



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Establecimiento de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. y *Persea americana* Mill. cv. Hass

Tesis que presenta:

CENTEOTL ARAGÓN RODRÍGUEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Bioquímica y Biología Molecular)

Mérida, Yucatán, México

2020

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 de **Centeotl Aragón Rodríguez** titulado **Establecimiento de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. y *Persea americana* Mill. cv. Hass** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas**, dentro de la **opción de Bioquímica y Biología Molecular**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.

Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, 2 de diciembre de 2020.

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 de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: 
Centeotl Aragón Rodríguez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte de los proyectos titulados “Estrategias multidisciplinarias para incrementar el valor de las cadenas productivas de café, frijol, mango, agave mezcalero y productos acuícolas (tilapia) en la región Pacífico Sur a través de la ciencia, la tecnología y la innovación”, número 292474 y “Generación de estrategias científico-tecnológicas con un enfoque multidisciplinario e interinstitucional para afrontar la amenaza que representan los complejos ambientales en los sectores agrícolas y forestales de México”, número 292399, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca otorgada (número 924389) y el financiamiento a los proyectos 292474 y 292399.

Al CICY por darme la oportunidad de seguir preparándome y permitirme desarrollar mi trabajo experimental en la Unidad de Bioquímica y Biología molecular de plantas.

A mi director de tesis, el Dr. Víctor Manuel Loyola, por aceptarme en su equipo de trabajo. Por su paciencia y compromiso. Por enseñarnos a tener un pensamiento crítico e inculcarnos el valor de la lectura. Por motivarnos a ser mejores profesionales y personas a través de su amor por la ciencia y la docencia.

A la M. C. Rosa María Galaz Ávalos por enseñarme métodos y técnicas del área de cultivo de tejidos que quería aprender desde hace tiempo. Por su apoyo dentro y fuera del laboratorio. Por su gran paciencia y por hacerme sentir en casa.

A mi comité tutorial, el Dr. Neftalí Ochoa Alejo, la Dra. Nancy Santana Buzzy y el Dr. Geovanny Nic Can, por todas sus sugerencias y apoyo para el desarrollo de este trabajo.

Al INECOL, A.C. por haberme proporcionado el material vegetal para la realización de las suspensiones celulares de aguacate.

A la M.C. Cleyre Ariana Pérez Hernández y al M.C. Randy Avilés Montalvo por haberme apoyado con el material vegetal para el establecimiento de las suspensiones celulares de cafeto.

Al Dr. Víctor Manuel Aguilar Hernández y la M.C. Ligia Brito Argáez por sus sugerencias y disposición para apoyarme en todo momento.

A la Dra. Fátima Duarte Aké por darme claridad al inicio de mi tesis, por sus consejos y charlas.

Al Dr. Daniel Guzmán Zapata por ser un gran maestro. Por toda su paciencia y disponibilidad para apoyarme a resolver dudas, por su alegría y motivación.

A mis compañeros del laboratorio 24 por todo el apoyo, tanto técnico como personal. Por generar un ambiente agradable de confianza, cordialidad y respeto.

DEDICATORIAS

A mi familia y amigos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES	3
1.1 CAFETO (<i>Coffea arabica</i> L.).....	3
1.1.1 Botánica y taxonomía	3
1.1.2 Importancia económica.....	3
1.1.3 Problemática	4
1.2 AGUACATE (<i>Persea americana</i> Mill.)	5
1.2.1 Botánica y taxonomía	5
1.2.2 Importancia económica.....	5
1.2.3 Problemática	6
1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	6
1.3.1 Factores involucrados en la embriogénesis somática	8
1.3.2 Embriogénesis somática en café.....	9
1.3.3 Embriogénesis somática en el aguacate.....	10
1.4 CULTIVO DE SUSPENSIONES CELULARES	11
1.4.1 Cultivo de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	13
1.4.2 Cultivo de suspensiones celulares de <i>P. americana</i>	14
1.5 COMPUESTOS SECRETADOS AL MEDIO DE CULTIVO	15
1.5.1 Proteínas extracelulares	17

1.6 JUSTIFICACIÓN	24
1.7 OBJETIVO GENERAL	24
1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	25
CAPÍTULO II	26
ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE CAFETO Y AGUACATE	26
2.1 INTRODUCCIÓN.....	26
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	27
2.2.1 Establecimiento de las suspensiones celulares de caféto	27
2.2.2 Establecimiento de las suspensiones celulares de aguacate.....	27
2.2.3 Prueba del efecto del inóculo en el crecimiento de las suspensiones celulares	27
2.2.3.1 Peso fresco y peso seco	28
2.2.3.2 Conductividad eléctrica y pH.....	28
2.2.3.3 Parámetros de crecimiento.....	28
2.2.4 Caracterización de las suspensiones celulares.....	28
2.2.4.1 Paquete celular.....	29
2.2.4.2 Peso fresco y peso seco	29
2.2.4.3 Conductividad eléctrica y pH.....	29
2.2.4.4 Viabilidad.....	30
2.2.5 Inducción de la embriogénesis somática en caféto	30

2.2.6 Inducción de la embriogénesis somática en aguacate.....	30
2.3 RESULTADOS.....	31
2.3.1 Establecimiento de las suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	31
2.3.2 Prueba de inóculo en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	31
2.3.2.1 Determinación de los pesos fresco y seco.....	33
2.3.2.2 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo.....	34
2.3.3 Caracterización de las suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	35
2.3.3.1 Peso fresco y peso seco.....	36
2.3.3.2 Paquete celular y viabilidad.....	36
2.3.3.3 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo.....	37
2.3.4 Inducción de la embriogénesis somática en <i>C. arabica</i>	38
2.3.5 Establecimiento de suspensiones celulares de <i>P. americana</i>	39
2.3.6 Prueba de inóculo en suspensiones celulares de <i>P. americana</i>	45
2.3.6.1 Peso fresco y peso seco.....	46
2.3.6.2 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo.....	48
2.3.7 Caracterización de las suspensiones celulares de <i>P. americana</i>	49
2.3.7.1 Pesos fresco y seco.....	49
2.3.7.2 Paquete celular y viabilidad.....	50
2.3.7.3 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo.....	50
2.3.8 Inducción a la embriogénesis somática en <i>P. americana</i>	51
2.4 DISCUSIÓN.....	53

CAPÍTULO III	59
3 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	59
3.1 CONCLUSIONES	59
3.2. PERSPECTIVAS	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	72

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Embriogénesis somática	8
Figura 1.2 Curva de crecimiento modelo	12
Figura 1.3 Diagrama general de la estrategia experimental	25
Figura 2.1 Establecimiento de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i>	31
Figura 2.2 Ciclo de cultivo de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> con tres tamaños de inóculo	33
Figura 2.3 Conductividad eléctrica y pH de suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> con tres tamaños de inóculo	35
Figura 2.4 Ciclo de cultivo con base al peso fresco y peso seco en SC de <i>C. arabica</i>	37
Figura 2.5 Ciclo de cultivo con base al volumen del paquete celular y viabilidad en SC de <i>C. arabica</i>	38
Figura 2.6 Resultados de la prueba de conductividad eléctrica y pH en suspensiones celulares de <i>C. arabica</i> evaluadas durante 40 días	38
Figura 2.7 Establecimiento de suspensiones celulares de <i>P. americana</i>	40
Figura 2.8 Prueba de inóculo en SC de aguacate ‘Hass’ embriogénico	41
Figura 2.9 Prueba de inóculo en SC de aguacate ‘Hass’ no embriogénico	41
Figura 2.10 Evaluación del crecimiento de suspensiones celulares ‘Hass’ no embriogénicas en tres medios de cultivo	44
Figura 2.11 Evaluación del pH y CE en SC de aguacate ‘Hass’ no embriogénicas en tres medios de cultivo	44

Figura 2.12 Ciclo de cultivo de SC de aguacate ‘Hass’ con tres tamaños de inóculo	47
Figura 2.13 Resultados de la prueba de conductividad eléctrica y pH en suspensiones celulares de <i>P. americana</i> ‘Hass’ evaluadas durante 53 días.....	48
Figura 2.14 Ciclo de cultivo en suspensiones celulares de <i>P. americana</i> ‘Hass’ no embriogénicas	50
Figura 2.15 Resultados de la evaluación del volumen del paquete celular y viabilidad en suspensiones celulares de <i>P. americana</i> ‘Hass’ no embriogénicas	51
Figura 2.16 Resultados de la evaluación de conductividad eléctrica y pH en suspensiones celulares de <i>P. americana</i> ‘Hass’ no embriogénicas	51

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 1.1 Estudios proteómicos en suspensions celulares embriogénicas y no embriogénicas de plantas	19
Cuadro 1.2 Proteínas secretadas al medio de cultivo en suspensiones celulares de plantas en condiciones embriogénicas y no embriogénicas	22
Cuadro 2.1 Crecimiento de SC de <i>C. arabica</i> con tres tamaños de inóculo durante un ciclo de 43 días	32
Cuadro 2.2 Parámetros de crecimiento para la prueba de PF de SC de caféto	34
Cuadro 2.3 Parámetros de crecimiento para la prueba de PS de SC de caféto	34
Cuadro 2.4 Crecimiento de SC de <i>C. arabica</i> inoculadas con 200 mg de células durante un ciclo de cultivo de 40 días	36
Cuadro 2.5 Crecimiento de SC de <i>P. americana</i> en tres medios de cultivo durante un ciclo de 41 días	42
Cuadro 2.6 Parámetros de crecimiento para la prueba PF en tres medios de cultivo para SC de aguacate ‘Hass’	45
Cuadro 2.7 Parámetros de crecimiento para la prueba PS en tres medios de cultivo para SC de aguacate ‘Hass’	45
Cuadro 2.8 Crecimiento de SC de <i>P. americana</i> con tres tamaños de inóculo durante un ciclo de 53 días	46
Cuadro 2.9 Parámetros de crecimiento para la prueba PF con tres tamaños de inóculo de cultivo en SC de aguacate ‘Hass’	47

Cuadro 2.10 Parámetros de crecimiento para la prueba PS en tres medios de cultivo de SC de aguacate ‘Hass’	47
Cuadro 2.11 Crecimiento de SC de <i>P.americana</i> ‘Hass’ inoculadas con 450 mg de células durante un ciclo de cultivo de 33 días	49
Cuadro A.1 Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y proceso de inducción de la ES en SC de <i>C. arabica</i>	72
Cuadro A.2 Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y proceso de inducción de la ES en SC en <i>P. americana</i>	73

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2D	Segunda dimensión
AGPs	Arabinogalactoproteínas
ANA	Ácido naftalenacético
BA	Benciladenina
CE	Conductividad eléctrica
DTT	Ditiotreitol
ES	Embriogénesis somática
Kin	Cinetina
MA	Medio de mantenimiento de café
MI	Medio de inducción
MM	Masa molar
MMSE	Medio de inducción de mango
MSP	Medio de mantenimiento de aguacate
MPA	Medio de pre-acondicionamiento
NE	No embriogénico
PEM	Masa proembriogénica
PF	Peso fresco
pH	Potencial de hidrógeno
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PS	Peso seco
SC	Suspensiones celulares
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SE	Embriones somáticos
TCA	Ácido tricloroacético
VPC	Volumen del paquete celular

RESUMEN

Las suspensiones celulares son una herramienta muy valiosa para la realización de estudios bioquímicos y moleculares relacionados con la embriogénesis somática, el proteoma extracelular y muchos otros estudios. Se ha demostrado que diversas especies vegetales secretan proteínas al medio de cultivo durante la inducción de la embriogénesis somática, las cuales podrían servir como marcadores tempranos de dicho proceso. En este proyecto se establecieron líneas de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. y *Persea americana* Mill. cv. Hass a partir de callos friables en diferentes medios de cultivo. Se evaluaron tres tamaños de inóculo. El crecimiento se caracterizó con base en el peso fresco, el peso seco, y el volumen del paquete de células y también se determinó la viabilidad; adicionalmente, se evaluaron la conductividad eléctrica y el pH del medio de cultivo. El cultivo de las suspensiones de células de café se evaluó en medio MS suplementado con 3.9 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina durante 40 días. El índice de crecimiento fue de 4.81 y el tiempo de duplicación fue de 3.9 días. Los cultivos de aguacate se iniciaron en medio MS suplementado con picloram (MSP) 0.41 μM . Su crecimiento se redujo y tuvo un índice de crecimiento de 0.45 y un tiempo de duplicación de 13.17 días. Posteriormente, se transfirieron a un medio con los macronutrientes del medio B₅ y los micronutrientes del medio MS y las vitaminas del medio MS, suplementado con 1.9 μM de 2,4-D, 2.74 μM de glutamina y 100 mL de agua de coco (MMSE). El índice de crecimiento fue de 1.3 y el tiempo de duplicación fue de 5.82 días. La capacidad embriogénica de las suspensiones celulares de aguacate se recuperó con el uso de este último medio. Las suspensiones celulares establecidas y caracterizadas como parte de este trabajo servirán como fuente de material biológico para futuras investigaciones relacionadas con el estudio de las proteínas secretadas al medio de cultivo en condiciones embriogénicas y no embriogénicas.

ABSTRACT

Cell suspensions are a valuable tool for carrying out biochemical and molecular studies related to somatic embryogenesis and the extracellular proteome. It has been shown that various species secrete proteins into the culture medium during the induction of somatic embryogenesis, which could serve as early markers of this process. In this project, cell suspension lines of *Coffea arabica* L. and *Persea americana* Mill. cv. Hass from a friable callus in different culture media were established. Three inoculum sizes were evaluated. Growth was characterized by fresh weight, dry weight, cell pack volume, and viability; Electrical conductivity and pH were also evaluated in the culture medium. The culture of the coffee cell suspensions was evaluated in MS medium supplemented with 3.9 μM of 2,4-D and 9.3 μM of kinetin for 40 days. The growth index was 4.81, and the doubling time was 3.9 days. The avocado cultures were started in MS medium supplemented with 0.41 μM picloram (MSP). Its growth was reduced with a growth index of 0.45 and a doubling time of 13.17 days. Subsequently, they were transferred to a medium with the macronutrients' salts from the B₅ medium, and the micronutrients' salts and vitamins from the MS medium supplemented with 1.9 μM of 2,4-D, 2.74 μM of glutamine, and 100 mL of coconut water (MMSE). The growth index was 1.3, and the doubling time was 5.82 days. The embryogenic capacity of the avocado cell suspensions was recovered with the use of the latter medium. The cell suspensions established and characterized as part of this work will serve as sources of biological material for future research related to the study of the proteins secreted into the culture medium under embryogenic and non-embryogenic conditions.

INTRODUCCIÓN

El café es el cultivo comercial, por su valor de mercado, más importante a nivel internacional. Desempeña un papel crucial en la economía nacional, al igual que el cultivo de aguacate. Sin embargo, la producción de ambos cultivos se ha visto amenazada tanto por factores bióticos como abióticos. El cultivo de tejidos, a través de la embriogénesis somática (ES), representa una alternativa potencial para el manejo de dicha problemática.

La ES es un proceso de diferenciación celular por el cual una célula somática cambia su programa genético y se convierte en una célula embrionaria. Algunas especies leñosas como el café y el aguacate han presentado dificultades para la inducción, mantenimiento y regeneración de embriones somáticos, por lo que es necesario el desarrollo de protocolos más eficientes. En este sentido, los cultivos embriogénicos en suspensión poseen ventajas de desarrollo sincronizado, un alto potencial para la producción a gran escala y permiten una selección más rigurosa en protocolos de transformación genética.

Las suspensiones celulares consisten de células libres o agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento que necesitan un suministro constante de nutrientes. Generalmente son consideradas los sistemas celulares más adecuados para llevar a cabo estudios científicos, incluidos los estudios relacionados con el proteoma extracelular.

Las proteínas extracelulares presentan un papel importante en la diferenciación y morfogénesis de las células somáticas. Entre las proteínas más importantes se tienen peroxidasas, endoquitinasas, arabinogalactano proteínas, proteínas de choque térmico, lectinas, y proteínas de la embriogénesis tardía, entre otras.

Un mayor entendimiento de las bases moleculares de la ES no solo será de utilidad para establecer y optimizar protocolos de regeneración de diversos cultivos comerciales, como son los casos del café y aguacate, sino que también contribuirá al conocimiento de los factores bioquímicos y moleculares que están involucrados en este proceso.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 CAFETO (*Coffea arabica* L.)

1.1.1 Botánica y taxonomía

El cafeto es una angiosperma que pertenece a la familia Rubiaceae, a la que pertenecen 500 géneros y alrededor de 600 especies, de los cuales el género *Coffea* es el miembro más importante de la familia a nivel económico. El género *Coffea* está integrado por 128 especies, siendo *C. arabica* y *C. robusta* las especies más cultivadas con fines comerciales. La especie *C. arabica* fue el resultado de una hibridación natural entre *C. eugenioides* y *C. canephora*. Su centro de origen es el noreste de África tropical (suroeste de Etiopía, sur de Sudán y posiblemente el este tropical de África). Es un árbol pequeño, aunque en las plantaciones se suele podar para que tome la forma de un pequeño arbusto. Su ramificación es dimórfica, por lo que se producen verticalmente tallos ortotrópicos, de los se producen ramas horizontales plagiotrópicas, que a su vez producen más ramas plagiotrópicas y frutos. Las flores son hermafroditas y su fruto es una drupa. *C. arabica* es una de las únicas especies en el género *Coffea* que es autógama, ya que una sola planta puede producir semillas fértiles a partir de su propio polen. Es una especie sensible al clima, encontrándose principalmente en bosques montañosos húmedos en donde logra su desarrollo óptimo en altitudes que van de los 1,200 a los 1,950 msnm. Se considera que el café arábica (*C. arabica*) produce los mejores granos de café. La mayoría del café instantáneo está hecho de una mezcla de *C. arabica* y café robusta (*C. canephora*), este último tiene un sabor y aroma menos delicado y contiene más cafeína (Carneiro, 1997).

