje radical-apical a partir de una célula somática.

Este proceso se produce con mucha asiduidad en la naturaleza, produciéndose de forma espontánea en más de 60 familias, algunas tan importantes como las: crucíferas, gramíneas, rosáceas, legumi-

nosas y palmáceas etc. Es catalogado como un mecanismo apomítico.

La efectividad de los tratamientos para la obtención de la embriogénesis somática depende de si el tejido del explante esta formado de CsDPE (células somáticas determinadas proembriogénicas) o CsNE (células somáticas no embriogénicas) términos planteados por Evans et al (1981) Sharp et al (1983).

En ciertos aspectos los embriones somáticos mantienen similitud con los embriones zygóticos; sin embargo, tanto *in vivo* como *in vitro*, puede ocurrir ciertas anomalías en el desarrollo como por ejemplo fusión de cotilédones.

En estudios de embriogénesis somática se sigue utilizando la zanahoria como un sistema modelo no solo para estudios de desarrollo, sino también para determinar eventos bioquímicos que controlan la morfogénesis.

### *Tipos De Embriogénesis Somática*

Existe principalmente dos tipos de embriogénesis somática: directa e indirecta. **Embriogénesis directa:** un estímulo de la división celular puede ser suficiente para la formación de un embrión somático a partir del tejido del explante (Merkle et al 1995).

Los explantes con este tipo de embriogénesis experimentan un mínimo de proliferación antes de formar los embriones somáticos, formándose en explantes en que todas o algunas de las células están predeterminadas como células embriogénicas, por haber retenido algunas de las propiedades de las células meristemáticas parentales de las que derivaron (embriones, semillas).

**Embriogénesis indirecta:** en este caso las células no embriogénicas tienen que llevar a cabo varias divisiones mitóticas ante la presencia de una auxina durante la inducción, pasando al estado de las células embriogénicas y formándose callos.

En este proceso la fase de formación de callos se interpone entre el explante original y la aparición de embriones somáticos (Merkle et al 1995) según Halperin (1995) este tipo de embriogénesis es característica

de órganos maduros en que las células tienen que pasar por varios ciclos celulares para lograr la embriogénesis a determinadas condiciones.

### **FACTORES QUE INFLUYEN EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

**Explante:** muchos factores influyen en la conducta del explante estos incluyen el órgano que está sirviendo como fuente de tejido, la edad fisiológica y ontogénica del órgano, la estación en que el explante es obtenido, el tamaño del explante y las cualidades globales de la planta a la cual se ha obtenido el explante.

Se pueden usar diferentes tipos de explantes para inducir la formación de embriones en especies forestales, entre ellos embriones zygóticos en *Taxus bravifolia* y en *Araucaria angustifolia*. En algarrobo se usó la radícula como explante, en nuez se usó cotiledones, hipocotilos y raíces, mientras que en roble se usó embriones inmaduros y óvulo.

Uno de los problemas de la inducción de la embriogénesis somática es la alta tasa de fenolización de explantes, la cual es una reacción natural de la planta al efecto de la herida debido a los polifenoles y taninos.

**Medio de cultivo:** se usa generalmente el medio desarrollado por Murashige et al (1982) debido a su alta concentración de sales, otros medios utilizados también son el medio basal MS- en rosa y WP- en roble. Se ha demostrado que la exposición a altas concentraciones de sacarosa y manitol aumenta el potencial embriogénico en callo de zanahoria.

El nitrógeno en forma de nitrato y Ion amonio en concentraciones de 5-12.5  $\mu\text{M}$  es esencial así como el nitrógeno orgánico que provisto de glutamina y alanina es también beneficioso y puede remplazar al nitrógeno inorgánico en el medio.

El abastecimiento de nitrógeno es importante en la embriogénesis somática debido a la continua síntesis de proteína, ácidos nucleicos y sustancias de reserva.

El carbón activado inhibe el efecto de los fenoles. La adición de esta sustancia en cultivos embriogénicos promueve el desarrollo cuando este ha sido inhibido, ya que al parecer este adsorbe los compuestos fenólicos.

Las auxinas y citoquininas inhiben el desarrollo del embrión, pero permiten la germinación y la maduración de embriones. Las poliamidas como la espermita, la putrescina y la espermidina, esta relacionada con el control de la embriogénesis somática en zanahoria, inhibiendo el desarrollo de los embriones somáticos.

**Reguladores de crecimiento:** según Evans et al (1981) la mayoría de los sistemas embriogénicos requieren para la inducción de embriones concentraciones altas de auxina (generalmente 2,4-D) en el medio.

Nombra y Kumamine (1995) demostraron que a pesar que las auxinas son importantes para la formación de grupos celulares embriogénicos, su remoción permite el desarrollo de la embriogénesis somática, la cual se da a través de los estadios globular, corazón, torpedo y cotiledón. El desarrollo de un sistema embriogénico de alta frecuencia y sincrónico así como métodos alternativos para el aislamiento del embrión ha incrementado nuestro conocimiento de los eventos moleculares y fisiológicos que regula los diferentes estadios de la maduración del embrión.

El rango del uso del 2,4-D es de 0.5-27.6  $\mu\text{M}$  y concentraciones más altas como 45  $\mu\text{M}$  de 2,4-D en caso del que el carbón activado se incorpore al medio.

También es importante el uso del ANA e AIA así como también el uso del Picloran que es un inductor de la embriogénesis (0.1mg/l), Pliego Alfaro 1988.

Las citoquininas y ácido giberélico es incorporado al medio con el fin de ayudar a la maduración y a la germinación de los embriones somáticos como en el *Santalum album* y *Citrus sinensis*.