Conocer el centro de origen de las variedades y cultivares del cafeto entre las especies es importante para entender las principales diferencias y similitudes en su composición química y sabor. Igualmente, el conocimiento de la planta y sus características es fundamental para entender aspectos prácticos de su cultivo, así como temas relacionados como su interacción con el medio ambiente y su respuesta a extremos bióticos y abióticos (Ferreira et al., 2019). Así mismo, nos permite un manejo adecuado de la especie en condiciones de cultivo *in vitro*.

1.1.2 Importancia económica

El café es la bebida favorita del mundo, la planta de cultivo comercial más importante y el segundo producto internacional más valioso después del petróleo. En todo el mundo hay alrededor de 20 millones de familias productoras de café; alrededor de 100 millones de personas dependen del café para su sustento. Desempeña un papel crucial en las economías de varios países tropicales (POWO, 2018).

En 2017 se produjeron 9,327,318 toneladas de café, de los cuales Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia y Honduras aportaron el 65.6% de la producción total. La producción fue cosechada en 10,880,628 ha, siendo Brasil, Indonesia, Costa de Marfil, Colombia y Etiopía los países con la mayor superficie destinada para el cultivo del cafeto. El rendimiento promedio fue de 0.75 t/ha; sin embargo, existen países como Malasia que logró un rendimiento de 3.9 t/ha. China, Vietnam y Sierra Leona también tuvieron rendimientos favorables en el rango de 2.6 a 2.8 t/ha. Los países que importan la mayor cantidad de producto son Estados Unidos, Alemania, Italia, Japón y Bélgica. Entre Estados Unidos y Alemania importaron el 36.5% del total de 7,284,741 t exportadas, lo que dejó una derrama de 19,618,246,000 de dólares (FAOSTAT, 2018).

En el año 2017 México cosechó una superficie de 638,603 ha, ocupando la sexta posición a nivel mundial. Fue el décimo primer país productor con 153,794 t con un rendimiento de 0.24t/ha; así mismo, fue el décimo séptimo país en exportación con 79,916 t de café cereza y 9,122 t de café tostado, lo que aportó un valor total de 336,647,000 dólares (FAOSTAT, 2018).

1.1.3 Problemática

El cultivo de cafeto está bajo amenaza debido a su bajo nivel de diversidad genética dentro de los cultivos, lo que hace que las plantaciones sean vulnerables a plagas, enfermedades y al cambio climático. Estos problemas se combinan tanto para las poblaciones silvestres como para los cultivos porque las semillas de café aún no se pueden almacenar con éxito en bancos de semillas convencionales (POWO, 2018). En este sentido el uso del cultivo de tejidos presenta una alternativa viable para su conservación a través de técnicas de crecimiento mínimo o crioconservación. Así mismo, puede ser una herramienta útil para hacer frente a los principales problemas de plagas y enfermedades como lo son la broca del fruto (*Hypothenemus hampei*) y la roya del café (*Hemileia vastatrix*). La broca del café es la plaga más devastadora del café a nivel mundial, las hembras adultas realizan una perforación en el fruto del café y depositan sus huevos, los cuales al eclosionar se alimentan de las semillas del café dentro del

fruto lo que reduce el rendimiento y la calidad del producto (Talhinhas, 2017, Vega, 2009), mientras que la roya de café es uno de los factores bióticos más limitantes y devastadores en la producción de *C. arabica* a nivel mundial. Los síntomas de la enfermedad incluyen largas masas de esponjas naranjas en la parte inferior de la hoja, lo que provoca una caída prematura de las mismas y, a pesar del uso de fungicidas como métodos de control, el uso de cultivares resistentes es considerada la estrategia de control más efectiva y perdurable (Talhinhas et al., 2017, Vega et al., 2009).

1.2 AGUACATE (*Persea americana* Mill.)

1.2.1 Botánica y taxonomía

El aguacate es una planta dicotiledónea que pertenece a la familia Lauraceae y es la única especie dentro del género *Persea* que es considerada de importancia económica de las 120 especies descritas. Los subgéneros de *Persea* consisten en *P. schiedeana*, *P. pallescens* y *P. americana*. Esta última especie incluye tres razas hortícolas y varias entidades relacionadas que han sido tratadas como especies separadas, variedades botánicas o ambas. Las razas hortícolas son *P. americana* var. *drymifolia*, *P. americana* var. *guatemalensis* y *P. americana* var. *americana* que son comúnmente conocidas como raza mexicana, guatemalteca y antillana, respectivamente; esto con base en sus presuntos centros de origen. Los árboles de *P. americana* pueden medir hasta 30 m de altura. Se distribuye en parte de México y Mesoamérica, y ahora se cultiva ampliamente por debajo de los 1,200 msnm en los trópicos y subtrópicos. El tipo de inflorescencia es una panícula, en la que la floración del aguacate, en relación con el comportamiento de apertura, se denomina "dicogamia protoginosa", ya que básicamente, en condiciones favorables, cada flor se abre dos veces en un período de 24 h, en primer lugar como funcionalmente femenina y en segundo lugar como funcionalmente masculina, las cuales al lograr su fecundación producen un fruto de tipo drupa (Chanderbali et al., 2013, Schaffer et al., 2013).

1.2.2 Importancia económica

El cultivo de aguacate es considerado como la "mercancía" más importante de la familia Lauraceae (Chanderbali et al. 2008), el cual es especialmente importante para nuestro país ya que no solo se considera que México es uno de los centros de origen y distribución de la especie, sino también es el principal productor a nivel mundial. En 2017 la superficie cosechada

de aguacate a nivel mundial fue de 607,542 ha y la producción fue de 6,048,508 t. México cosechó en 188,723 ha, lo que representó el 31.06% de la superficie de cosecha y produjo el 33.5% de la producción. Otros países con un importante aporte a la producción fueron Perú, Colombia, Chile, Indonesia y República Dominicana. Este último país tiene un elevado rendimiento de 43.7 t ha⁻¹, el cual es cuatro veces superior a los rendimientos logrados en México, que fueron de 10.7 t ha⁻¹, y que estuvieron ligeramente por arriba del rendimiento promedio mundial que es de 8.9 t ha⁻¹. En el año 2016 se importaron a nivel mundial 2,020,817 t de aguacate, principalmente por Estados Unidos, Países Bajos, Francia, Reino Unido y España. México exportó el 48.1% de las 1,925,296 t de producto para ese año. El valor total de exportación fue de 4,488,047,000 de dólares, dejando para México una derrama económica de 2,102,981,000 de dólares (FAOSTAT, 2018).

1.2.3 Problemática

La mayor cantidad de la producción de aguacate a nivel mundial está dominada por el cultivar 'Hass', lo que lo hace particularmente susceptible a factores bióticos y abióticos como los son las plagas y enfermedades. El aguacate es atacado por barrenadores (*Conotrachelus perseae*, *C. aguacatae*, *Copturus* y *Heilipus lauri*). Además, también le afectan enfermedades como la roña (*Sphaceloma perseae*), la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*), y la tristeza del aguacatero (*Phytophthora cinnamomi*); esta última es sin duda la enfermedad más dañina, ya que provoca disminución importante en la productividad y rentabilidad del cultivo y tiene una amplia distribución a nivel mundial. La resistencia total a la pudrición de la raíz de *Phytophthora* no evolucionó en el aguacate a lo largo del tiempo, ya que el patógeno no se produjo naturalmente en el hábitat nativo del aguacate, lo que provoca que el patógeno pueda devastar un huerto pobremente drenado y le permite ser más destructivo en los subtrópicos húmedos (Schaffer et al., 2013).

Si bien es cierto que somos el mayor país productor, también es cierto que se debe a la superficie sembrada y no por el rendimiento o manejo del cultivo; la mayoría de las huertas están compuestas por árboles muy altos y viejos, por tanto, se requerirá la renovación de las plantaciones y en este sentido, el uso de técnicas biotecnológicas como la ES es de gran interés para la propagación vegetativa o asexual masiva.

1.3 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Las células vegetales tienen una poderosa capacidad en su propagación para adaptarse al

cambio ambiental, dado que una sola célula vegetal puede dar lugar a una planta completa a través de la ES sin la necesidad de fertilización (Su et al., 2020). La embriogénesis somática es un proceso de diferenciación celular por el cual una célula somática cambia su programa genético y se convierte en una célula embrionaria (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018), de la que se produce un embrión perfecto con una bipolaridad (polos de brotes y raíces) y que no tiene conexión con el tejido vascular del explante (Söndahl y Sharp, 1977).

La ES puede darse de dos formas: ES directa y ES indirecta; en la primera se obtienen embriones directamente a partir de una célula individual o un grupo de células del explante, sin la formación previa de un callo, mientras que la segunda sí se requiere la formación de callo (Quiroz-Figueroa et al., 2002)

En las plantas dicotiledóneas, se pueden identificar cuatro estadios de desarrollo, que son globular, corazón, torpedo y cotiledonar (George, 2008). Algunos de los explantes más usados para su inducción son el polen, los meristemos apicales, la raíz, las hojas, los pétalos, el tallo y los embriones inmaduros (Figura 1.1) (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018).

La ES conduce a la comprensión de la diferenciación, así como a los mecanismos genéticos involucrados en la transición de una etapa a la siguiente, también ha llevado al aislamiento de genes, proteínas y metabolitos involucrados en el proceso de diferenciación celular; así mismo, puede acelerar el descubrimiento, aislamiento y caracterización de genes involucrados en diferentes procesos celulares, y es una herramienta para hacer frente a problemas agronómicos a través de la generación de plantas resistentes a patógenos, plagas, extremos abióticos, incrementar el rendimiento de los cultivos comerciales, la producción de biocombustibles y para la generación de plantas capaces de absorber compuestos tóxicos del medio ambiente (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016).

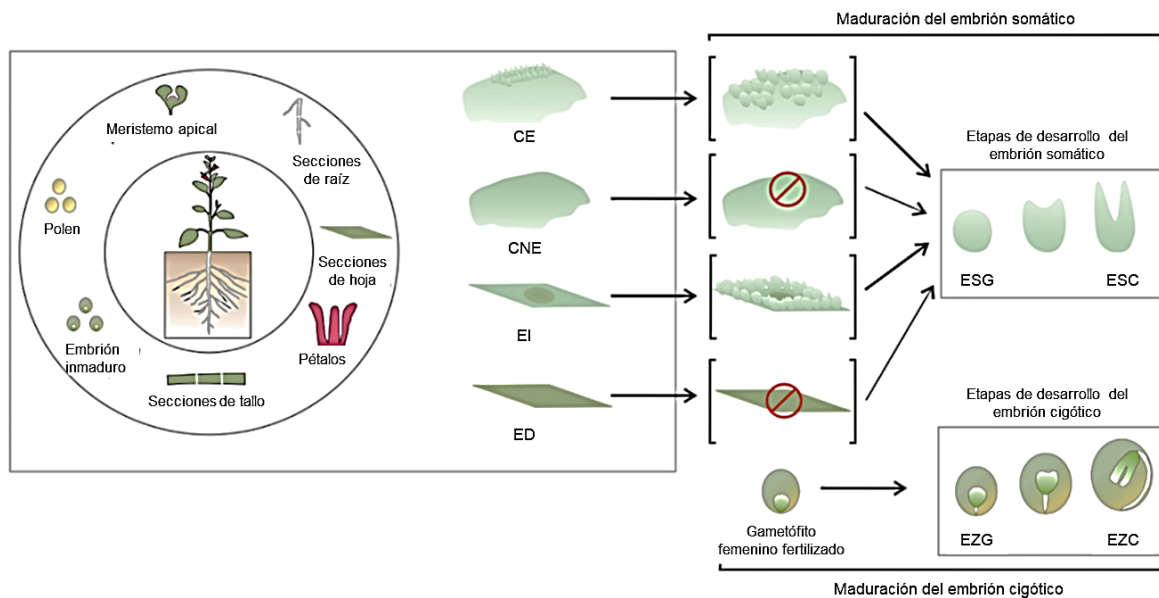


Figura 1.1 Embriogénesis somática. La ES puede ser inducida a partir de una amplia variedad de partes de la planta. Existen dos rutas conocidas que producen embriones somáticos. El explante produce callo embriogénico, y los embriones somáticos emergen de la masa embriogénica. En el segundo caso, los embriones somáticos surgen directamente del explante, sin la formación de la masa embriogénica. EC, callo embriogénico; NEC, callo no embriogénico; GSE, embrión somático globular; CSE, embrión somático cotiledonar, GZE, embrión cigótico globular; CZE, embrión cigótico cotiledonar; UE, explante indiferenciado; DE, explante diferenciado (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018).

1.3.1 Factores involucrados en la embriogénesis somática

La ES es un proceso que ha planteado una de las preguntas biológicas más importantes: ¿qué señales cambian el programa genético de una célula somática y la convierten en una célula embriogénica? (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). La teoría más aceptada sobre el origen de las células embriogénicas somáticas es que las células somáticas pueden recuperar la capacidad embriogénica, cuando se aplica el estímulo correcto, al pasar por un proceso de dediferenciación (Campos et al., 2017).

Para que se realice el cambio de una célula somática a un estadio embriogénico y pueda convertirse en una planta adulta, están implicados cambios celulares, bioquímicos, genéticos y epigenéticos, todos ellos coordinados por las plantas de manera exógena como los son los reguladores de crecimiento o por estrés (daño mecánico o herida), que desencadenan una expresión masiva de genes en varias olas de expresión (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018), así como la respuesta del explante a estímulos endógenos que desencadenan la inducción de una respuesta de señalización y, en consecuencia, modifican el programa de expresión génica de la célula (Méndez-Hernández et al., 2019).

Varios factores pueden modificar la respuesta a la ES, tales como el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, el tipo de explante, la edad y el genotipo de la planta madre, las condiciones fisiológicas de incubación y el estrés (Méndez-Hernández et al., 2019). Recientemente, la atención se ha desplazado a descubrir cómo cambia el proteoma de las células somáticas para promover el desarrollo de una célula embriogénica, la maduración y la germinación del embrión somático (Aguilar-Hernández y Loyola-Vargas, 2018). En este sentido, varios informes han hecho alusión a las proteínas extracelulares como un punto fundamental en el inicio de la cascada de señales que induce los primeros pasos de la embriogénesis somática (Ruíz-May et al., 2010).

1.3.2 Embriogénesis somática en cafeto

Este proceso se ha estudiado en *C. arabica* desde hace 43 años. El primer trabajo reportado fue realizado por (Söndahl y Sharp, 1977) quienes para lograrlo usaron hojas provenientes de brotes plagiotrópicos en medio de inducción (MI) compuesto por sales inorgánicas MS (Murashige, 1962) a la mitad de su fuerza iónica con una concentración de KNO_3 (2x), suplementado con cinetina (Kin) y ácido 1-naftalenacético (ANA) en una relación de concentración de 2.3/0.27 μM obteniendo 2,500 embriones en varios estadios de desarrollo.

La fuente de los explantes puede ser casi cualquier parte de la planta, si bien algunos de ellos poseen un mayor potencial embriogénico. Hasta ahora, las hojas son la fuente de explante más ampliamente utilizada, ya que son abundantes y accesibles todo el año (Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016).

Se han descrito dos tipos de procesos embriogénicos utilizando secciones de hojas como explantes; embriogénesis de baja y alta frecuencia, en el primero, los embriones somáticos se obtienen rápidamente en un solo medio sin producir callos y en general, se obtiene una pequeña cantidad de embriones somáticos, mientras que en la segunda, se usan varios tipos de medios, el proceso debe pasar por callogénesis y se pueden producir y regenerar una gran cantidad de embriones somáticos (Etienne, 2005).

El desarrollo de embriones somáticos es continuo; sin embargo, histológica y morfológicamente se pueden identificar los diferentes estadios de desarrollo, que incluyen el preglobular, globular, oblongo, corazón, torpedo y el cotiledonar (Quiroz-Figueroa et al., 2002).

Existen factores que influyen en la ES del cafeto, tales como el tipo de explante, la composición

del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, el ambiente de cultivo así como la variación somaclonal (Campos et al., 2017).

En café, la micropropagación mediante ES es más adecuada para la propagación clonal a gran escala debido a las altas tasas de multiplicación, la escala de producción y la reducción del área física y la mano de obra, en comparación con otras técnicas (Van Boxtel y Berthouly, 1996).

Las innovaciones han sido decisivas para una ampliación y reducción exitosas de los costos de producción. Entre ellas se encuentra el desarrollo de biorreactores de inmersión temporal para la producción en masa de embriones pregerminados, su siembra directa en suelo hortícola y la propagación de plantas rejuvenecidas a partir de la ES por miniesquejes enraizados (Etienne et al., 2018).

La ES en café puede considerarse como un modelo para otros cultivos perennes leñosos debido a que se ha demostrado una alta eficiencia biológica para las variedades propagadas en todos los estadios de desarrollo, y la variación somaclonal se entiende y se domina gracias a una investigación intensiva combinando marcadores moleculares y observaciones de campo (Etienne et al., 2018).

Hoy, la ES es una herramienta poderosa que se usa ampliamente en el café para aplicaciones biotecnológicas, incluida la propagación y la transformación genética. La investigación básica ha comenzado recientemente a aprovechar los protocolos de SE optimizados. Basado en metodologías ómicas, la investigación tiene como objetivo descifrar los eventos moleculares involucrados en los interruptores clave del desarrollo de la ES del café. Paralelamente, un cribado de alto rendimiento de moléculas activas en la SE parece ser una herramienta prometedora para acelerar la optimización de los protocolos de ES (Etienne et al., 2018).

1.3.3 Embriogénesis somática en el aguacate

El primer trabajo en ES en aguacate fue reportado por Mooney y Staden, (1987); sin embargo, Pliego-Alfaro y Murashige, (1988) fueron los primeros en reportar este proceso en el cultivar Hass a partir de cultivos de callos derivados de embriones cigóticos extirpados de frutos inmaduros usando el medio MS suplementado con $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de picloram; este medio de cultivo es comúnmente llamado MSP (Witjaksono y Litz, 1999a).

Otro explante que se ha utilizado con éxito para la inducción de la ES del aguacate es el tejido nucelar (Vidales-Fernandez et al., 2003; Suarez et al., 2006); sin embargo, la mayoría de los trabajos publicados se ha realizado usando embriones cigóticos en medio MSP (Márquez-Martín et al., 2012; Palomo-Ríos et al., 2013; Chaparro-Pulido et al., 2014) con leves variaciones. Otro de los medios de cultivo más empleados para la inducción de la ES es el propuesto por (Witjaksono y Litz, 1999a), que está compuesto por los macronutrientes del medio B₅ (Garmborg et al. 1968), los micronutrientes del medio MS suplementadas con 0.41 µM de picloram.

Los cultivos embriogénicos de aguacate se han clasificado en dos grupos según su morfología en presencia de auxinas: cultivos de tipo PEM que son genotipos que proliferan como masas proembriogénicas, y cultivos tipo SE que consisten de embriones somáticos desde estadios globulares a cotiledonares, con baja frecuencia de proembriones (Witjaksono y Litz, 1999a).

Es necesaria la evaluación de diferentes fuentes de explantes y medios de cultivo con el fin de mejorar la ES en este cultivo, ya que Witjaksono y Litz, (1999a) reportaron que usando el protocolo tradicional, la competencia morfogénica se pierde alrededor de tres a cuatro meses después de la inducción, dependiendo del genotipo, lo que disminuye el proceso de regeneración de embriones. La ES en aguacate podría ser usada para generar variabilidad *in vitro* así como para la transformación genética (Sánchez-Romero et al., 2006); así mismo como modelo para estudios proteómicos (Guzmán-García et al., 2013).

1.4 CULTIVO DE SUSPENSIONES CELULARES

Las suspensiones celulares (SC) consisten de células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento (Szabados et al., 1993). Para su establecimiento, el mejor inóculo es sin duda un callo friable con una alta actividad de división celular (King, 1984; George et al., 2008a); en ocasiones se debe trabajar con callos compactos. En general, para ambos tipos de callo los métodos más comunes de separación de los agregados para formar una SC fina son el filtrado, la decantación o la adición de pectinasas (Mustafa et al., 2011).

Existen factores biológicos, químicos y físicos que afectan el establecimiento y crecimiento de las SC. Dentro de los factores biológicos se deben considerar la densidad del inóculo, el tamaño de los agregados, la cinética de crecimiento y la selección de las líneas celulares. En el caso de los factores químicos se encuentran el medio de cultivo, la fuente de carbono, el pH del medio; en tanto que para los factores físicos tenemos que tomar en cuenta la velocidad de

agitación, la temperatura y la luz (Kong et al., 2020).

Una vez establecida la SC es importante medir los parámetros de crecimiento, esto con la finalidad de lograr ciclos de crecimiento reproducibles, ya sea para experimentos en el laboratorio o en la industria para garantizar la reproducibilidad de la producción (Mustafa et al., 2011). El crecimiento celular puede ser medido por varios métodos basados en diferentes parámetros, como lo son el peso fresco, el peso seco, el número de células, el volumen del paquete celular, la conductividad eléctrica, la osmolalidad del medio, la determinación de la concentración de nutrientes o metabolitos, el contenido de proteína, el contenido de ADN, la viabilidad celular, la pérdida de peso por desasimilación y el volumen celular después de la sedimentación (Mustafa et al., 2011).

Una curva de crecimiento típica (Figura 1.2) presenta cinco fases: inicial de retraso o lag, seguida de un período de rápido crecimiento o exponencial, lineal, crecimiento decreciente o de desaceleración y finalmente una fase estacionaria en donde la biomasa disminuye a medida que las células en el cultivo comienzan a envejecer (King et al., 1973).

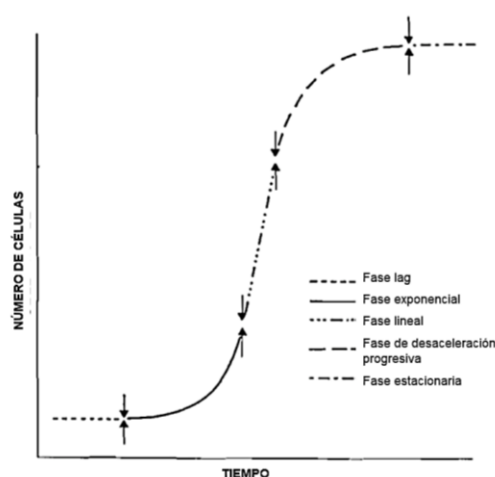


Figura 1.2 Curva de crecimiento modelo. La curva representa el número de células por unidad de volumen de cultivo con respecto al tiempo en un cultivo en suspensión cerrado, caracterizada por cinco fases: lag o de retardamiento, exponencial, lineal, de desaceleración progresiva y estacionaria (King et al., 1973).

El comportamiento de las células es diferente durante cada etapa del crecimiento. Esto se debe a varios factores que influyen en el crecimiento de las células, como la composición del medio de cultivo, el origen del explante, la cantidad y combinación de reguladores del crecimiento, las

condiciones ambientales, entre otras. Los cultivos deben transferirse a un medio fresco antes de que alcancen la fase estacionaria. La desaceleración del crecimiento se debe a varios factores, entre ellos, se encuentran el agotamiento de los nutrientes, la densidad celular y la producción de subproductos tóxicos (Galaz-Ávalos et al., 2012).

Las SC constituyen una técnica muy valiosa en estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos, en la producción de metabolitos secundarios y el aislamiento de mutantes, así como para la ES (Szabados et al., 1993); en esta última, los cultivos embriogénicos en suspensión líquida poseen ventajas de desarrollo sincronizado, un alto potencial para la producción a mayor escala y una selección más rigurosa en los protocolos de transformación genética (Burns y Wetzstein, 1997). Así mismo, son los sistemas celulares más adecuados para estudios científicos como los relacionados al proteoma extracelular (Sabater-Jara et al., 2014).

1.4.1 Cultivo de suspensiones celulares de *C. arabica*

El primer trabajo para la utilización de SC de café fue realizado con la finalidad de presentar a la industria alimentaria las posibilidades de los estudios en SC de plantas para la producción de productos alimenticios; en este caso, la producción de compuestos aromáticos (Townsend, 1974).

El establecimiento de suspensiones celulares ha sido usado en café con diferentes propósitos, tales como una interfase para obtener embriones somáticos, aislamiento de protoplastos, regeneración de plantas (De los Santos-Briones y Hernández-Sotomayor, 2006); así mismo, para la obtención de cultivos celulares altamente productores de metabolitos secundarios (Grèzes, 1994), así como el estudio del metabolismo secundario, enfocado principalmente a la producción de cafeína (Baumann y Frischknecht, 1988).

Se ha buscado mejorar la eficiencia del proceso de propagación de la especie; para ello, el desarrollo de SC embriogénicas ha sido la mejor manera de asegurar la producción masiva y sincronizada de embriones, proceso que puede ser fácilmente escalado a nivel de biorreactores (Etienne et al., 2018). Los primeros trabajos desarrollados para la multiplicación masiva para la ES a través de suspensiones celulares fueron realizados por Zamarripa et al., (1991).

Son varios los trabajos relacionados al uso de las SC en este cultivo. Quiroz-Figueroa et al., (2001) observaron un efecto significativamente positivo sobre la tasa de crecimiento de los

cultivos celulares y la cantidad y calidad de embriones somáticos producidos con el uso de ácido salicílico en dos concentraciones: 10^{-12} and 10^{-10} M. (De Feria et al., 2003) observaron que el oxígeno disuelto afectó el desarrollo de los embriones somáticos; a altas concentraciones se indujeron las formas de tipo globular y corazón, y en bajas concentraciones promovió la producción del tipo torpedo. También se logró la producción masiva y prácticamente sincrónica de embriones somáticos germinados, sin la necesidad de selección antes de la aclimatación usando el sistema RITA (Recipiente de Inmersión Temporal Automático) (Etienne et al., 1997).

Awada et al., (2020) desarrollaron un sistema de detección en miniatura y automatizado para la regeneración de embriones de *C. arabica* en placas de 24 pocillos, con 23.0 ± 5.5 grupos de células por pocillo y una regeneración exitosa de 6.5 ± 2.2 embriones por pozo; así mismo, este sistema ha sido útil para analizar compuestos activos en la ES, en este caso, realizaron un tratamiento con $1 \mu\text{M}$ de tricostatina A con el que las células mostraron un aumento de tres veces en el número de embriones regenerados.

Otros estudios de la ES usando SC han sido realizados desde un enfoque molecular (Quiroz-Figueroa et al., 2002c; Silva et al., 2015; Torres et al., 2015) con el fin de identificar y proponer posibles marcadores moleculares para la adquisición de competencia embriogénica con miras a mejorar los protocolos actuales (Silva et al., 2015; Campos et al., 2017). Así mismo, se ha aplicado un enfoque proteómico como estrategia experimental para el estudio de la ES (Quiroz-Figueroa et al., 2002a; Mukul-López et al., 2012; Campos et al., 2016). La enolasa y las proteínas de globulina de almacenamiento 11S, por ejemplo, podrían usarse como marcadores moleculares para los estadios de desarrollo de embriones somáticos y para la diferenciación de genotipos embriogénicos y no embriogénicos, respectivamente (Tonietto et al., 2012).

1.4.2 Cultivo de suspensiones celulares de *P. americana*

Los primeros en establecer SC embriogénicas en aguacate fueron Witjaksono y Litz, (1999a) y Márquez-Martín et al., (2011), usando embriones cigóticos inmaduros en medio semisólido compuesto por los macronutrientes del medio B₅ (Gamborg et al., 1968), micronutrientes del medio MS y $0.41 \mu\text{M}$ picloram.

Si bien se ha logrado la producción de ES en aguacate, la recuperación eficiente de plantas de embriones somáticos de aguacate ha sido difícil de lograr manipulando las condiciones de

maduración y conversión *in vitro*, en la cual la producción de embriones somáticos bipolares morfológicamente normales ocurre a baja frecuencia (Raharjo y Litz, 2005) aunado al hecho de que los cultivos en suspensión embriogénicos se vuelven cada vez más desorganizados con el tiempo, lo que se asocia con una pérdida progresiva del potencial embriogénico (Witjaksono y Litz, 1999a).

El uso de suspensiones celulares en aguacate ha sido principalmente con fines de mejoramiento genético para incrementar la vida de anaquel, y la resistencia a plagas y enfermedades, a través de la ES (Prusky et al., 1996; Cruz-Hernández et al., 1998; Witjaksono et al., 1998; Witjaksono et al., 1999; Litz y Litz, 2000; Litz, 2007), para conocer los procesos bioquímicos y moleculares involucrados en el desarrollo del fruto (Dudley y Cowan, 2003), en el estudio del proceso embriogénico (Sánchez-Romero et al., 2005) como la maduración (Witjaksono y Litz, 1999b; Perán-Quesada et al., 2004; Márquez-Martín et al., 2011) y regeneración de embriones somáticos (Márquez-Martín et al., 2011; Palomo-Ríos et al., 2013).

En un trabajo reciente se reportó un método nuevo y más eficiente para el mantenimiento y la regeneración de embriones somáticos en aguacate 'Reed', usando $1 \cdot \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ de glutamina en un sistema de dos pasos que involucra el uso de un medio de cultivo para la inducción de mango (MMSE) (López Encina et al., 2014); dado que la eficiencia en la formación de embriones somáticos se ve afectada por el genotipo (Witjaksono y Litz, 1999a) sería recomendable evaluar el protocolo en otros cultivares.

1.5 COMPUESTOS SECRETADOS AL MEDIO DE CULTIVO

La secreción es un proceso fundamental en todos los organismos vivos y consiste en la entrega de diversas proteínas, polisacáridos y metabolitos a la superficie celular o al espacio extracelular (Wang et al., 2017). En las plantas, el espacio extracelular y el apoplasto a menudo se usan como sinónimos y con el significado más amplio, es decir, refiriéndose a todo el compartimento externo al plasmalema de la planta, que incluye la pared celular, el espacio libre entre células (o espacio intercelular) y el fluido apoplástico (Guerra-Guimaraes et al., 2016).

La actividad secretoria de las plantas a menudo se asocia con la defensa directa e indirecta contra agentes bióticos y abióticos. Las sustancias secretadas no solo son importantes para la planta al conferirle mayor capacidad competitiva y resistencia a las adversidades

medioambientales, sino que también varias de ellas poseen un alto valor económico (Paiva, 2016).

El medio de cultivo de células cultivadas en suspensión funciona como una fuente de nutrientes por un lado y como un compartimento extracelular funcional que sirve de almacenamiento y, por otro lado, como compartimento lítico que complementa las actividades de la vacuola (Wink, 1994); así mismo, puede considerarse como una gran extensión del espacio intercelular en donde las moléculas secretadas que habitan en el apoplasto de las planta se acumulan en el medio y ejercen su efecto sobre el crecimiento y desarrollo celular (Tchorbadjieva, 2016).

Diversos estudios bioquímicos han demostrado que diferentes tipos de moléculas como péptidos, proteínas, proteínas relacionadas a la patogénesis, oligosacáridos, enzimas y arabinogalactano proteínas (AGPs) son producidas y secretadas por las células o estructuras multicelulares al medio de cultivo en donde participan en la formación del embrión somático (Matthys-Rochon, 2005). Algunos de estos compuestos se derivan de la pared celular, mientras que otros se originan dentro de las células y pueden funcionar como inductores o inhibidores de la ES y pueden clasificarse como compuestos de alta o baja masa molecular (Quiroz-Figueroa et al., 2006).

Los péptidos son la clase de moléculas secretadas mejor estudiadas biológicamente, ya que funcionan como ligandos de proteínas receptoras que transducen señales externas desde la membrana plasmática al interior de la célula en diversos contextos de desarrollo y durante otros procesos como la homeostasis de las células madre, la abscisión floral, el desarrollo estomático, la reproducción de la planta, la regulación del crecimiento y la defensa contra patógenos (Krause et al., 2013a).

Las moléculas de señalización solubles secretadas juegan un papel importante en la ES. Se ha observado durante mucho tiempo que el medio condicionado de cultivos embriogénicos puede promover la embriogénesis. Los componentes activos en el medio condicionado incluyen endoquitinasas, arabinogalactano proteínas y oligosacáridos (Von Arnold et al., 2002).

El péptido, α -pitosulfokina mejoró la división celular y, como consecuencia, estimuló la ES de la zanahoria (Kobayashi et al., 1999; Hanai et al., 2000). Así mismo, el compuesto que pertenecen a la familia de inhibidores de la histona desacetilasa, trichostatina A, fue probado

para evaluar la eficiencia de regeneración de embriones, mostrando un marcado aumento en el número de embriones regenerados (Awada et al., 2020).

El alcohol 4-hidroxibencílico es un factor importante que se acumula en cultivos de células de zanahoria a altas densidades celulares e inhibe la ES (Kobayashi et al., 2000); igualmente el compuesto vanilil bencil éter inhibe la embriogénesis somática de *Larix leptolepis*, especialmente el desarrollo del suspensor (Umehara et al., 2005). Así mismo, la abundancia de dos compuestos fenólicos principales, la cafeína y el ácido clorogénico, mostraron ser responsables de la inhibición de la ES en *C. canephora* (Nic-Can et al., 2015).

1.5.1 Proteínas extracelulares

El secretoma es el grupo global de proteínas secretadas en el espacio extracelular por una célula, tejido, órgano u organismo en cualquier momento y bajo diferentes condiciones a través de mecanismos de secreción conocidos y desconocidos (Agrawal et al., 2010).

Anteriormente se desconocía cuál era la función de las proteínas en el medio de cultivo; sin embargo, se especulaba que una posible función era la modificación de los polímeros de la pared celular, ya que algunos de estos compuestos provenían de la pared celular, mientras que otros provienen del interior de la célula (Matthys-Rochon, 2005). A la fecha aún no se conoce cuál es la función del secretoma en su totalidad; sin embargo, su estudio está ganando interés porque su importancia biológica se basa en los múltiples procesos en los que intervienen las proteínas secretadas, como la participación en la formación de la pared celular, la interacción entre las células, la transducción de señales, la respuesta a estímulos externos, la activación del sistema de defensa, entre muchos otros (Yadav et al., 2015).