El ácido Abscísico se usa como un inhibidor el cual reprime la embriogénesis somática y reduce las frecuencias de anomalías del desarrollo como son la formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos.

**Algunos otros aditivos del medio:** Se ha encontrado que  $\text{AgNO}_3$  a concentraciones de 10-20  $\mu\text{M}$  incrementa hasta en dos veces el número de embriones somáticos en cultivos de suspensión de *Daucus carota* L. Estas concentraciones no afectan el

crecimiento o supervivencia de las células ni el pH del medio, solo genera un leve incremento de la producción de etileno. Sin embargo 1-10 ppm de ethephon, ácido 2-cloroetilfosfónico (fuente exógena de etileno) provoca un decaimiento en la formación de embriones somáticos con tasas inhibitorias de 15 y 50% respectivamente. Asimismo, la actividad de arginina descarboxilasa (ADC), una enzima clave de la ruta de poliaminas es estimulada por  $\text{AgNO}_3$  en los primeros 4 días de embriogénesis somática y reducida por ethephon. Esto sugiere que  $\text{AgNO}_3$  estimula la embriogénesis somática inhibiendo la acción del etileno aunque aún no es claro su papel en el control de la actividad de ADC.

La adición de 1-10mM de DFMO (difluorometilornitina) a un medio de cultivo permite el normal desarrollo de la embriogénesis somática aun a concentraciones inhibitorias de 2,4-D. DFMO también causa un incremento de la actividad de la arginina descarboxilasa (ADC) y de la acumulación de poliaminas e inhibe la acumulación de etileno en presencia o ausencia de 2,4-D. Difluorometilarginina (DFMA) a 0.1-1.0 mM inhibe completamente la embriogénesis aun en ausencia de 2,4-D; también inhibe la actividad ADC y causa reducción de los niveles de poliaminas. Por tanto, la biosíntesis de etileno inducida por auxina juega un rol importante en la embriogénesis ya que la promoción de la biosíntesis de poliaminas (por DFMO) puede causar una reducción de la biosíntesis de etileno por reducción de SAM (s-adenosilmetionina) lo que permite el desarrollo de la embriogénesis aun en presencia de auxina.

**Condiciones del medio ambiente:** los parámetros físicos influyen en el desarrollo y crecimiento del embrión.

Alta intensidad lumínica es esencial para la embriogénesis somática en *Nicotiana tabacum* in Vitro, en cambio en zanahoria fue necesaria la oscuridad para el desarrollo y la maduración normal de los embriones somáticos.

Entre otros factores que inducen la embriogénesis somática se encuentran la presión osmótica, iones metálicos pesados y deshidratación los cuales generaron embriones somáticos en cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* como lo

demuestran los trabajos hechos por Mijo Ikeda-Iwai et al., 2003. Además en estos trabajos también se ha determinado que el tipo de planta de una misma especie influye en el desarrollo de embriones en *Arabidopsis*. También es importante la duración del tratamiento a estrés.

#### **Control endógeno de la embriogénesis somática por mecanismos genéticos:**

El desarrollo de la semilla consta principalmente de dos partes: los procesos morfológicos tempranos (desarrollo del embrión) y los eventos de maduración tardíos (deshidratación de la semilla, acumulación de reservas, etc)

En los procesos morfológicos tempranos y luego los tardíos se observa una diferenciación del embrión en diferentes tejidos: meristemo apical del tallo, Hipocotilo, Raíz, Meristemo apical de la raíz, cotiledones y plúmula. Todo este proceso de diferenciación que se realiza en el proceso morfológico temprano y el de maduración de la semilla han sido investigados principalmente en *Arabidopsis thaliana*.

#### **ALGUNOS ESTUDIOS REALIZADOS EN LAS PROTEÍNAS PRESENTES EN LA EMBRIOGÉNESIS**

**Proteínas PR:** las proteínas PR son proteínas de defensa contra el stress y ataque de algunos insectos.

Se han detectado también durante la formación de algunos órganos: en germinación, fluoración, senescencia en plantas sanas (Tahiri-ALout, et al., 1990). Una de ellas es la proteína P-19 cuyo rol no se ha especificado durante embriogénesis, pero que se encuentra preferentemente en estadios tempranos, estadio globular (Chenget al., 1996; Sassa, Hilano 1998; Capella et al., 1997). En el estudio de Takuma et al (2004) se detectaron dos otras proteínas de esta misma familia: una de 16 y otra de 18.5Kb. La de 16 se detectó durante toda la embriogénesis, pero la de 19 y 18.5Kb solo durante el estadio globular. Como las tres reaccionaron al mismo antisuero, concluyeron que su estructura es semejante. (Takuma et al., 2004)

Como P-19 es una glicoproteína, la secuencia de bases corresponde con una proteína de 16.5Kb, y no de 19.5Kb como se esperaba (Takuma et al., 2004).

Hay reportes anteriores que hablan de otras proteínas tipo PR que se expresan durante la embriogénesis: GEA 20 en plántulas y semillas, y GEA31 en estadios globulares hasta el de plántula. 43 proteínas tipo Thaumatina que tienen alta similitud con las PR han sido detectadas durante este período, siendo mas frecuentes en los estadios tempranos.

Estas proteínas parecen tener relación con la iniciación de la embriogénesis desde las células somáticas de zanahoria. De la misma manera GEA20 y 31 fueron encontrados por Lin et al. (1996) en los estadios tempranos.

Se ha asociado estas proteínas PR con eventos tempranos secuenciales en la formación de los Cluster de células somáticas hasta la diferenciación de plántulas (Yasuda et al., 2000)

### **ESTUDIOS EN GENES RELACIONADOS A LA EMBRIOGÉNESIS**

En *A. thaliana* se ha encontrado que existen 4 genes principales que se encargan de su regulación: ABI3 ( ABSICIC ACID INSENSITIF3), LEC1 (LEAFY COTYLEDONS1), LEC2 (LEAFY COTYLEDONS2), FUS3 (FUSCA 3) (Giraudat et al., 1992, Gusmaroli et al., 2001, Lotan et al., 1998, Meinke et al., 1994, Parcy et al., 1997, Stone et al., 2001, West et al., 1993). Estos 4 genes codifican para proteínas que son activadoras transcripcionales, y que son los principales reguladores de la embriogénesis.

LEC1, LEC2 y FUS3 son importantes para ambas fases del desarrollo de la semilla.

En la embriogénesis de los mutantes para estos tres genes observamos una intolerancia del embrión a la desecación, defectos en la síntesis y acumulación de los materiales de almacenamiento y tricomas en los cotiledones (estructuras exclusivas de hojas). Y los mutantes lec1 presentan cotiledones semejantes a hojas (Meinke et al., 1994, Parcy et al., 1997, West et al., 1993, West et al., 1994).

La expresión de estos tres genes se da principalmente en la fase temprana de la embriogénesis. Si provocamos una expresión ectópica de LEC1 en células vegetativas se induce la formación de estructuras semejantes a las de un embrión en la superficie de la hoja. Y así mismo, la expresión de LEC2 induce la expresión de genes exclusivos del embrión como los que codifican para la cruciferita A, la proteína de almacenamiento 2S y la Oleosina (Lotan et al., 1998, Stone et al., 2001). Sin embargo no se conoce como estos genes actúan a nivel molecular en esta planta. Se sabe que las proteínas LEC1 y FUS3 presentan un dominio B3 que se encuentra en factores de transcripción de plantas, como es el caso de ABI3 y VP1 (Leurben et al., 1998, Stone et al., 2001) implicados en la maduración de la semilla y que expresan tardíamente.

Los genes LEC son reguladores centrales de la embriogénesis somática. Se confirma esta predicción ya que los genes LEC1 y FUS3 codifican para Factores de transcripción que son críticos para la embriogénesis (Lotan et al., 1998, Luerbern et al., 1998, Reidt et al., 2000).

#### **LEC1:**

La proteína LEC1 es muy semejante a la subunidad HAP3 del factor de unión a la caja (CBF) CCAAT que es un regulador transcripcional en eucariotas (Lotan et al., 1998). Se sabe poco de estos CBF en plantas (Albani et al., 1995, Edwards et al., 1998, Li et al., 1998), pero se ha identificado genes homólogos a HAP3 en dicho grupo. En bacterias y vertebrados, solo se ha identificado 1 gen tipo HAP3, pero en plantas se han detectado varios: los que son tipo LEC1 (like-LEC1) y los que no son de este tipo (non-like-LEC1) (Gusmaroli et al., 2002, Gusmaroli et al., 2001), lo que sugiere que existen múltiples homólogos HAP3 en plantas superiores que regulan la expresión genética de sets de genes específicos de la embriogénesis.

Pero es difícil un análisis específico de la expresión de LEC1 durante la embriogénesis, ya que esta se da en áreas muy específicas y pequeñas dentro de flores y frutos inmaduros en estadios tempranos de desarrollo, y porque no existen protocolos para el cultivo in Vitro

de embriones zygóticos en estadíos tempranos.

En *A. thaliana* se ha inducido la embriogénesis somática para dicho propósito con embriones zygóticos, protoplastos de células derivadas de hojas y con explantes de punta de ápice de tallo (Ikeda et al., 2002, Ikeda et al., 2003, Luo et L., 1997, Meinke et al, 1994); pero solo se obtuvo un número limitado de embriones somáticos y fue muy difícil obtenerlos en el mismo estadio.

Es por ello que el modelo dominante es el de zanahoria, ya que desde 1958 en el que se reporta el primer estudio, muchos investigadores han desarrollado procesos experimentales simples y eficientes (Zimmerman, 1993).

Dicha embriogénesis en zanahoria se logra en grandes cantidades transfiriendo células embrionarias de un medio con auxinas a uno sin dicha hormona; y se logra una sincronización de estadíos transfiriendo agregados celulares de un cierto tamaño (entre 38 y 63  $\mu\text{m}$ ) a un medio sin auxinas de manera espaciada (baja concentración celular).

Así se logra observar los cambios morfológicos semejantes a los de la embriogénesis zygótica.

En zanahoria existe un gen similar al de LEC1 de *A. thaliana*. Utilizando la biblioteca génica de zanahoria se obtuvieron algunos genes candidatos con esta función. Dicho gen LEC1 de zanahoria se denominó C-LEC1, encontrándose por lo menos dos copias de este (Yazawa et al., 2004).

Se observó que la secuencia de amino ácidos de dicha secuencia candidata en zanahoria era muy semejante a la de LEC1, observándose que del 56 al 79% de los Amino ácidos de la región B3 de la subunidad HAP3 del factor de unión a la caja CCAAT (Yazawa et al., 2004).

El gen C-LEC1 se expresa en células embriogénicas, en embriones somáticos y en semillas en desarrollo, y dicha expresión se da en las regiones periféricas del embrión mas no en el endospermo (Yazawa et al., 2004).

Esta expresión no se da al azar. se observa una pico en su expresión a los 7 días de iniciada la inducción de células embriogénicas (trasladándolas a una medio sin auxinas), o a los 23 días después de la floración, mas no en las células ya diferenciadas. (Yazawa et al., 2004).