El aislamiento de la gama completa de proteínas secretadas ha resultado difícil, y nuevas estrategias evolucionan constantemente para aumentar el número de proteínas que se pueden detectar e identificar (Ghahremani et al., 2016); es por ello que las suspensiones celulares se consideran los sistemas celulares más adecuados para llevar a cabo estudios científicos, incluido el del proteoma extracelular (Sabater-Jara et al., 2014), dado que en este sistema, las proteínas se secretan al medio de cultivo, lo que permite su fácil separación sin interrupción celular aunado a que permite el estudio de proteínas apoplásticas libremente solubles evitando

la contaminación con proteínas citoplasmáticas debido al daño durante el procesamiento como en el caso de *Medicago* sp. (Kusumawati et al., 2008).

El estudio del secretoma en SC, acoplado con el uso de la electroforesis (la separación de iones bajo la influencia de un campo eléctrico) puede generar buenos resultados, ya que ésta es la técnica de análisis y preparación más poderosa y más empleada en la investigación de proteínas. Como cualquier otra técnica, la 2-DE tiene sus propias características: es potente y, dependiendo de las condiciones experimentales y del sistema biológico, permite la detección de unos pocos cientos hasta un par de miles de manchas individuales, cada uno correspondiente a una o más especies de proteínas. La 2-DE es una técnica cuantitativa, al menos en términos relativos. Se basa en la intensidad de la mancha, que depende de la abundancia de proteínas y el protocolo de tinción o etiquetado. La diferencia entre dos muestras puede ser cualitativa (presencia o ausencia de manchas) o cuantitativa (una mancha más o menos abundante o intensa). La abundancia de especies proteicas no debe estar necesariamente relacionada con el nivel de la expresión génica correspondiente. Por lo tanto, la ausencia de una mancha no significa necesariamente que el gen de codificación no se esté transcribiendo (Jorrín-Novó et al., 2019).

Guerra-Guimaraes et al., (2016) realizaron una revisión sobre proteómica del apoplasto con el fin de obtener información sobre los procesos metabólicos que ocurren en el espacio extracelular bajo estrés abiótico y biótico, así como en condiciones normales. Mostraron que el 18% y el 29% de las proteínas están implicadas en la organización y la biogénesis de la pared celular, respectivamente, el 8% de las proteínas correspondían a aquellas involucradas en el metabolismo redox y menos del 6% de las proteínas encontradas estaban involucradas en la señalización. Mientras tanto, la gran mayoría de las proteínas detectadas (23%–33%) fueron proteínas relacionadas con patógenos (Stintzi et al., 1993; Van Loon et al., 2006; Ali et al., 2018) que a menudo son quitinasas, peroxidases o superóxido dismutasas (Krause et al., 2013b).

Algunos de los estudios proteómicos realizados en SC en condiciones embriogénicas y no embriogénicas con base en geles en segunda dimensión (2D) en especies como *Cyclamen persicum* (Lyngved et al., 2008; Rode et al., 2012), *Sorghum bicolor* (Ngara et al., 2008; Ngara y Ndimba, 2011), *Arabidopsis thaliana* (Tran y Plaxton, 2008), *Nicotiana tabacum* (Okushima et al., 2000; Lippmann et al., 2009) se muestran en el Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Estudios proteómicos en suspensiones celulares embriogénicas y no embriogénicas de plantas.

Especie	Tratamiento	Análisis	Proteínas identificadas	Función	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Medio con fosfato (+Pi) y Pi-deficiente (-Pi)	2-DE; MALDI-TOF-MS	Glucosil hidrolasa, glutatión transferasa y peroxidasa	Modificación de la pared celular y defensa	(Tran y Plaxton, 2008)
<i>Cicer arietinum</i>	Ninguno	2-DE-SDS-PAGE; -LC-MS/MS	773 proteínas identificadas	Transducción de señales, transporte y defensa	(Gupta et al., 2011)
<i>Citrus sinensis</i>	Ninguno	2-DE-MALDI-TOF-TOF-MS/MS	24 proteínas expresadas diferencialmente	Posible participación en ES, estrés oxidativo, división celular.	(Pan et al., 2009)
		2-DE-MALDI-TOF-TOF-MS/MS	10 proteínas expresadas diferencialmente.	Estrés oxidativo, división celular, estrés osmótico.	(Pan et al., 2010)
<i>Cyclamen persicum</i>	Ninguno	2D-DIGE-MALDI-TOF-TOF-MS/MS	128 proteínas expresadas diferencialmente	Metabolismo y procesamiento de proteínas.	(Lyngved et al., 2008)
		2-DE-SDS-PAGE; LC-MS/MS	108 proteínas expresadas diferencialmente	Participación en la ES	(Rode et al., 2012)
<i>Glycine max</i>	Ninguno	2D-DIGE; LC-MS/MS	367 proteínas intracelulares y 188 proteínas extracelulares	Metabolismo secundario, respuesta al estrés y síntesis de proteínas	(Miernyk et al., 2016)
<i>Medicago truncatula</i>	Ninguno	2-DE; MALDI-TOF-MS; MS/MS	169 proteínas identificadas	Defensa y respuesta al estrés	(Imin et al., 2004)
	Infección con <i>S. meliloti</i>	2D-PAGE, LC-MS/MS	111 proteínas; peroxidasas, GAPDH	Defensa, crecimiento y desarrollo	(Gokulakannan y Niehaus, 2010)

<i>Nicotiana tabacum</i>	Ninguno	2-DE; SDS-PAGE	Peroxidasa y β -1,3-exoglucanasa	Proteínas relacionada a la patogénesis	(Okushima et al., 2000)
<i>Vigna unguiculata</i>	Ninguno	2D-PAGE; MALDI-TOF-TOF-MS/MS	14 proteínas; glucanasas y xilanasas	Posible participación en la ES	(Nogueira et al., 2007)
<i>Crocus sativus</i>	Ninguno	2D-SDS-DIGE, MALDI-TOF-MS	36 proteínas	Posible participación en la ES	(Sharifi et al., 2012)

Se ha observado que las moléculas secretadas al medio de cultivo juegan un importante papel en el desarrollo de la ES como inductores o inhibidores (Matthys-Rochon, 2005). Por ejemplo, el desarrollo normal de los embriones somáticos depende de manera obligatoria de la ausencia de proteínas glucosiladas de entre 53 y 57 kDa en *Citrus aurantium* (Gavish et al., 1992).

Las AGPs son una clase muy diversa de proteoglicanos de la pared celular que se encuentran comúnmente en la mayoría de las especies de plantas. Desempeñan papeles importantes en muchos procesos celulares durante el desarrollo de la planta, como la reproducción, la proliferación celular, la formación y el crecimiento del patrón, y en la interacción planta-microbio (Knoch et al., 2014). Las AGPs se han implicado en muchos procesos involucrados en el crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la ES (Van Hengel et al., 2002).

La adición de proteínas extracelulares de una línea embriogénica normal a una línea embriogénica anormal, dentro de ellas, las AGPs, restauró la morfología de los embriones en *Picea abies* (Egertsdotter y Von Arnold, 1995). La adición de β -D-GlcY, un fenilglucósido sintético que se une específicamente a las AGP, tuvo un efecto promotor en la proliferación celular, lo que sugiere que se requieren proteínas de las AGPs para los procesos de crecimiento en cultivos de células de vid (Amar et al., 2007).

En zanahoria (*Daucus carota* L.) la ES es inhibida por la tunicamicina, un inhibidor de la glucosilación. Esta inhibición es reversible mediante la adición de glucoproteínas glucosiladas correctamente que han sido secretadas en el medio de cultivo, pero se restaura con la isoenzimas peroxidasa catiónica de 38 kDa (Cordewener et al., 1991). En la misma especie, pero en una variante sensible a la temperatura para la ES, no puede realizar una glucosilación adecuada a la temperatura no permisiva y sugiere que la actividad de ciertas proteínas

extracelulares, esenciales para la transición de los embriones somáticos de globulares a corazón, depende de la modificación correcta de sus cadenas laterales de oligosacáridos (LoSchiavo et al., 1990).

La adición del reactivo β -D-glucosilo (reactivo de Yariv; β GlcY) al medio de cultivo, un fenilglucósido sintético que se une específicamente a las AGPs, bloqueó la ES de una manera dependiente de la concentración y con una inhibición completa de la inducción de la ES a 250 μ M (Chapman et al., 2000). Por otro lado, la GhPLA1, una AGP quimérica, promovió la ES en cultivos celulares de algodón (Poon et al., 2012).

Todos los cultivos de tejidos *in vitro* secretan una amplia gama de moléculas en los medios de cultivo. La secreción de compuestos de alta masa molecular, como las proteínas, ha mostrado un papel activo en diferentes fenómenos biológicos. De hecho, varios informes han hecho alusión a las proteínas extracelulares como un punto fundamental en el inicio de la cascada de señales que induce los primeros pasos de la ES (Quiroz-Figueroa et al., 2002a; Ruíz-May et al., 2010). Las AGPs, proteínas RP como quitinasas, glucanasas, peroxidasas, proteínas transportadoras de lípidos, proteasas y esterasas son proteínas extracelulares secretadas en los medios de cultivo que podrían estar involucradas en la inducción temprana de la ES (Ruíz-May et al., 2010).

Se han realizado varios trabajos para analizar las proteínas secretadas al medio de cultivo en SC en condiciones no embriogénicas en algunas especies como *Arabidopsis thaliana* (Oh et al., 2005), *Nicotiana* sp. (Lippmann et al., 2009), *Oryza meyeriana* (Chen et al., 2016), *O. sativa* (Jung et al., 2008; Kim et al., 2009), *Vitis vinífera* (Martinez-Esteso et al., 2009; Belchí-Navarro et al., 2019) y en condiciones embriogénicas *Coffea* sp. (Mukul-López et al., 2012), *Dactylis glomerata* (Tchorbadjieva et al., 2004; Tchorbadjieva y Pantchev, 2006; Rakleova et al., 2010; 2012), *Medicago trunculata* (Kusumawati et al., 2008), y *Solanum betaceum* (Alves et al., 2017) (Cuadro 1.2).

Quiroz-Figueroa et al., (2002a) detectaron proteínas extracelulares en medio condicionado de las líneas embriogénicas de *C. arabica*; su concentración varió a lo largo de la edad del cultivo y su perfil electroforético mostró la presencia de dos proteínas específicas para la condición de embriogénesis, ambas con una masa molecular de 27 kDa y un pI de 5.7 y 9.4-9.7, respectivamente. Para la misma especie Mukul-López et al., (2012) estudiaron las proteínas

secretadas al medio en suspensiones celulares embriogénicas y no embriogénicas, en las que después de 14 días en condiciones no embriogénicas detectaron 523 proteínas y en condiciones embriogénicas, determinaron 319, 409 y 175 proteínas después de 21, 42 y 98 días, respectivamente, concluyendo que algunas proteínas se secretan exclusivamente en condiciones embriogénicas y otras proteínas en condiciones no embriogénicas.

Campos et al., (2016) realizaron el perfil proteómico de dos suspensiones celulares embriogénicas de *C. arabica* en las que identificaron 1,052 proteínas no redundantes tales como la aldolasa fructosa bifosfato y la aldolasa 4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato, que están relacionadas con el estrés y la capacidad embriogénica que podrían ser buenos candidatos a marcadores de células embriogénicas y probablemente desempeñan un papel en la mejora de la producción de embriones somáticos.

A pesar del papel crucial que desempeñan las proteínas extracelulares en estos procesos diversos y significativos, el proteoma extracelular se ha caracterizado menos que otros compartimentos subcelulares (Tchorbadjieva, 2016). Es por ello que el estudio de las proteínas extracelulares durante la ES de especies de interés agrícola, forestal e industrial es necesario.

Cuadro 1.2 Proteínas secretadas al medio de cultivo en suspensiones celulares de plantas en condiciones embriogénicas y no embriogénicas.

Espece	Tratamiento	Análisis	Proteínas identificadas	Función	Referencia
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Acido salicílico e infección con <i>Alternaria brassicicola</i>	2D-PAGE, MALDI-TOF MS	Lipasa (GLIP1)	Defensa	(Oh et al., 2005)
<i>Nicotiana sp</i>	Ninguno	2-DE; GC/MS	32 manchas. Quitinasa, peroxidasa y β -1,4-xilosidasa	Defensa y procesos de regeneración celular	(Lippmann et al., 2009)
<i>Oryza meyeriana</i>	Infección con <i>Xanthomonas oryzae</i>	2D-DIGE; MALDI-TOF/TOF-MS	34 proteínas	Transducción de señales, defensa, estructura de la pared y estrés oxidativo.	(Chen et al., 2016)
<i>Oryza sativa</i>	Inoculación con <i>M. grisea</i>	2-DE; MALDI-TOF-MS; μ LC-ESI-MS/MS	Quitinasas, germina A/oxalato oxidasas y β -expansia	Defensa	(Kim et al., 2009)
	Ninguno	2-DE; LC-MS/MS	192 proteínas	Defensa y metabolismo de	(Jung et al., 2008)

				la pared	
<i>Vitis vinifera</i> cv. Gamay	Ciclodextrinas metiladas y metil jasmonato (MeJA)	2-DE	25 proteínas; PR- proteínas	Defensa	(Martinez- Esteso et al., 2009)
<i>Vitis vinifera</i> cv. Monastrell	Cyclodextrinas y/o MeJA	LC-MS/MS	Peroxidasa, heparanasa, β -1,3 glucanasa y reticulina oxidasa	Defensa	(Belchí-Navarro et al., 2019)
<i>Coffea canephora</i>	Ninguno	2D-PAGE	173 proteínas	Participación en la ES	(Mukul-López et al., 2012)
<i>Coffea arabica</i>	Ninguno	2D-PAGE	523 en condiciones NE y 963 durante la ES	Participación en la ES	(Mukul-López et al., 2012)
<i>Dactylis glomerata</i>	Ninguno	2D-SDS- PAGE	Quitinasa de 32 kDa	Participación en la ES	(Tchorbadjieva y Pantchev, 2006)
	Ninguno	2D-SDS- PAGE;MS	Serina proteasa de 70 kDa y varias isoformas de proteasas de cisteína de 36 kDa	Posible participación en la ES	(Rakleova et al., 2012)
	Ninguno	2D- PAGE;LC- MS/MS	α -amilasa, designada DgAmy1	Posible participación en la ES	(Rakleova et al., 2010)
	Ninguno	2D-SDS- PAGE	40 proteínas	Posible participación en la ES	(Tchorbadjieva et al., 2004)
<i>Solanum betaceum</i>	Ninguno	SDS-PAGE; MALDI- TOF/TOF- MS	13 proteínas; glucanasas y xilosas	Posible participación en la ES	(Alves et al., 2017)
<i>Medicago truncatula</i> 2HA	Ninguno	SDS-PAGE; MALDI- TOF/TOF	Proteasas, peroxidasas, Proteínas-PR, peroxidasas	Posible participación en la ES	(Kusumawati et al., 2008)

1.6 JUSTIFICACIÓN

Se sabe que las proteínas extracelulares secretadas al medio de cultivo participan como inductores o inhibidores de la ES; por tanto, su cuantificación e identificación durante la inducción de la ES podría dilucidar las diferentes vías involucradas en este proceso y con ello contribuir a la generación de estrategias biotecnológicas para la optimización de protocolos de regeneración que contribuyan al mejoramiento genético de especies de interés.

1.7 OBJETIVO GENERAL

Establecer y caracterizar cultivos celulares de café y aguacate.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer líneas de suspensiones celulares de café y aguacate.
- Caracterizar el crecimiento de las líneas celulares.
- Inducir la ES a partir de las suspensiones celulares.

1.9 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

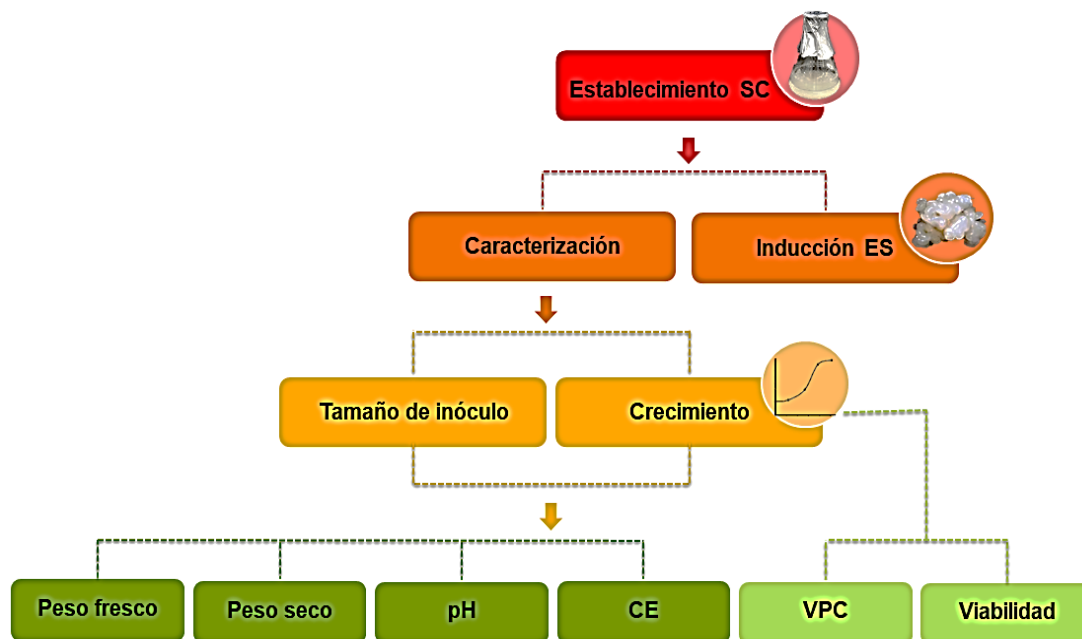


Figura 1.3 Diagrama general de la estrategia experimental

CAPÍTULO II

ESTABLECIMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES DE CAFETO Y AGUACATE

2.1 INTRODUCCIÓN

Las suspensiones celulares consisten en células libres y agregados celulares distribuidos en un medio líquido en movimiento y deben ser mantenidas mediante suministro continuo de nutrientes (Szabados et al., 1993). El mejor inóculo para la iniciación de las suspensiones celulares es sin duda un callo friable con una alta actividad de división celular (King, 1984). El crecimiento celular puede ser medido por varios métodos con base en diferentes parámetros, como el peso fresco (PF), el peso seco (PS), el número de células, el volumen del paquete celular (VPC), la conductividad eléctrica (CE) u osmolalidad del medio, la determinación de la concentración de nutrientes o metabolitos, el contenido de proteína, el contenido de ADN, la viabilidad celular, la pérdida de peso por desasimilación y el volumen celular después de la sedimentación (Mustafa et al., 2011). Una curva de crecimiento típica con base en los pesos fresco y seco de la biomasa de diferentes cultivos presenta cinco fases: inicial de retraso, exponencial, lineal, crecimiento decreciente y estacionaria.

Hay varios factores que influyen en el crecimiento de las células, como el medio de cultivo, el origen del explante, la cantidad y combinación de reguladores del crecimiento, las condiciones del cultivo ambiental, entre otras (Galaz-Ávalos et al., 2012). Las SC constituyen una técnica muy valiosa en estudios sobre el ciclo celular, estudios fisiológicos y bioquímicos, en la formación de metabolitos secundarios y el aislamiento de mutantes, así como para la ES (Szabados et al., 1993); en esta última, los cultivos embriogénicos en suspensión líquida poseen ventajas de desarrollo sincronizado, un alto potencial para la producción a mayor escala y una selección más rigurosa en los protocolos de transformación genética (Burns y Wetzstein, 1997). Así mismo, son los sistemas celulares más adecuados para estudios científicos como los relacionados al proteoma extracelular (Sabater-Jara et al., 2014), entre ellas las proteínas extracelulares, ya que se ha reportado que participan como un punto fundamental en el inicio de la cascada de señales que induce los primeros pasos de la ES (Quiroz-Figueroa et al., 2002a; Ruíz-May et al., 2010).

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Establecimiento de las suspensiones celulares de cafeto

Se utilizó callo friable de *C. arabica*, proveniente de un cultivar posiblemente resistente a la roya, previamente establecido en nuestro laboratorio por el equipo que trabaja para el proyecto 292474. El callo se disgregó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo líquido de mantenimiento (MA), el cual está compuesto por sales basales del medio MS (MS; Phyto Technology Laboratories, M524), suplementado con 29.6 μ M tiamina-HCl (Sigma, T3902), 555 μ M mioinositol (Sigma, I5125), 158.6 μ M cisteína (Sigma, C121800), 3.9 μ M de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D; Sigma, D6679), 9.3 μ M de cinetina (Kin; Sigma, K0753), 87.64 mM sacarosa (Sigma, S539) y el pH ajustado a 5.8 (Cuadro A.1; en el anexo). Posteriormente se esterilizó a 121 °C por 17 minutos. El material se incubó a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 100 rpm. El medio de cultivo se renovó cada 15 días.

2.2.2 Establecimiento de las suspensiones celulares de aguacate

El material usado fue proporcionado por el equipo del Instituto Nacional de Ecología (INECOL) como parte de la colaboración del proyecto 292399. El callo friable se colocó en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 mL de medio de mantenimiento de aguacate MSP (Pliego-Alfaro y Murashige, 1988): sales basales del medio MS suplementado con 12 μ M tiamina-HCl (Sigma, T3902), 555 μ M mioinositol (Sigma, I5125), 0.41 μ M de picloram, 87.64 mM sacarosa (Sigma, S539) y el pH ajustado a 5.7 (Cuadro A.2, en el anexo). Posteriormente se esterilizó en una autoclave a 121 °C por 17 minutos. El material se incubó a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 100 rpm. Después del día 60, el material se cambió a matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo, el cual se renovó cada 15 días.

2.2.3 Prueba del efecto del inóculo en el crecimiento de las suspensiones celulares

Una vez generadas las SC de cafeto se evaluó el crecimiento utilizando tres tamaños de inóculo (100 mg, 200 mg y 300 mg de peso fresco) en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de pre-acondicionamiento (Cuadro A.1, en el anexo). Se evaluaron los pesos fresco y seco, el pH y la CE para los días 0, 8, 13, 21, 28, 35 y 43. Se realizaron tres réplicas técnicas.

En el caso de las SC de aguacate, se evaluaron los siguientes tamaños de inóculo: 100, 250 y 450 mg colocados en 50 mL de medio MMSE (Cuadro A.2, en el anexo) en matraces de 250 mL. Se evaluaron los siguientes parámetros: peso fresco, peso seco, pH y CE en los días 1, 7, 14, 32, 41, 47, 53.

2.2.3.1 Peso fresco y peso seco

Para obtener el peso fresco, las suspensiones celulares se colocaron en un equipo de filtrado Millipore, al cual previamente se le colocó una pieza de papel filtro (Whatman No. 1), acoplado a un matraz de filtración al vacío conectado a una bomba Felisa FE-1500. Se ejerció vacío durante un minuto, posteriormente las células se pesaron en una balanza analítica. Las muestras se almacenaron a -22 °C; una vez terminado el ciclo de cultivo se liofilizaron en una liofilizadora Labconco y se pesaron en una balanza analítica para obtener el peso seco.

2.2.3.2 Conductividad eléctrica y pH

La conductividad se determinó colocando un conductímetro en el medio de cultivo recuperado después del filtrado de las suspensiones celulares para la prueba del PF. Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro Ohaus starter 3100 cuyo electrodo fue sumergido en el medio libre de células.

2.2.3.3 Parámetros de crecimiento

Los resultados de las pruebas evaluadas se graficaron en el programa Origin Pro 8G (OriginLab Corporation Northampton, MA-USA). Los parámetros de crecimiento evaluados fueron: índice de crecimiento, velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de acuerdo con Galaz-Ávalos et al., (2012).

2.2.4 Caracterización de las suspensiones celulares

Se inocularon 200 mg de células de SC de cafeto en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de mantenimiento (Cuadro A.1, en el anexo). El material se incubó a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 100 rpm. El crecimiento de las suspensiones fue evaluado tomando en cuenta los siguientes parámetros: paquete celular, peso fresco, peso seco, conductividad, pH y viabilidad en días pares durante 40 días. La prueba constó de tres réplicas biológicas.

Posteriormente se graficó el ciclo de cultivo y se evaluaron los parámetros de crecimiento como se mencionó en el apartado anterior.

En el caso de aguacate se inocularon 450 mg de células en 50 mL de medio MMSE (Cuadro A.2, en el anexo) en matraces de 250 mL. El material se incubó a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 100 rpm. Se evaluaron los parámetros de peso fresco, peso seco, volumen de paquete celular, conductividad, pH y viabilidad en días nones durante 33 días. Se realizaron tres replicas biológicas.

2.2.4.1 Paquete celular

Se colocaron 10 mL de las suspensiones celulares en un tubo cónico graduado de 15 mL y se centrifugó a 3,000 rpm por 15 minutos en una centrifuga Hettich Mikro 22R. Para calcular el porcentaje, se dividió el volumen de células sedimentadas entre el volumen total utilizado (10 mL), multiplicado por 100.

2.2.4.2 Peso fresco y peso seco

Para obtener el peso seco, las suspensiones celulares se filtraron utilizando papel filtro (Whatman No. 1) en un equipo de filtrado Millipore acoplado a un matraz conectado a una bomba Felisa FE-1500; se ejerció vacío durante un minuto, después las células libres de medio se pesaron en una balanza analítica. Las muestras se almacenaron a -22 °C. Una vez terminado el ciclo de cultivo se liofilizaron en una liofilizadora Labconco y se pesaron en una balanza analítica para obtener el peso seco.

2.2.4.3 Conductividad eléctrica y pH

La conductividad del medio se realizó colocando un conductímetro en el interior del medio de cultivo recuperado después del filtrado de las suspensiones celulares. Para la medición de pH se utilizó un potenciómetro Ohaus starter 3100, cuyo electrodo fue sumergido en el medio libre de células. El pH se ajustó inicialmente a 5.8. Estas mediciones se realizaron a lo largo del ciclo del cultivo.

2.2.4.4 Viabilidad

La viabilidad se determinó usando la prueba de azul de Evans. Se colocó un mL de suspensión celular en un tubo de ensayo y se agregaron 250 μ L de una solución de azul de Evans al 0.1% (la concentración final por muestra fue de 0.025% v/v). La muestra se incubó por 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se realizaron los lavados suficientes para remover el colorante, centrifugando a 1,880 x g por 5 min entre cada lavado. Posteriormente se agregó una solución de metanol al 50% (v/v) con SDS (dodecil sulfato de sodio) al 1% (p/v) a 60° C por 30 min y después se centrifugó a 1,880 x g por 10 min en una centrifugadora Hettich Mikro 22R, esto con la finalidad de solubilizar el colorante adherido a las células muertas. Este procedimiento se repitió tres veces; se recuperó el sobrenadante en cada extracción y se diluyó a un volumen final de 7 mL. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Halo XB-10 UV-VIS a 600 nm. El testigo para calcular el % de viabilidad fue una muestra de un mL de suspensiones celulares colocadas a 70° C por 30 min, al cual se le realizó el procedimiento anteriormente mencionado; estas células se tomaron como el porcentaje de células muertas.

2.2.5 Inducción de la embriogénesis somática en café

Una vez generadas las SC se inocularon 200 mg de células en matraces de 250 mL con 50 mL medio de medio de pre-acondicionamiento (MPA); sales basales MS a la mitad de su potencial iónico, suplementado con 11.5 μ M de 2,4-D y 4.4 μ M de BA (benciladenina). Se mantuvieron durante 42 días. El medio se renovó cada 15 días. Transcurrido ese periodo se inocularon 100 mg en medio de inducción compuesto por sales basales MS a la mitad de su fuerza iónica, suplementado con 0.22 μ M de ácido 1- naftalenacético y 2.3 μ M de cinetina (Cuadro A.1, en el anexo). Los cultivos se mantuvieron en oscuridad a 25 \pm 2° C a 100 rpm. El medio de cultivo se renovó cada 15 días.

2.2.6 Inducción de la embriogénesis somática en aguacate

Una vez establecidas las SC se inocularon 200 mg de células en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de inducción (Witjaksono y Litz, 1999a) que consiste en sales mayores Gamborg B5, sales menores MS suplementado con 0.41 μ M de picloram y se incubaron en las mismas condiciones ya mencionadas.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Establecimiento de las suspensiones celulares de *C. arabica*

Para el establecimiento de las suspensiones celulares el inóculo inicial fue callo friable que fue colocado en 50 mL de medio líquido de mantenimiento (MA): sales basales MS, suplementado con $3.9 \mu\text{M}$ de 2,4-D y $9.3 \mu\text{M}$ de Kin (Cuadro A.1, en el anexo) en matraces Erlenmeyer de 250 mL, incubados a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en la oscuridad a 100 rpm. El callo se disgregó fácilmente al momento del establecimiento, lo que permitió observar células libres desde el día cero; así mismo, el material se pudo filtrar desde el segundo cambio de medio usando un colador con un tamaño de malla de 1 mm, esto permitió obtener una suspensión celular de apariencia fina para el día 30 (Figura 2.1). Con las subsecuentes transferencias la apariencia de las SC se mantuvo fina y lechosa.

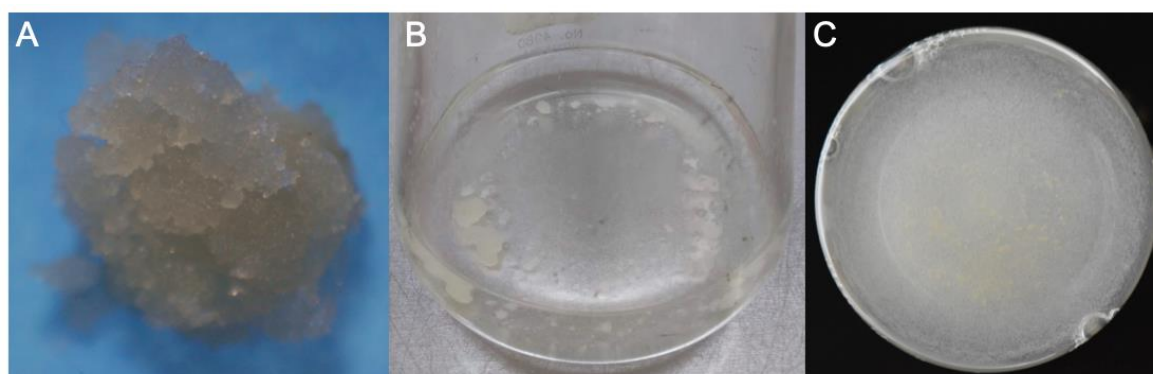


Figura 2.1 Establecimiento de las suspensiones celulares de *C. arabica*. Se disgregó callo friable en 50 mL de medio líquido de mantenimiento en matraces Erlenmeyer de 250 mL incubados a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ en la oscuridad a 100 rpm. A) Inóculo inicial; callo friable. B) Medio de mantenimiento inoculado al día cero. C) Suspensiones celulares al día 30.

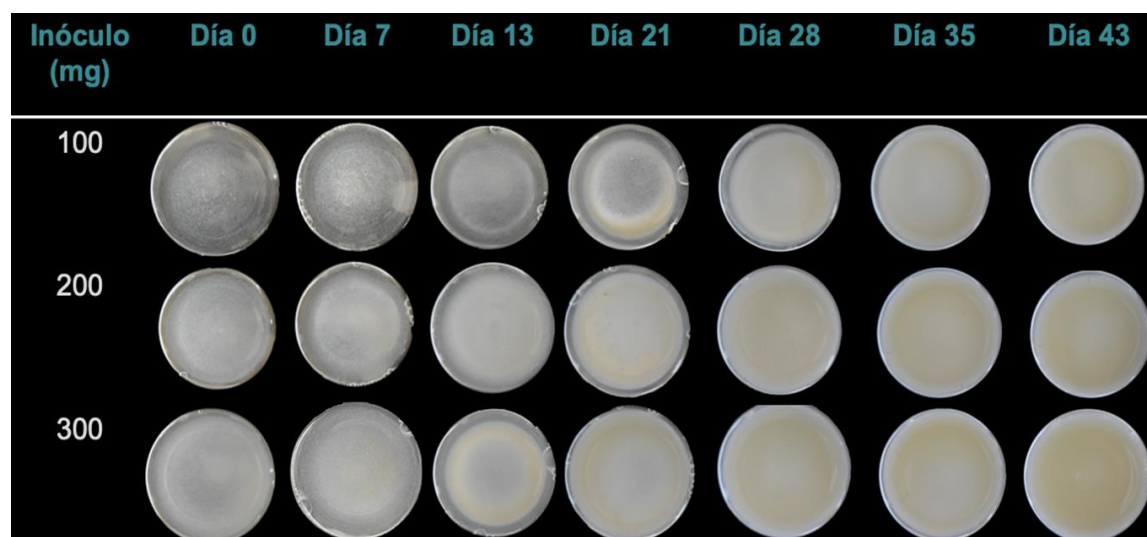
2.3.2 Prueba de inóculo en suspensiones celulares de *C. arabica*

El tamaño del inóculo inicial tiene una gran influencia en el crecimiento del cultivo. Por ello, es importante determinar el tamaño óptimo de dicho inóculo. Debe ser de un tamaño que permita un crecimiento adecuado, pero no tan grande que sólo crezca un par de días y agote los nutrientes del medio. Para determinar el tamaño del inóculo se evaluaron tres tamaños de inóculo (100, 200 y 300 mg) en matraces de 250 mL con 45 mL de medio de cultivo de mantenimiento (Cuadro A.1, en el anexo) y se evaluaron los siguientes parámetros: peso fresco, peso seco, pH y CE durante los días 0, 7, 13, 21, 28, 35 y 43. Para el establecimiento

de la prueba se colocó el contenido de 10 matraces con SC de 15 días en un vaso de precipitados de 1000 mL, se dejaron reposando por 30 minutos. Se retiró el medio por decantación y se tomaron tres alícuota de 1 mL, las cuales se colocaron de manera individual en un equipo de filtrado durante un minuto a vacío, el resultado del peso fresco se promedió y con base en ello se utilizó el volumen necesario para inocular las cantidades de material previamente mencionadas. El volumen de cada matraz se completó con el mismo medio a 50 mL, una vez que se inoculó cada matraz. Se realizaron tres réplicas técnicas.

El crecimiento estuvo relacionado con el tamaño del inóculo. Visualmente, en el día cero se distinguió claramente la cantidad inicial de inóculo. Conforme pasaba el tiempo empezaron a mostrar una mayor densidad. En el Cuadro 2.1 se puede apreciar claramente que el máximo de densidad fue alcanzado por cada uno de los inóculos en días diferentes. De manera visual se observó un incremento del crecimiento para el inóculo de 100 mg para el día 28, por lo que se podría realizar el subcultivo el día 21, en tanto los inóculos de 200 y 300 mg podrían subcultivarse a partir del día 13 hasta el 21. El último día de evaluación, a pesar de tener una elevada densidad celular las SC no mostraron signos de oxidación, simplemente pasaron de tener una apariencia blanca-lechosa a blanca-amarillenta (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Documentación fotográfica de las SC de *C. arabica* con tres tamaños de inóculo durante un periodo de 43 días.