Para comprobar que dicho gen tenía una actividad semejante a LEC1 de *Arabidopsis*, se introdujo dicho gen C-LEC1 a un mutante *lec1* (*Arabidopsis*), y se observó que el promotor de LEC1 promovía la transcripción de los genes estructurales de C-LEC1, traducido por la corrección de las estructuras anormales del mutante *lec1*, lo cual prueba que dichos genes son homólogos en estas dos especies. (Yazawa et al., 2004).

LEC2 y FUS3:

LEC 2 es expresado principalmente en la embriogénesis, y transcribe una proteína con un dominio B3, lo que sugiere, que la igual que LEC1 y FUS3 son reguladores transcripcionales del desarrollo de la semilla.

El dominio B3 es una secuencia de 120 Amino Ácidos descrita inicialmente el la tercera región básica de l gen del maíz VP1, que comparte secuencias con su ortólogo en *Arabidopsis*: ABI3 (Giraudat et al., 1992). Varias otras proteínas de origen vegetal contienen este dominio B3, tales como ABI3, VP1, FUS3 y AUXIN RESPONSE FACTOR1 (Reidt 2000, Mc Carty et al., 1991, Ulmasov et al., 1997). Hasta donde se sabe, el dominio B3 es exclusivo en plantas.

LEC2 FUS3 y ABI3 son expresa dos principalmente durante el desarrollo de la semilla, aunque ABI3 opera en la fase de maduración, mientras que FUS3 y LEC2 en ambas etapas.

Los resultados del estudio de Stone et al. (2001) sugieren que la expresión del gen LEC2 es suficientes para establecer un medio embrionario que provee la formación de un embrión somático.

Si bien la expresión ectópica de LEC1 también es suficiente para la formación de una embrión somático, dicha embriogénesis es mucho mas intensa con LEC2 que con LEC1 (Stone et al., 2001)

En embriogénesis zigótica los genes LEC1 y LEC2 son expresados de manera temprana, dándole la competencia para formar el embrión, pero sus funciones se traslapan.

LEC1 y LEC2 tiene funciones parecidas pero no idénticas. sus funciones son complementarias y parcialmente redundantes, aunque sus roles exactos no ha sido caracterizados de manera precisa

(Lotan et al, 1998, Meinke et al., 1994, West et al, 1994).

PKL:

En arabidopsis, el mutante *pkl* genera embriogénesis en cultivo de raíces germinadas sin hormonas en el medio (Ogas et al, 1997). Sin embargo *LEC1* se expresa en las raíces de estos mutantes y no en los tipos nativos. (Ogas et al, 1999). Estos resultados sugieren que *LEC1* es reprimido por PKL en la post embriogénesis, dicha represión no seda en los mutantes *pkl*. SE sugiere que *LEC2* podría también ser inhibido por PKL luego de la embriogénesis de la misma manera que lo hace con *LEC1*. La expresión *LEC1* y *LEC2* son suficientes para la inducción de la embriogénesis somática. Ya no renecesita inducir por hormonas el tejido somático para que se de la competencia a estas células. Lo que nos da a entender que los genes *LEC1* y *LEC2* son factores de transcripción que avivan los genes responsables de la iniciación de la embriogénesis somática.

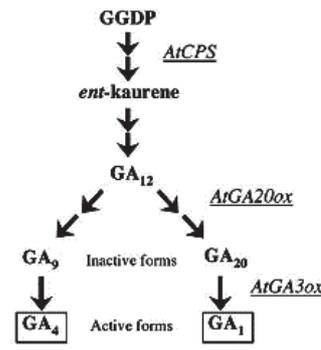
#### ACCIÓN DE LOS GENES ANTERIORMENTE VISTOS EN EL GEN *ATGA3OX2*:

*FUS3* y *LEC2* están envueltos en la regulación de la embriogénesis de plantas superiores. Según análisis bioquímicos y moleculares en la biosíntesis de GA es activada erróneamente en los mutantes *lec2* y *fus3* con respecto al tipo silvestre (Curaba et al., 2004).

Ogawa et al (2003) determino que no solo existía un tipo de GA activo: GA1, sino que existía otro: GA4 que incluso presenta mas actividad que GA1 hasta ahora estudiado durante la germinación.

Se observo también que las proporciones entre GA1 y GA4 difieren en la embriogénesis con respecto a la germinación y los tejidos vegetativos, presentándose una proporción de 10:1 en la primera, y de 1:10 en los dos otros estados (Talon et Al., 1990; Xu et al., 1999)

Como podemos observar en la figura, GA4 y GA1 siguen diferentes rutas alternas para la formación de GA. No se conoce aun que es lo que determina si se va a seguir una u otra vía, pero los datos de Curaba et al., (2004) sugiere que esta activación se da en algún punto entre el desarrollo tardío de la semilla y la germinación.



Plant physiol. Vol 136(2004)

Metabolismo predominante de la formación de GA en *A. thaliana*

Se observaron niveles elevados de GA1 en los mutantes *lec1-2* mientras que los niveles de GA4 se elevaron en los mutantes *fus3-8*. Como esta dos formas de GA solo difieren por una 13b-hidroxilación, la hipótesis mas sencilla para explicar esta observación es que las 13 b-hidroxilasa es codificada por un gen desconocido que es regulado de manera diferente por las vías de *LEC2* y *FUS3* (Curaba et al., 2004).

Se ve siempre la germinación prematura como un desajuste temporal en la germinación. Los datos de Curaba et al. (2004) nos muestran que esto no es cierto para los genes biosintéticos de GA. En los tipos nativos, los genes de la biosíntesis de GA son expresados, mientras que los catabólicos de Ga no lo son (Ogawa et al., 2003). Podemos contrastar estos resultados con las o la afectación de la expresión del gen *AtGA3ox2* en los mutantes *lec2* y *fus3*, y observamos también que *AtGA20ox3* desactiva enzimas responsables del catabolismo de GA bioactivo (Thomas et al 1999) y que es fuertemente inducida en semillas mutantes *lec2* y *fus3*.

Sabemos también que la germinación prematura de *lec1* es independiente de GA (Raz et al., 2001). Como el metabolismo de GA esta implicado, esto sugiere que la germinación prematura y la germinación son diferentes, y que los genes *LEC2* y *FUS3* actúan específicamente en los genes *AtGA3ox2* (Curaba et al., 2004)

Se observo un alta interacción sinérgica entre los genes *LEC* y los *ABI*, especialmente con respecto a la respuesta a ABA durante la germinación (Baumlein et a., 1994; Parcy et al., 1994; Meinke et al., 1994; West et al., 1994; Parcy et al.,

1997; Namara et al., 2000; Brocard-Gifford et al., 2003). Este estudio sugiere fuertemente que este sinergismo es debido a la disrupción del balance GA/ABA durante la embriogénesis: siendo el metabolismo de GA controlado por los genes LEC y el de ABA por los ABI.

Los genes PICKLE, PKL, fueron propuestos como componentes del de activador que modula GA durante el desarrollo de la germinación que previene la re-expresión del estado de desarrollo embrionario. (Ogas et al., 1999; Dean Rider et al., 2003) así un mutante *pkl* retiene características de tejido embrionario en los meristemos de raíz de una manera muy incrementada cuando se somete a dicho embrión a bajas concentraciones de inhibidores de GAs. Esta expresión de diferenciación aberrante es compensada con la incorporación de GA exógeno. (Ogas et al., 1997). PKL expresa un factor de remodelación de cromatina necesario para la represión de LEC1, LEC2 y FUS3 (Ogas et al., 1997; Dean Rider et al., 2003). Los estudios de Curaba et al (2004) sugieren que los niveles menores de GAs con respecto a los tipos nativos se deben a la represión incrementada de la biosíntesis de GA por los genes LEC.

### **Regulación de la expresión del gen AtGA3ox2 por FUS3**

En *fus3-8* y *lec1-2* no hay represión de este gen. La no represión en el mutante *lec2* puede ser consecuencia de una baja regulación de FUS3 (Kroj et al., 2003). También podemos suponer que la represión del gen *AtGA3ox2* es una acción primaria del gen FUS3. los datos de Curaba et al., (2004) muestran que esta acción es directa ya que la proteína FUS3 se une específicamente al elemento RY presente en el promotor de dicho gen. Pero no podemos dejar de lado que LEC2 y FUS3 juntos son necesarios para la represión de este gen. En ambos casos este gen *AtGA3ox2* es el primer gen blanco de una proteína de dominio B3 descrito hasta ahora, aunque se han descrito varios genes que son luego regulados por los genes ABI y FUS3 (Namara et al., 2000). Lo que intrigante es que este gen no sea reprimido en células epidérmicas del embrión del mutante *fus3*. este gen tampoco se expresa en la epidermis durante la germina-

ción, pero si en el cortex y el endodermos (Yamaguchi et al., 2001). Es posible que existe algún tipo de regulación tipo cis durante la embriogénesis y la germinación. Se ha demostrado recientemente que los genes FUS3 se expresan específicamente en las células epidérmicas del embrión donde reprime la expresión de TTG1 (Tsuchiya et al., 2004). Además la expresión del gen FUS3 bajo el control del promotor específico de la epidermis *AtML1* es suficiente para reprimir el fenotipo del mutante *fus3*. (Tsuchiya et al., 2004).

Sería interesante colocar al gen *AtGA3ox2* bajo el control del promotor *AtML1* para determinar en cuanto la biosíntesis de GA participa en el genotipo *fus3*.

Las rutas metabólicas de LEC2 y FUS3 reprimen la expresión de *AtGA3ox2* durante la embriogénesis. (Curaba et al., 2004)

Por más que trabajos anteriores hayan mostrado que GA es importante durante la embriogénesis (Singh et al., 2002) este estudio (Curaba et al., 2004) muestra que las plantas necesitan regular negativamente la biosíntesis de GA en los embriones.

El afinamiento de la regulación de la biosíntesis de GA parece envolver mecanismos cruzados entre otras fitohormonas tales como ABA, etileno o auxinas que también tienen un rol importante en la embriogénesis. (Curaba et al., 2004)

Se necesitan más estudios para entender el mecanismo molecular exacto utilizado en este complejo tramado de señales que se da durante la embriogénesis. (Curaba et al., 2004).

### **El gen *C-ESE1***

El gen *C-ESE1* (Carrot Early somatic Embryogenesis 1) en zanahoria es expresado en la etapa inicial de embriogénesis somática. *C-ESE1* codifica una proteína con los dominios aglutinina y S-locus-glicoproteína y su expresión es específica en células primordiales del embrión somático. Las células transgénicas de zanahoria con expresión reducida de *C-ESE1* poseen un amplio espacio intercelular y un bajo nivel de polisacáridos en la superficie celular y un desarrollo retardado de la embriogénesis somática. Se deduce que este gen es responsable para la

morfología necesaria durante el desarrollo embrionario.