2.3.2.1 Determinación de los pesos fresco y seco

La duración del ciclo de cultivo con base en los PF y PS fue una función directa del tamaño del inóculo inicial. En ambas pruebas se puede observar que a mayor tamaño de inóculo, mayor es la biomasa final y las etapas de crecimiento se alcanzan en menor tiempo. El inóculo de 300 mg llegó a la fase estacionaria tanto para la prueba de PS como de PF el día 35 con un peso de 7.74 g. de PF y 5.68 g de PS. En el inóculo de 200 mg solo se pudo observar la fase de crecimiento desacelerado para PF y la fase estacionaria el día 35 para el PS con un peso de 5.30 g. La prueba de PF para el inóculo de 100 mg solo alcanzó la fase exponencial y un cambio a la fase de crecimiento desacelerado; sin embargo, no se pudo observar un ciclo de cultivo completo (Figura 2.2). Los resultados fueron de utilidad para el mantenimiento del cultivo; así mismo, permitió elegir un tamaño de inóculo para realizar la caracterización de las SC.

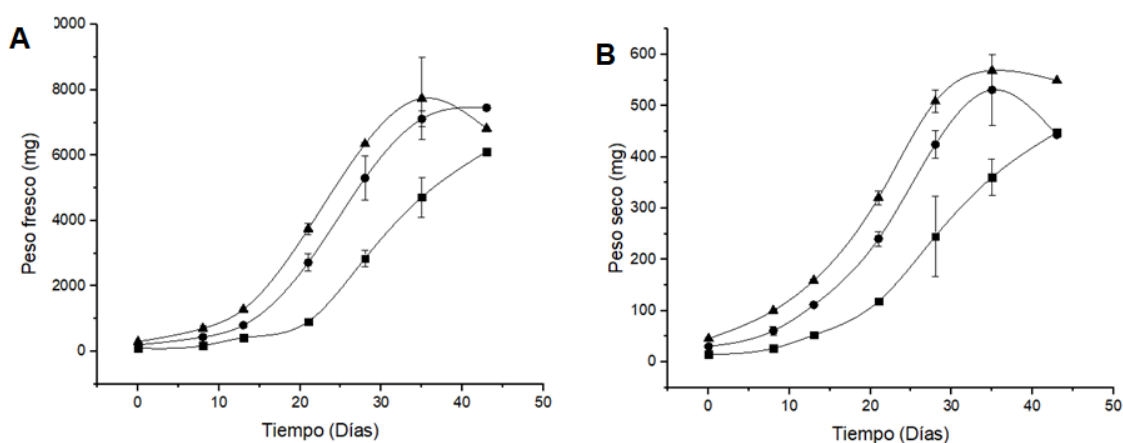


Figura 2.2 Ciclo de cultivo de suspensiones celulares de *C. arabica* con tres tamaños de inóculo. Se inocularon (■) 100, (●) 200 y (▲) 300 mg células en 50 mL de medio MPA. El medio consistió en las sales basales del MS a la mitad de su potencial iónico, suplementado con 11.5 μ M de 2,4-D y 4.4 μ M de BA. La evaluación se realizó durante 43 días. A) Peso fresco. B) Peso seco.

Los parámetros de crecimiento con respecto al tamaño de inóculo no mostraron diferencias sustanciales. Sin embargo, el índice de crecimiento fue superior a menor tamaño de inóculo. La velocidad de crecimiento disminuyó a mayor cantidad de células, mientras que el tiempo de duplicación se prolongó a mayor cantidad de inóculo (Cuadros 2.2 y 2.3). Con base en estos resultados y los ciclos de cultivo de la Figura 2.2 se eligió el tamaño de inóculo de 200 mg para realizar la caracterización de las SC.

Cuadro 2.2 Parámetros de crecimiento para la prueba de PF de SC de cafeto.

Parámetro de crecimiento	100	200	300
Índice de crecimiento	1.33	0.82	0.82
Velocidad de crecimiento	0.17	0.12	0.12
Tiempo de duplicación (días)	4.09	5.78	5.76

Cuadro 2.3 Parámetros de crecimiento para la prueba de PS de SC de cafeto.

Parámetro de crecimiento	100	200	300
Índice de crecimiento	3.41	2.66	2.49
Velocidad de crecimiento	0.11	0.10	0.10
Tiempo de duplicación (días)	6.07	6.94	7.22

2.3.2.2 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo

La conductividad eléctrica es un parámetro de crecimiento indirecto, el cual está relacionado con la absorción de nutrientes por parte de las células, principalmente el nitrato. La CE de los tres tamaños de inóculo disminuyó conforme el ciclo de cultivo avanzaba, y fue menor a mayor tamaño de inóculo. La CE del día 8 fue de 3.2, 3.03 y 2.7 mS cm⁻¹ para los tamaños de inóculo de 100, 200 y 300 mg, respectivamente. En el día 21 se pudo observar una caída drástica en la CE de los inóculos de 200 y 300 mg, mientras que ésta se observó hasta el día 35 para el inóculo de 100 mg. A partir de esos días, los cambios en la CE se mantuvieron constantes, lo que podría reflejar que las SC están entrando a la fase de crecimiento desacelerado o estacionario. La CE del último día de la evaluación fue de 0.3, 0.1, y 0.05 mS cm⁻¹ para los tamaños de inóculo de 100, 200 y 300 mg, respectivamente (Figura 2.3a).

El medio utilizado para esta prueba fue el medio MPA (Cuadro A.1, en el anexo) cuya sales basales son las del medio MS, por tanto, contaba con una fuente de nitrato y amonio, cuyo pH fue ajustado inicialmente a 5.8. El pH del medio de cultivo para el día ocho tuvo una disminución a 5.0, 5.0 y 5.1 para los inóculos de 100, 200 y 300 mg, respectivamente. El día 14 se pudo observar un moderado incremento del pH. Posteriormente mostraron fluctuaciones ascendentes y descendentes (Figura 2.3b).

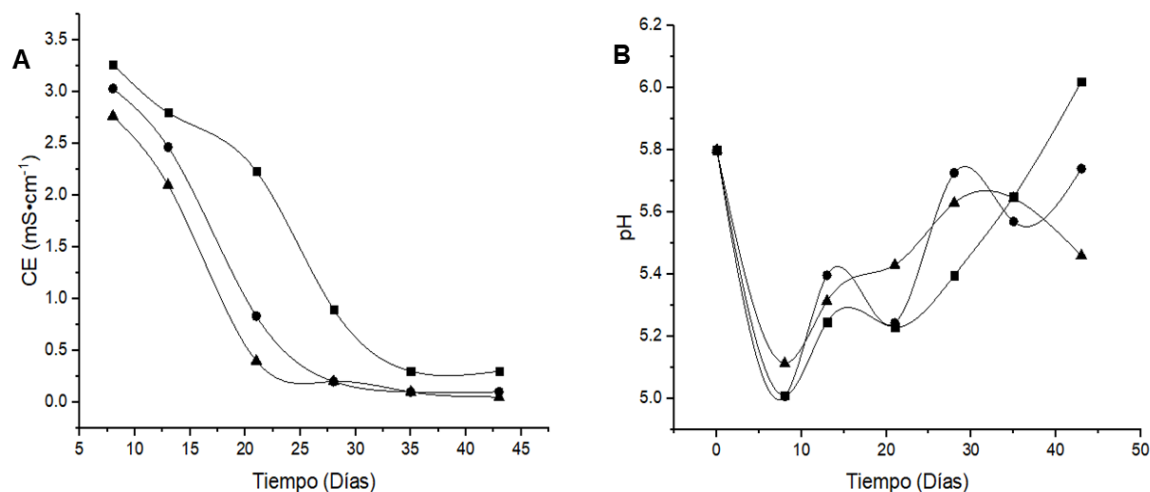


Figura 2.3 Conductividad eléctrica y pH de suspensiones celulares de *C. arabica* con tres tamaños de inóculo. Se inocularon (■) 100, (●) 200 y (▲) 300 mg células en 50 mL de medio MPA. El medio consistió de las sales basales del MS a la mitad de su potencial iónico, suplementado con 11.5 μM de 2,4-D y 4.4 μM de BA. La evaluación se realizó durante 43 días. A) Conductividad eléctrica. B) pH.

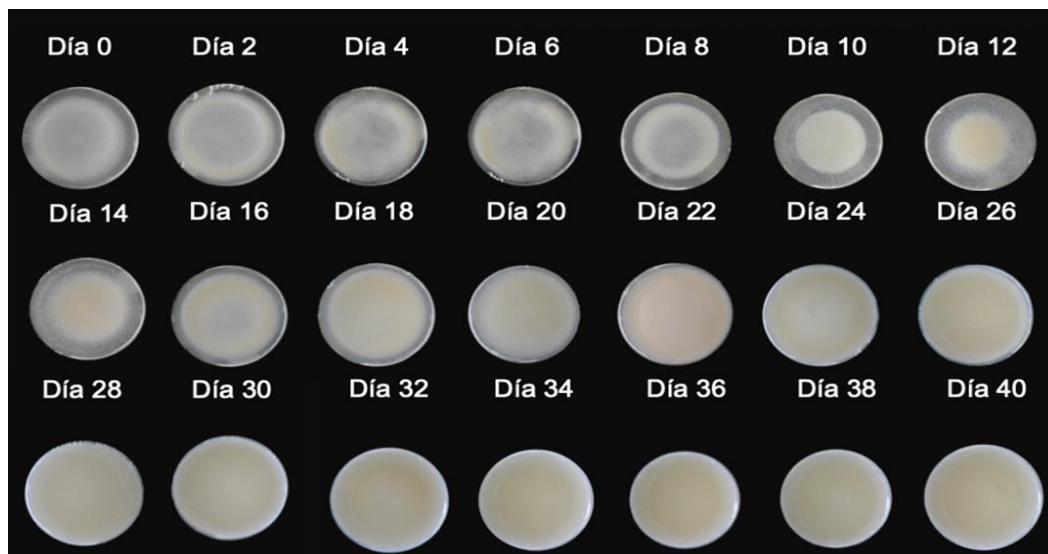
2.3.3 Caracterización de las suspensiones celulares de *C. arabica*

Una vez concluida la prueba de inóculo se realizó la caracterización de la línea celular de cafeto. Se eligió establecer el cultivo usando un inóculo inicial de 200 mg dado que para la prueba de PS se logró observar un ciclo de cultivo completo y porque los parámetros de crecimiento del inóculo de 200 y 300 mg no presentaron una variación significativa. El ciclo de cultivo se realizó evaluando los siguientes parámetros: paquete celular, peso fresco, peso seco, conductividad, pH y viabilidad por un periodo de 40 días; el muestreo se realizó cada dos días. La prueba constó de tres replicas biológicas. El inóculo utilizado provino de SC de 19 días previamente establecidas con un inóculo de 300 mg. El contenido de 10 matraces se colocó en un vaso de precipitados de 1000 mL con un colador con un tamaño de malla de 1 mm, se dejó sedimentar por 30 minutos y posteriormente se tomaron tres alícuotas de 1 mL que se colocaron en un equipo de filtrado a vacío por un minuto. Se promediaron los resultados y por equivalencia se inocularon 200 mg usando una micropipeta de 5000 μL en matraces de 250 mL con 45 mL de medio de cultivo de mantenimiento (Cuadro A.1, en el anexo). Se aforó a 50 mL con el mismo medio de cultivo.

El curso temporal del crecimiento de las SC mostró una densidad celular elevada a partir del día 16. A partir del día 20 y hasta el último día de la evaluación la densidad celular cubrió la

base del matraz por lo que no se pudo distinguir entre los días de cultivo. A pesar del elevado crecimiento no presentaron oxidación (Cuadro 2.4).

Cuadro 2.4 Crecimiento de SC de *C. arabica* inoculadas con 200 mg de células durante un ciclo de cultivo de 40 días.



2.3.3.1 Peso fresco y peso seco

El ciclo de cultivo de las suspensiones celulares de *C. arabica* con base en los pesos fresco y seco mostraron todas las fases de crecimiento. La fase de retardamiento abarcó del día 0 al día 6 en ambos casos. El ciclo de cultivo medido a través del PF tuvo una fase exponencial del día 8 al día 18. La fase lineal terminó el día 34, a partir de ese día se pudo observar la fase de crecimiento desacelerado y al final del ciclo la fase estacionaria. La biomasa acumulada al día 38 fue de 1.03 g de peso fresco y 633.45 mg de peso seco el día 36 (Figura 2.4). El índice de crecimiento fue de 4.81 para el PF y de 2.95 para el PS. La velocidad de crecimiento fue de 0.18 y 0.14 para el PF y PS, respectivamente, y el tiempo de duplicación fue de 3.94 para el PF y de 5.04 días para el PS. La diferencia en los valores de los parámetros estudiados en relación con los pesos fresco y seco, es algo común, ya que son parámetros relativos.

2.3.3.2 Paquete celular y viabilidad

El volumen del paquete celular aumentó progresivamente con el tiempo en cultivo. Este valor está relacionado con los parámetros de peso seco, peso fresco y de manera indirecta con la conductividad eléctrica. El valor inicial fue de 4% e incrementó a 60% para el último día de

evaluación (Figura 2.5a). La disminución en la disponibilidad de nutrientes con respecto al crecimiento celular suele estar asociada a la viabilidad. La viabilidad fue de 72.28%. El día 6 se observó un ligero incremento que coincidió con el inicio de la fase exponencial donde se obtuvo un 87.86%. El valor para la prueba fue de 34.71% para el último día evaluado (Figura 2.5b).

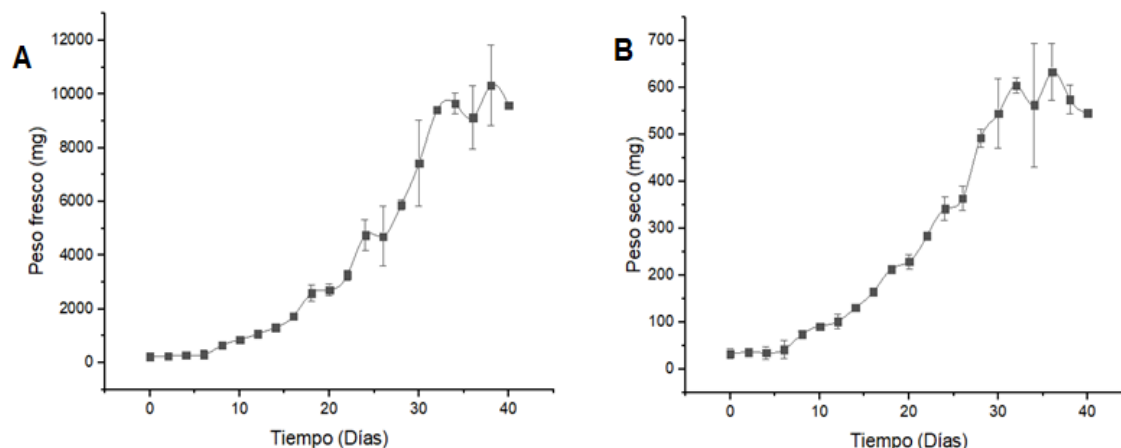


Figura 2.4 Ciclo de cultivo con base al peso fresco y peso seco en SC de *C. arabica*. Se inocularon 200 mg de células en 50 mL de medio MA. El medio consistió de las sales basales del MS, suplementado con 3.9 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina. La evaluación se realizó durante 40 días. A) Peso fresco. B) Peso seco.

2.3.3.3 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo

Los resultados de la prueba de CE mostraron un cambio descendente conforme avanzó el ciclo de cultivo. La conductividad del día 0 fue de 7.77 mS cm^{-1} y la conductividad final fue de 0.90 mS cm^{-1} . Los resultados de la prueba tuvieron relación directa con el crecimiento celular de las pruebas de peso fresco y peso seco (Figura 2.6a).

El pH que se obtuvo el día cero fue de 5.4. El día 2 descendió 0.2 puntos, siendo este valor el más bajo durante el ciclo de cultivo. Después de día 4, el pH continuó incrementando a medida que pasaban los días hasta mantenerse entre 5.8 y 6.0 del día 12 al día 20, después del día 20 el pH tuvo varias fluctuaciones parecidas a las de la prueba de inóculo. Esto podría deberse a la absorción diferencial de la fuente de nitrógeno o al inconveniente con el potenciómetro que se mencionó en la prueba de inóculo, ya que la desviación estándar fue muy elevada para varios días de medición (Figura 2.6b).

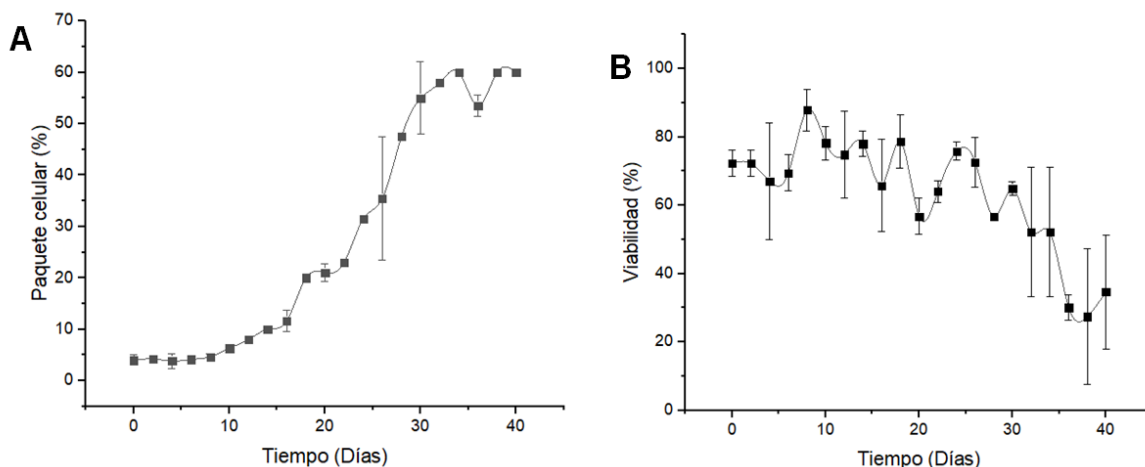


Figura 2.5 Ciclo de cultivo con base al volumen del paquete celular y viabilidad en SC de *C. arabica*. Se inocularon 200 mg de células en 50 mL de medio MA; el medio contenía las sales basales del MS, suplementado con 3.9 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina. La evaluación se realizó durante 40 días.