#### El gen TAN

La mutación de *tanmei/emb2757 (tan)* en *Arabidopsis thaliana* causa defectos en el desarrollo del embrión y de la semilla. Los embriones mutantes *tan* al igual que los mutantes *lec* (*leafy cotyledon*) acumulan antocianina, son intolerantes a la desecación, forman tricomas en los cotiledones y poseen una reducida acumulación de proteínas y lípidos de reserva. El gen *tan* funciona en las fases temprana y tardía del desarrollo embrionario y actúa en forma conjunta con el gen *lec* los cuales se solapan durante la embriogénesis. El producto del gen *tan* tiene 7 motivos WD que se repiten lo que sugiere que puede interactuar con otras proteínas como controladores durante el desarrollo del embrión.

#### Genes ABI5 y EEL

Estos genes codifican los factores de transcripción homólogos ABI5 y EEL funcionan antagónicamente para regular la expresión génica durante la embriogénesis tardía.

El desarrollo de una semilla implica dos fases: en la primera se da la división celular y la morfogénesis de la planta, en la segunda fase, llamada maduración, el embrión acumula sustancias de reserva, adquiere dormancia y tolerancia a la desecación. (Wobus and Weber, 1999).

En *Arabidopsis* existen genes de clase MAT y de clase LEA. Los primeros incluyen genes que codifican proteínas de reserva tales como globulinas 2S y 12S (Pang et al., 1988; Guerche et al., 1990). Los de clase LEA, abundantes en la embriogénesis tardía, codifican proteínas LEA implicadas en la tolerancia a la desecación (Hoekstra et al., 2001). Además la fitohormona ABA se acumula durante la maduración de la semilla y regula positivamente la expresión de genes de las dos clases (Koornneef et al., 1989; Parcy et al., 1994; Phillips et al., 1997).

Entre los factores de transcripción que regulan la expresión de genes durante la maduración se encuentra el gen *ABI3* insensible al ABA.

En semillas mutantes *abi3*, la expresión de los genes de clase MAT y LEA es reducida

comparada con las de tipo silvestre (Parcy et al., 1994; Nambara et al., 1995, 2000).

*ABI3* no se puede unir por si solo al promotor de sus genes blanco.

Un ortólogo de *ABI3* en el arroz, OsVP1, interactúa con TRAB1 que es un factor de transcripción tipo cremallera de leucina (bZIP) que se une al elemento de respuesta para ABA (ABRE), CACGTG, que esta presente en el promotor de los genes LEA (Hobo et al., 1999).

En *Arabidopsis* *ABI5* cumple un papel igual al de TRAB1 y permite la regulación de los genes LEA dependientes de *ABI3*.

La mutación *abi5* produce una reducción en la sensibilidad a ABA durante la germinación y decrece la expresión de algunos genes LEA como *AtEm1* y *AtEm6* durante la maduración de la semilla (Finkelstein, 1993, 1994; Gaubier et al., 1993).

Finkelstein y Nakamura establecieron por separado que *ABI5* posee estructura de cremallera de leucina (bZIP) y que interactúa con *ABI3*. Por tanto, la acción de *ABI3* sobre los ABREs presentes en los promotores de los genes LEA esta mediada por las proteínas bZIP.

Los mutantes *abi3* son muchos más perceptibles que las de *abi5* ya que según Delseny et al., 2001. la acumulación de los RNAm de genes LEA como *AtEm1* y *AtEm6* es nula en *abi3* pero solo parcialmente reducida en *abi5*. Esto nos dice que *ABI5* contribuye solo en algunos casos de los diferentes roles que *ABI3* cumple durante la maduración de la semilla. Se ha aislado y caracterizado el factor de transcripción EEL, que es homólogo a *ABI5* y posee estructura de cremallera de leucina (bZIP) pero difieren en ciertas estructuras que los hacen diferentes.

A diferencia del mutante *abi5*, los mutantes *eel* no inhiben la expresión de los genes de maduración observados y por el contrario se acrecentó las concentraciones de los mRNAs de *AtEm1* y de *AtEm6*. Estudios sobre estos comportamientos concluyeron que *ABI5* y EEL compiten por los mismos lugares de unión con el promotor para *AtEm1*.

La expresión de los genes *AtEm* están regulados positivamente por *ABI5* y negativamente por EEL.

Esto se deduce de la competencia por lugares de unión en los cuales el activador positivo de la transcripción de *AtEm1*, *ABI5*,



Esto nos hace pensar que dicho amino ácido es muy importante en el proceso de embriogénesis.

Dicho amino ácido proviene del ciclo de la ornitina o de la urea. Uno de sus puntos de control mas importantes esta dado a nivel de la enzima **N- acetyl glutamato Kinasa** cuya acción se describe en la siguiente ruta: (enzima #2)

Esta enzima presenta control tipo feedback, inhibiéndose por su producto final: arginina.

Esta enzima solo ha sido purificada y caracterizada en algunos organismos unicelulares, teniéndose reportes de su estructura 3D en *E. coli*. En arveja (*Pisum sativum*) ya se ha logrado aislar y caracterizar; y en arroz hay reportes que se activa dentro del cloroplasto al unirse sensible al aumento de nitrógeno PII.

En este reporte (Lohmeier et al., (2005) se ha estudiado principalmente su actividad durante la embriogénesis, presentándose un pico en el estadio de torpedo. Esto nos hace pensar que la inhibición por producto final se desactivara en este punto, llegando a una actividad muy alta, por mas que la concentración de arginina aumenta también.

En células no embrionicas la actividad de esta enzima existe pero es muy baja, y en células proembrionicas es un poco más elevada.

Podemos llegar a la conclusión, que lo que inhabilita el retrocontrol de esta enzima por producto final es el alto requerimiento de arginina durante este proceso. Al tener una alta replicación celular, este amino ácido es utilizado inmediatamente para la síntesis de proteínas, y no llega a inhibir la NAGK, siento esta enzima muy importante para los requerimientos de la célula en compuestos nitrogenados.

#### LITERATURA CITADA

- A. TAHIRI-ALAOUD, E. Dumas, S. Gianinazzi (1990) Detection of PR-b proteins in tobacco roots infected with *Chalara elegans*, *Plant Mol.Biol.* 14 869-871.
- BAUMLEIN H, MISERA S, LUERSSSEN H, KOLLE K, HORSTMANN C, WOBUS U, MULLER AJ (1994) The FUS3 gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embriogénesis. *Plant J* 6: 379-387
- BROCARD-GRIFFORD IM, Lynch TJ, Finkelstein RR (2003) Regulatory networks in seeds integrating developmental abscisic acid, sugar, and light signaling. *Plant Physiol.* 131: 78-92
- CAPELLI N, DIOGON T, Greppin H, Simon P (1997) Isolation and characterization of cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 191: 51-56
- CHEN R, WNAG F, SMITH A.G (1996) A flower-specific gene encoding an osmotin-like protein from *Lycopersicon esculentum*. *Gene* 179: 301-302
- CURABA J, MORITZ T, Blervaque R, Parcy F, Raz V, Herzog M, Vachon G (2004) AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive Gibberellin biosynthesis, is regulated during embriogenesis by LEAFY COTYLEDON2 and FUSCA3 in *Arabidopsis*. *Plant physiol* 136: 3660-3669
- D. W. MEINKE, L. H. Franzmann, T. C. Nickle and E. C. Yeung. Leafy Cotyledon Mutants of *Arabidopsis* (1994) *The Plant Cell*, Vol 6, Issue 8 1049-1064.
- ELLEN W. HARDING, Weining Tang, Karl W. Nichols2, Donna E. Fernandez, and Sharyn E. Perry (October 2003) Expression and Maintenance of Embryogenic Potential Is Enhanced through Constitutive Expression of *AGAMOUS-Like 15*. *Plant Physiology*, Vol. 133, pp. 653-663.
- DEAN RIDER JR, HENDERSON JT, Jerome RE, Edenberg HJ, Romero-severson J, Ogas J (2003) Coordinate repression of regulators of embriogenic identity by PIKLE during germination in *Arabidopsis*. *Plant J* 35: 33-43
- GIRAUDAT, J., HAUGE, B. M., VALON, C., SMALLE, J PARCY,F. & GOODMAN, H.M. (1992) *Plant cell* 4, 1251-1261
- H. SASSA, H. HIRANO (1998) Style-specific and developmentally regulated accumulation of a glycosylated thaumatin/PR5-like protein in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.), *Planta* 205, 514-521.

- HUANG W, CUI X, TIAN Y, PENG X (1994) Cloning of T7 Lysozyme gene and construction of the vector for transgenic plants resistant to bacterial infection.
- WEI SHENG WU HSUEH PAO 34: 261-265
- KAZUTOSHI YAMAGISHI, NORIKO Nagata, Kelly Matsudaira Yee, Siobhan A. Braybrook, Julie Pelletier, Shozo Fujioka, Shigeo Yoshida, Robert L. Fischer, Robert B. Goldberg and John J. Harada (September 2005) *TANMEI/EMB2757* Encodes a WD Repeat Protein Required for Embryo Development in Arabidopsis. *Plant Physiology*. Vol. 139, pp. 163-173.
- KIMINORI TAKAHATA, MIYUKI TAKEUCHI, Minoru Fujita, Junichi Azuma, Hiroshi Kamada and Fumihiko Sato (2004) Isolation of Putative Glycoprotein Gene from Early Somatic Embryo of Carrot and its Possible Involvement in Somatic Embryo Development. *Plant and Cell Physiology* 45(11):1658-1668.
- KROJ T, SAVINO G, VALON C, Giraudat J, Parcy F (2003) Regulation of storage protein gene expression in Arabidopsis. *Development* 130: 6065-6073
- LIN X, HUANG G.J.H, ZIMMERMAN J.L (1996) Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. *Plant physiol.* 112: 1365-1374
- LOTAN, T., OHTO, M., MATSUDAIRA Yee, K., West, M. A. L., Lo, R., KWONG, R. W., YAMAGISHI, K., FISCHER, R. L., Goldberg, R. B. & Harada, J. J. (1998) *Cell* 93, 1195-1205.
- LUERBEN, H., KIRIK, V., HERRMANN, P. & MISERA, S. (1998) *Plant J.* 15, 755-764.
- LOHMEIER-VOGEL E M, LOUKANINA N, Ferrar T S, Moorhead G B.G, Thorpe T.A, (2005). N-acetyl glutamate kinase from *daucus carota* suspension cultures: embryogenic expression profile, purification and characterization
- MCCARTY, D. R., HATTORI, T., CARSON, C. B., Vasil, V., Lazar, M. & Vasil, I. K. (1991) *Cell* 66, 895-906.
- MEINKE, DW (1992) A homeotic mutant of Arabidopsis thaliana with leafy cotyledons. *Science* 258: 1647-1650
- MEINKE, D. W., FRANZMANN, L. H., Nickle, T. C. & Yeung, E. C. (1994) *Plant Cell* 6, 1049-1064.
- N. CAPELLI, T. DIOGON, H. GREPPIN, P. SIMON (1997) Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an osmotin-like protein from *Arabidopsis thaliana*, *Gene* 191 51-56.
- NAMBARA E, HAYAMA R, NISHIMURA M, KAWAIDE H, KAMIYA Y, NAITO S (2000) the role of ABI3 and FUS3 loci in Arabidopsis thaliana on phase transition from late embryo development to germination. *Dev. Biol.* 220: 412-423
- OGAS J, CHENG JC Sung ZR Somerville C (1997) Cellular differentiation regulated by gibberellin in the Arabidopsis thaliana pickle mutant. *Science* 227: 91-94
- OGAS, J., CHENG, J.-C., SUNG, Z. R. & Somerville, C. (1997) *Science* 277, 91-94
- OGAS J, KAUFMANN S, HENDERSON J, Somerville C (1999) PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulate the transition from embryonic to vegetative development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13839-13844
- OGAS, J., KAUFMANN, S., Henderson, J. & Somerville, C. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 13839-13844.
- OGAWA M, HANADA A, YAMAUCHI Y, Kuwahara A, Kamiya Y, Yamaguchi S (2003) Gibberellin biosynthesis and response during Arabidopsis seed germination. *Plant cell* 15: 1591-1604
- PARCY F, VALON C, KOHARA A, Misera S, Giraudat J (1997) The ABSICIC ACID-INSENSITIVE3, FUSCA3 and LEAFY COTYLEDON1 loci act in concert to control multiple aspects of Arabidopsis seed development. *Plant cell* 9: 1265-1277
- R. CHEN, F. WANG, A.G. SMITH (1996) A flower-specific gene encoding an osmotin-like protein from *Lycopersicon esculentum*, *Gene* 179, 301-302.