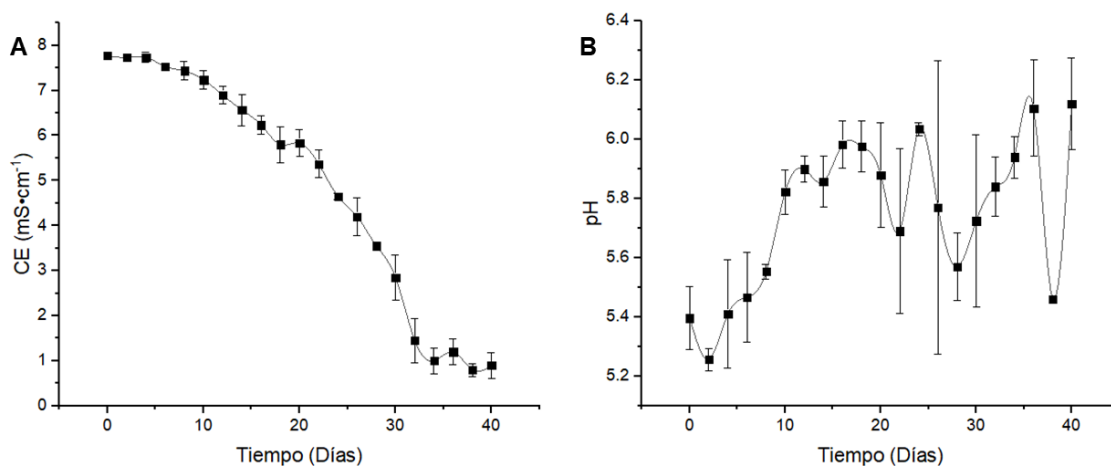


Figura 2.6 Resultados de la prueba de conductividad eléctrica y pH en suspensiones celulares de *C. arabica* evaluadas durante 40 días. Se inocularon 200 mg de células en 50 mL de medio MA; sales basales MS, suplementado con 3.9 μM de 2,4-D y 9.3 μM de cinetina el pH del medio se ajustó a 5.8. A) Conductividad eléctrica. B) pH.

2.3.4 Inducción de la embriogénesis somática en *C. arabica*

Para la inducción de la ES en *C. arabica* se colocaron 200 mg de células en medio de pre-acondicionamiento durante 42 días. Posteriormente se cambiaron al medio de inducción en el cual se inocularon 100 mg de células en 50 mL de medio de cultivo en matraces de 250 mL. Después de dos meses de evaluación no se observaron embriones somáticos. Esto pudo deberse al tamaño de inóculo inicial, el cual, a pesar de ser un inóculo pequeño, incrementó de manera considerable su densidad celular (Figura 2.2). Se ha demostrado que las altas densidades celulares pueden inhibir la embriogénesis somática. Posteriormente se probó con

un inóculo de 50 mg en 50 mL en un matraz de 250 mL con el medio anteriormente mencionado, sin embargo, la evaluación no se logró terminar.

2.3.5 Establecimiento de suspensiones celulares de *P. americana*

Se recibieron 10 cajas Petri con callos de aguacate 'Hass' provenientes del INECOL, cada una tenía un número de identificador diferente. Por tanto, el establecimiento de las SC se hizo de manera individual. Dada la cantidad y calidad del material se establecieron las SC colocando aproximadamente un gramo de callo en matraces Erlenmeyer de 125 mL con 25 ± 5 mL de medio de mantenimiento MSP (Cuadro A.2, en el anexo), ya que era el medio de cultivo en el cual había sido enviado el material. El medio MSP está compuesto por sales basales MS suplementado con $0.41 \mu\text{M}$ de picloram. Posteriormente se supo que las 10 cajas con callos no eran accesiones diferentes sino que solo habían dos tipos de callo; embriogénico y no embriogénico (NE), por lo que se agruparon las SC previamente iniciadas de manera individual para formar dos líneas de SC, las cuales fueron colocadas en matraces de 250 mL con 50 mL de medio de cultivo MSP. A los 60 días se logró tener suspensiones celulares con apariencia arenosa, debido al tamaño de los agregados celulares (Figura 2.7). Así mismo, las SC mostraron una tasa lenta de crecimiento.

A pesar de filtrar las células durante cada cambio de medio, el tamaño de los agregados continuó siendo mayor que el de los agregados de las SC de café y no se logró obtener una SC de apariencia fina lechosa.

Cuando se obtuvo una cantidad suficiente de material para realizar una prueba de inóculo se evaluó el PF y el pH de tres tamaños de inóculo 100, 200 y 300 mg en las líneas celulares 'Hass' embriogénico y 'Hass' no embriogénico. El inóculo se colocó en 50 mL de medio MSP (Cuadro A.2, en el anexo) en matraces de 250 mL. Los días evaluados fueron el día 0, 7, 14 y 21. La línea embriogénica, para los tres tamaños de inóculo inició la fase estacionaria en el día 14. De los tres tamaños de inóculo solo el de mayor tamaño mostró un ligero crecimiento, acumulando 485 mg de PF en el día 14 (Figura 2.8a). El pH del inóculo de 300 mg mostró un descenso drástico de 5.7, que fue el pH previa esterilización, a 2.75 que fue la lectura del día 7. El pH se mantuvo por debajo de 3 hasta que terminó la evaluación. El pH de los otros dos tamaños descendió a 3.6 el día 7, ascendió ligeramente pero se mantuvo por debajo de 4 (Figura 2.8b). Cabe resaltar que visualmente las SC mostraron una densidad celular

moderadamente elevada con un tamaño de grumo elevado; sin embargo, al momento de filtrarlas se pudo notar que su consistencia era de tipo cremoso, lo que provocó que al someterlas a vacío parte de los componentes de los agregados se impregnaran en el papel filtro impidiendo recolectarlos dando como resultado un bajo peso final.

El inóculo de 300 mg de la línea no embriogénica mostró el inicio de la fase de crecimiento desacelerado el día 14. Los otros dos tamaños se mantuvieron en la fase de crecimiento lineal. La biomasa acumulada el día 14 fue de 267.6, 444.6 y 560.4 mg para el inóculo de 100, 200 y 300 mg, respectivamente (Figura 2.9a). El pH de los tres tamaños de inóculo mostró una tendencia similar; el día 7 descendió a 3.2 y se mantuvo alrededor del pH 3 durante lo que restó de la prueba (Figura 2.9b).

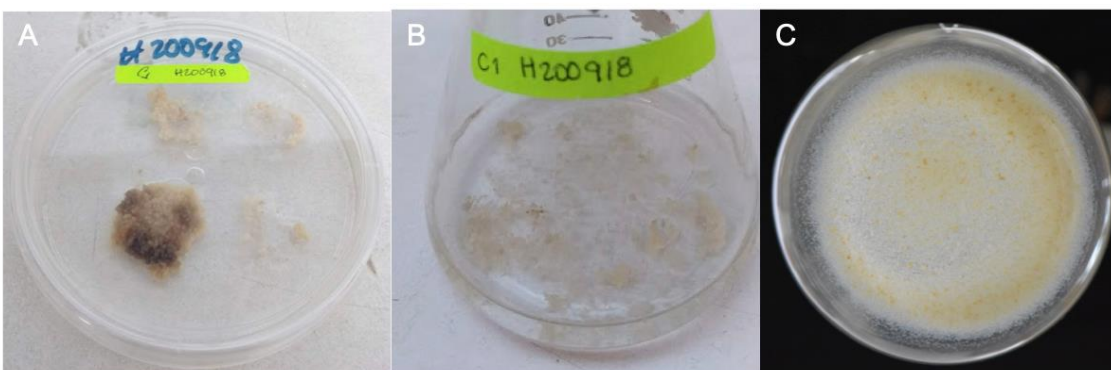


Figura 2.7 Establecimiento de suspensiones celulares de *P. americana*. El callo friable se disgregó en medio líquido de mantenimiento en matraces Erlenmeyer incubados a 25 ± 2 °C en la oscuridad a 100 rpm. A) Callo friable. B) Medio de mantenimiento inoculado al día 0. C) Suspensiones celulares al día 60.

Después de realizar la prueba de inóculo se detectó un problema de contaminación por ácaros. Se revisó cuidadosamente de manera visual cada matraz de SC y se desecharon los que presentaron contaminación. Al material sin aparente contaminación se le realizó una prueba cualitativa para corroborar su asepsia. Se tomó una alícuota de 100 μ L de SC de cada matraz y se colocaron en frascos de 50 mL con 10 mL de medio MS semi-sólido, se incubaron en oscuridad a 25 °C. Un mes después se hizo una inspección visual y también con ayuda de un estereoscopio. Los frascos contaminados se desecharon y el material aparentemente aséptico se subcultivó bajo las mismas condiciones ahora en medio MSP. Este proceso se repitió dos veces más. Asimismo, alrededor del noveno mes se detectó la pérdida de la capacidad embriogénica en las SC de tipo embriogénicas. Por lo que la prueba de medios, la prueba de inóculo y la caracterización de SC de aguacate 'Hass' se realizaron en SC no embriogénicas.

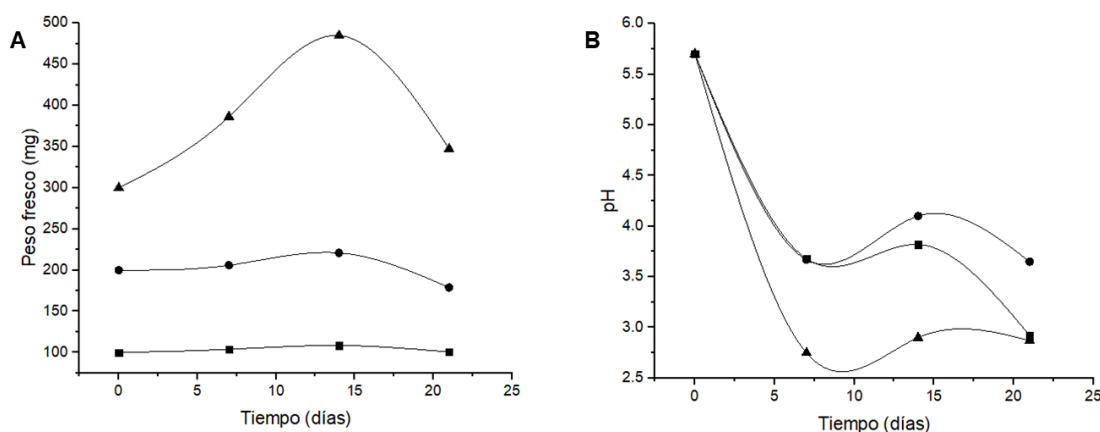


Figura 2.8 Prueba de inóculo en SC de aguacate 'Hass' embriogénico. Se inocularon (■) 100, (●) 200 y (▲) 300 mg de células en 50 mL de medio MSP; sales basales del medio MS, suplementado con 0.41 μM de picloram durante 21 días. A) Peso fresco. B) pH.

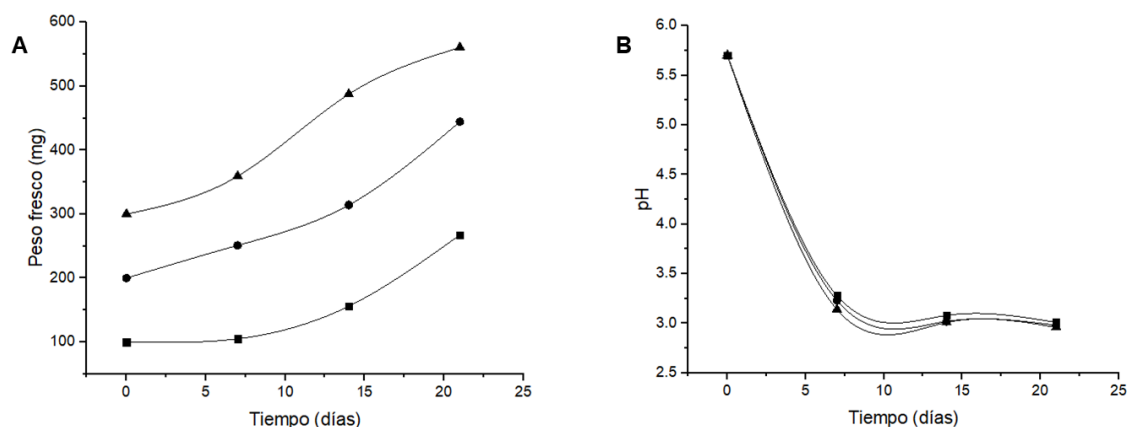


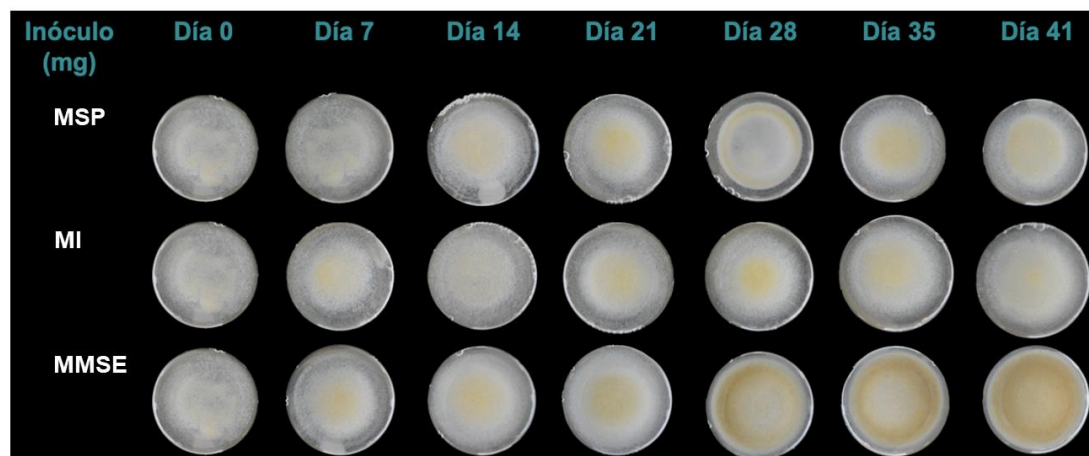
Figura 2.9 Prueba de inóculo en SC de aguacate 'Hass' no embriogénico. Se inocularon (■) 100, (●) 200 y (▲) 300 mg en 50 mL de medio MSP; sales basales del medio MS, suplementado con 0.41 μM de picloram durante 21 días. A) Peso fresco. B) pH.

Dado que el crecimiento de las SC era muy bajo se realizó una prueba de medios para evaluar el medio de cultivo MMSE que fue originalmente diseñado para la inducción de la ES en mango (Pateña et al., 2002). Este medio está compuesto por los macronutrientes del medio MS, micronutrientes del medio B₅, suplementado con 1.9 μM de 2,4-D utilizado por López Encina et al., (2014) y O'Brien et al., (2018) para mejorar el mantenimiento y capacidad de regeneración de embriones somáticos de aguacate.

Se realizó un ciclo de cultivo usando tres medios de cultivo: 1) medio MSP que es el medio en el cual se establecieron y se mantuvieron las SC, 2) medio MI que es un medio usado para la inducción de la ES y cuya fuente de nitrógeno es parecido a la del medio MMSE ya que consiste en macronutrientes del medio MS y micronutrientes del medio B₅ y el medio MMSE, y 3) medio MMSE (Cuadro A.2, en el anexo). El material usado como inóculo inicial para la prueba de medios se encontraba en medio de mantenimiento MSP. Se inocularon 130 mg de células en 50 mL de medio en matraces de 250 mL. El material se incubó a 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad a 100 rpm, y se realizaron evaluaciones de PF, PS, CE y pH los días 0, 7, 14, 21, 27, 35 y 41.

Las SC en los medios MSP y MI a partir del día 14 se mantuvieron con cambios menores. Los matraces con mayor cantidad de células se asemejaron a las SC en medio MMSE del día 7. Las SC en medio MMSE mostraron una elevada densidad celular a partir del día 14 con una apariencia blanca-amarillenta. Después del día 14 la densidad celular fue muy abundante y el color de las SC se torna amarillo-marrón (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5 Crecimiento de SC de *P. americana* en tres medios de cultivo durante un ciclo de 41 días.