- REIDT, W., WOHLFARTH, T., Ellerstroem, M., Czihal, A., Tewes, A., Ezcurra, I., Rask, L. & Baumlein, H. (2000) *Plant J.* 21, 401–408.
- RAZ V, BERGERVOET JH, Koornneef M (2001) Sequential steps for developmental arrest in Arabidopsis seeds. *Development* 128: 243-252
- SASSA H, HIRANO H (1998) Style-specific and developmentally regulated accumulation of glycosylated thaumatin/PR5-like protein in Japanese pear (*Pyrus serotina* Rehd.). *Planta* 205: 514-521
- SINGH DP, JERMAKOW AM, Swain SM (2002) Gibberellins are required for seed development and pollen tube growth in Arabidopsis. *Plant cell* 14: 3133-3147
- SANDRA BENSMIHEN, SONIA RIPPA, Guillaume Lambert, Delphine Jublot, Véronique Pautot, Fabienne Granier, Jérôme Giraudat, and François Parcy. (June 2002) The Homologous ABI5 and EEL Transcription Factors Function Antagonistically to Fine-Tune Gene Expression during Late Embryogenesis. *The Plant Cell*, Vol. 14, 1391–1403.
- Science (1 July 2005) How does a single somatic cell become a whole plant. Published by AAAS.
- Sharyn E. Perry<sup>2</sup>, Melissa D. Lehti, and Donna E. Fernandez (May 1999) The MADS-Domain Protein AGAMOUS-Like 15 Accumulates in Embryonic Tissues with Diverse Origins. *Plant Physiology*, Vol. 120, pp. 121–129.
- Stone S, Kwong L, Matsudaira Y, Pelletier J, Lepiniec L, Fisher R, Goldberg R, Harada JJ (2001) LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Plant Biol* 98: 11806-11811
- TAKUMA S, MAMORU NISHIMOTO, WATARU Saburi, Atsuo Kimura, Hiroshi Yasuda, Masahiro Uchibatake, Takuji Ohwada, Hiroshi Masuda (2004) Isolation and Characterization of cDNA encoding P-19.5 protein accumulated preferentially at early stage of carrot somatic embryogenesis. *Plant science* 167: 1211-1217
- TALON M, KOORNEEF M, Zeevaart JAD (1990) Endogenous gibberellins in Arabidopsis thaliana and possible steps blocked in the biosynthetic pathway of semidwarf ga2 and ga5 mutants. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7983-7987
- TAHIRI-ALAOUI A, DUMAS E, Gianinazzi S (1990) Detection of PR-protein in tobacco roots infected with *Chalara elegans*. *Plant Mol. Biol.* 14: 869-871
- THOMAS SG, PHILLIPS AL, Hedden P (1999) Molecular cloning and functional expression of gibberellin 2-oxidases, multifunctional enzymes involved in gibberellin deactivation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4398-4703
- TSUCHIYA Y, NAMBARA E, Naito S, McCourt P (2004) The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in Arabidopsis. *Plant J* 37: 73-81
- ULMASOV, T., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1997) *Science* 276, 1865- 1868.
- W. HUANG, X. CUI, Y. Tian, M. Lin, X. Peng (1994) Cloning of T7 lysozyme gene and construction of the vector for transgenic plants resistant to bacterial infection, Wei Sheng Wu Hsueh Pao. 34 261–265.
- WEST M, HARADA JJ (1993) Embryogenesis in higher plants: an overview. *Plant Cell* 5: 1361-1369
- WEST, M. A. L., Matsudaira Yee, K., Danao, J., Zimmerman, J. L., Fischer, R. L., Goldberg, R. B. & Harada, J. J. (1994) *Plant Cell* 6, 1731–1745.
- XU Y-L, LI L, Gage D, Zeevaart J (1999) Feedback regulation of GA5 expression and metabolic engineering of gibberellin levels in Arabidopsis. *Plant Cell* 11: 927-936
- YAMAGUCHI S, KAMIYA Y, Sun T (2001) Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during Arabidopsis seeds. *Plant Cell* 10: 2115-2126
- YASUDA H, NAKAJIMA M, Ito T, Ohwada T, Masuda H (2000) Partial characterization of genes whose transcripts accumulate preferentially in cell cluster at the earlier stage of carrot somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.* 45: 705-712