Los resultados de las pruebas de PF y PS mostraron un comportamiento similar. El PF de las SC en medio MSP se mantuvo en un rango de 130 a 300 mg a lo largo del ciclo del cultivo, mientras que las SC en medio MI no sobrepasaron los 200 mg. Las SC en medio MMSE mostraron un elevado crecimiento con respecto a los otros dos medios. En la Figura 2.10a se puede observar una biomasa acumulada de 3.24 g hasta la etapa de crecimiento lineal (Figura

2.10a). En cuanto a la prueba de PS, las SC en medio MSP y MI no sobrepasaron los 60 y 40 mg, respectivamente, tomando en cuenta un peso inicial para el día 0 de 30 mg. Las SC en medio MMSE acumularon 746.5 mg de biomasa el último día de evaluación. Así mismo, se pudo observar el inicio de la fase de crecimiento desacelerado (Figura 2.10b). La biomasa acumulada en el medio MMSE con la prueba de PS fue mayor que la de la prueba de PF para los medios MSP y MI por lo que se decidió utilizar este medio de cultivo para repetir la prueba de inóculo y la caracterización.

El pH del medio de cultivo debe ser ligeramente ácido y a lo largo del ciclo del cultivo se espera que varíe dependiendo de la fuente de nitrógeno que estén utilizando las células. El pH de los tres medios se ajustó a 5.7 previa esterilización. Para esta prueba se tomó el pH alrededor de seis horas después de la inoculación a diferencia de la prueba de inóculo en medio MSP de la Figura 2.9 cuando el pH del día 0 se tomó en cuenta como el pH previo a la esterilización. Es importante que para futuros trabajos utilizando el medio MSP y MI se mida el pH del medio después de la esterilización para poder verificar si son las células las que en cuanto son inoculadas liberan compuestos que reducen significativamente el pH o si es más bien un efecto provocado por la esterilización. El pH para el día 0 fue de 4.12, 3.97, 4.78 para los medios MSP, MI y MMSE, respectivamente. Hasta el día 14 el comportamiento del pH de las SC en los tres medios de cultivo no varía significativamente; sin embargo, después de esa fecha, el pH de las SC en medio MSP y MI se mantuvo constante alrededor de 3, mientras que el pH de las SC en medio MMSE comenzó a aumentar hasta llegar a 6.49 (Figura 2.11a). Esto podría sugerir que las células que se mantienen en un pH ácido no tienen la capacidad de absorber los nitratos.

La CE del medio MSP del día 7 se mantuvo entre 7.5 y 7.8 a lo largo del ciclo de cultivo y para el medio MI entre 5.3 y 4.8. La CE del medio MI y MMSE tuvo un comportamiento similar hasta el día 14 ya que su fuente de nitrógeno era la misma. Después de esa fecha la CE de las SC en medio MMSE continuó disminuyendo hasta 2 mS para el día 41. Al ser la CE una prueba que se relaciona indirectamente con el crecimiento celular, los resultados podrían sugerir que las SC en los medios MSP y MI no estaban absorbiendo los nutrientes del medio, a diferencia de las SC que se encontraban en el medio MMSE (Figura 2.11b).

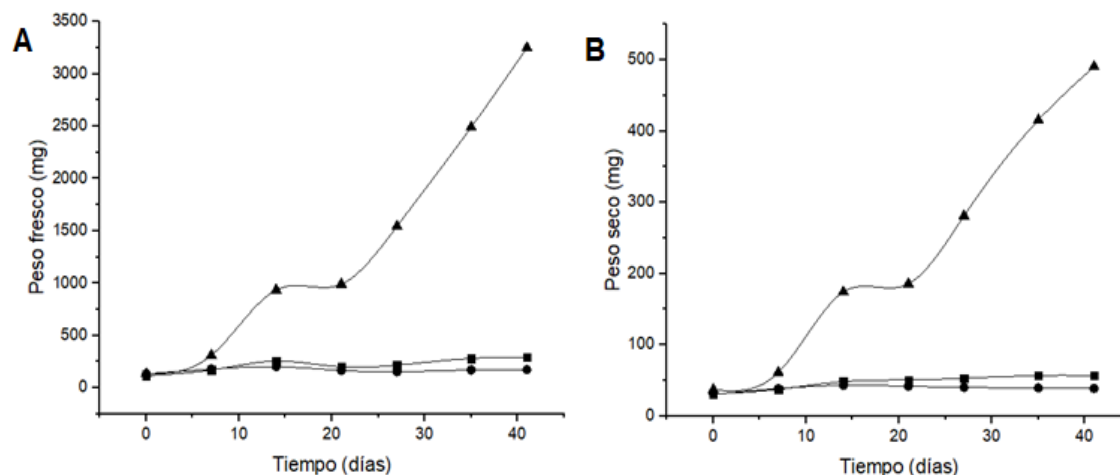


Figura 2.10 Evaluación del crecimiento de suspensiones celulares 'Hass' no embriogénicas en tres medios de cultivo. (■) Medio de mantenimiento (MSP) compuesto de sales basales MS suplementado con $0.41 \mu\text{M}$ de picloram, (●) edio de inducción (MI) compuesto por macronutrientes del medio MS y micronutrientes del medio B₅, suplementado con $0.41 \mu\text{M}$ de picloram, (▲) mMedio de inducción para mango MMSE compuesto por macronutrientes del medio B₅, micronutrientes y vitaminas del medio MS suplementado con $1.9 \mu\text{M}$ de 2, 4-D en matraces de 250 mL con 50 mL de medio con 130 mg de inóculo. El ciclo de cultivo se evaluó durante 41 días. A) Peso fresco. B) Peso seco.

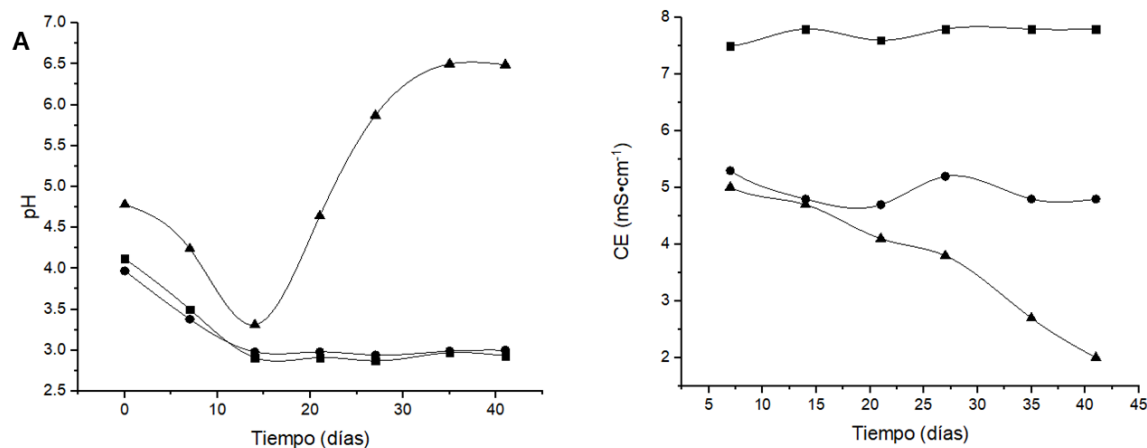


Figura 2.11 Evaluación del pH y CE en SC de aguacate 'Hass' no embriogénicas en tres medios de cultivo. (■) Medio de mantenimiento (MSP) compuesto de sales basales del medio MS suplementado con $0.41 \mu\text{M}$ de picloram, (●) medio de inducción (MI) compuesto por macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS, suplementado con $0.41 \mu\text{M}$ de picloram, (▲) medio de inducción para mango MMSE compuesto por macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS adicionado con $1.9 \mu\text{M}$ de 2, 4-D en matraces de 250 mL con 50 mL de medio con 130 mg de inóculo. El ciclo de cultivo se evaluó durante 41 días. A) pH. B) Conductividad eléctrica.

Los parámetros de crecimiento de las SC en los tres medios de cultivo fueron similares para la prueba de PF y PS. El medio de cultivo en el que las células mostraron mejores resultados fue el MMSE, ya que su índice de crecimiento fue de prácticamente el triple y cuádruple con respecto al del medio MPS y MI, respectivamente. Así mismo, presentó una mayor velocidad de crecimiento y se duplicó en menor tiempo (Cuadros 2.6 y 2.7).

Cuadro 2.6 Parámetros de crecimiento para la prueba PF en tres medios de cultivo para SC de aguacate 'Hass'.

Parámetro de crecimiento	MPS	MI	MMSE
Índice de crecimiento	0.45	0.33	1.30
Velocidad de crecimiento	0.05	0.04	0.12
Tiempo de duplicación	13.17	17.22	5.82

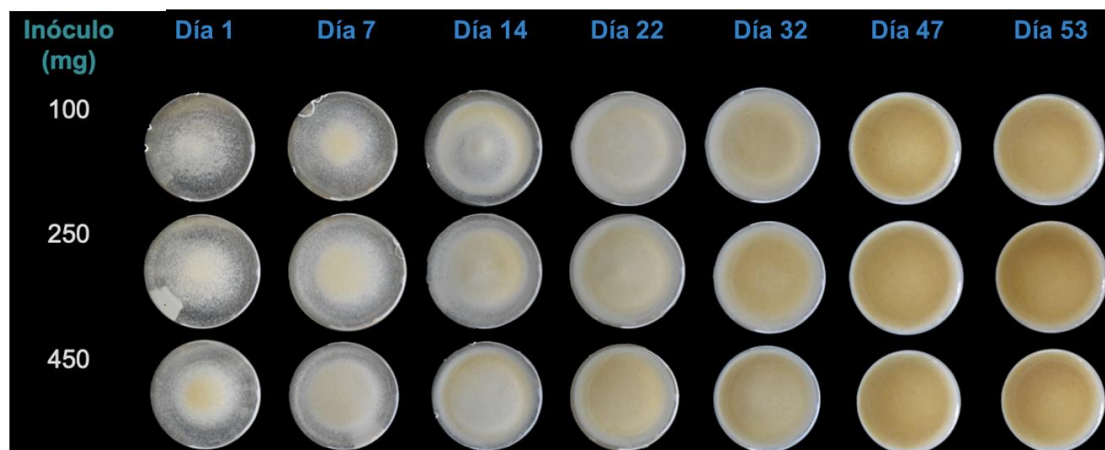
Cuadro 2.7 Parámetros de crecimiento para la prueba PS en tres medios de cultivo para SC de aguacate 'Hass'.

Parámetro de crecimiento	MPS	MI	MMSE
Índice de crecimiento	0.21	0.28	0.64
Velocidad de crecimiento	0.03	0.03	0.07
Tiempo de duplicación	25.21	19.89	9.76

2.3.6 Prueba de inóculo en suspensiones celulares de *P. americana*

Después de haber obtenido resultados favorables con respecto al crecimiento de las SC con el medio MMSE (Figura 2.7) se procedió a realizar una prueba de inóculo. Se evaluaron tres tamaños de inóculo (100, 250 y 450 mg) en 50 mL de medio de cultivo previamente mencionado. Se utilizaron SC de 20 días que se encontraban en medio MMSE. Se evaluaron los siguientes parámetros: peso fresco, peso seco, pH y CE los días 1, 7, 14, 22, 32, 41, 47 y 53 días.

La densidad celular obtenida fue una función del tamaño del inóculo. El día 22 se cubrió por completo la base del matraz con inóculos de 100 y 200 mg y la apariencia de las SC se mantuvo de un color blanco-amarillento. Lo mismo ocurrió el día 14 en las SC con 450 mg de inóculo. A partir del día 47 fue difícil distinguir el tamaño de inóculo, ya que la densidad celular fue muy elevada y el color de las SC cambió a marrón (Cuadro 2.8).

Cuadro 2.8 Crecimiento de SC de *P. americana* con tres tamaños de inóculo durante un ciclo de 53 días.

2.3.6.1 Peso fresco y peso seco

El ciclo de cultivo no mostró fases definidas, ya que desde el primer día de inoculación las SC comenzaron a incrementar su peso de manera sustancial. El peso fue mayor a mayor tamaño de inóculo para ambas pruebas. A pesar de haber probado inóculos cuya diferencia fue significativa entre el de menor y mayor tamaño, la cantidad de biomasa acumulada fue relativamente parecida. El inóculo de 450 mg inició la fase estacionaria después del día 47 con un PF de 8.9 g para ese día. El último día de la evaluación, el PF de las SC con inóculos de 250 y 450 mg fue de 7.1 y 8.3 g, respectivamente.

Al igual que para el ciclo de cultivo con base en el PF, no se lograron apreciar definidamente todas las etapas del ciclo de cultivo con base en el PS. Esto se debió posiblemente a que los días de evaluación estuvieron muy espaciados durante los primeros días. La fase estacionaria se inició el día 47 en las SC con inóculo de 100 y 250 mg. La cantidad de PS fue muy similar para ambos tamaños 650.2 y 693.6 mg, respectivamente. Las SC con 450 mg continuaron creciendo ligeramente y acumularon 746.5 mg de PS. La elevada densidad celular y el alto contenido de sacarosa provocó inconvenientes con la liofilización (Figura 2.12).

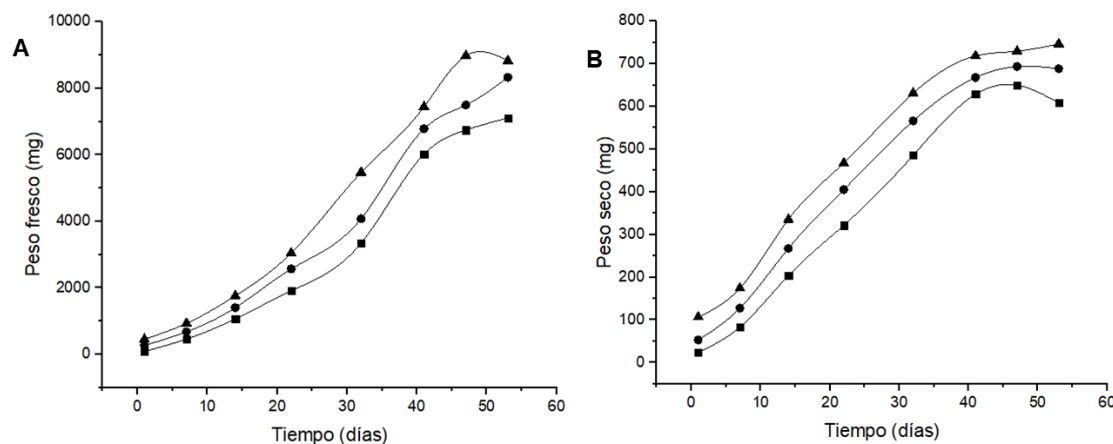


Figura 2.12 Ciclo de cultivo de SC de aguacate 'Hass' con tres tamaños de inóculo. Se inocularon (■) 100, (●) 250 y (▲) 450 mg en 50 mL de medio MMSE; macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS, suplementado con 1.9 μM de 2,4-D. A) Peso fresco. B) Peso seco.

Los parámetros de crecimiento reflejaron el mismo comportamiento para la prueba de PF y PS, en el sentido de que a menor tamaño de inóculo el índice de crecimiento fue mayor, su velocidad de crecimiento fue mayor y se duplicaron en menor tiempo (Cuadro 2.8 y 2.9). La prueba de inóculo se realizó sin réplicas técnicas y los días de muestreo estuvieron muy espaciados, lo que dificultó la identificación de las fases de crecimiento, específicamente la fase exponencial, lo que pudo repercutir en los resultados mostrados. Sin embargo, nos permitió elegir un tamaño de inóculo para la caracterización de las SC, para la prueba de la inducción de la ES y para darle mantenimiento al material.

Cuadro 2.9 Parámetros de crecimiento para la prueba PF con tres tamaños de inóculo de cultivo en SC de aguacate 'Hass'.

Parámetro de crecimiento	100	250	450
Índice de crecimiento	1.31	1.06	0.89
Velocidad de crecimiento	0.12	0.10	0.09
Tiempo de duplicación	5.79	6.72	7.63

Cuadro 2.10 Parámetros de crecimiento para la prueba PS con tres tamaños de inóculo de cultivo de SC de aguacate 'Hass'.

Parámetro de crecimiento	100	250	450
Índice de crecimiento	2.54	1.39	0.64
Velocidad de crecimiento	0.21	0.15	0.08
Tiempo de duplicación	3.29	4.76	8.44

2.3.6.2 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo

El comportamiento de la CE fue muy similar en los tres tamaños de inóculo; sin embargo, se pudo observar que a mayor tamaño de inóculo la CE fue ligeramente menor. La CE del medio de cultivo para el día uno fue de 5.2, 5.0 y 5.1 mS cm^{-1} y fue disminuyendo conforme avanzaba el ciclo de cultivo hasta llegar a 2.1, 1.9 y 1.7 mS cm^{-1} para los inóculos de 100, 250 y 450, respectivamente, hasta el día 32. A partir del día 41, la CE se mantuvo en un rango de 1.4 a 1.6 mS cm^{-1} para los tres tamaños de inóculo hasta que finalizó la evaluación (Figura 2.13a). La prueba de CE es un parámetro indirecto del crecimiento celular, ya que a menor CE, mayor acumulación de biomasa esto se puede comparar con la Figura 2.12 en donde a partir del día 41 las SC comienzan la fase estacionaria y esto se relacionó con la estabilidad en la CE a partir de ese día.

El pH del medio fue ajustado a 5.7 previa esterilización y descendió alrededor de cinco décimas para el primer día. Los valores más bajos se alcanzaron el día 7 con valores de 3.67, 4.01 y 4.73 para los inóculos de 100, 250 y 450 mg, respectivamente; a partir de este día y hasta el 22 el pH fue menor a menor tamaño de inóculo. Después del día 14, el pH fue mayor que el pH inicial, y hubo un ligero incremento los días 22 y 32. Se mantuvo estable en un rango de 5.73 y 5.63 a partir del día 41 hasta el último día de la evaluación (Figura 2.13b).

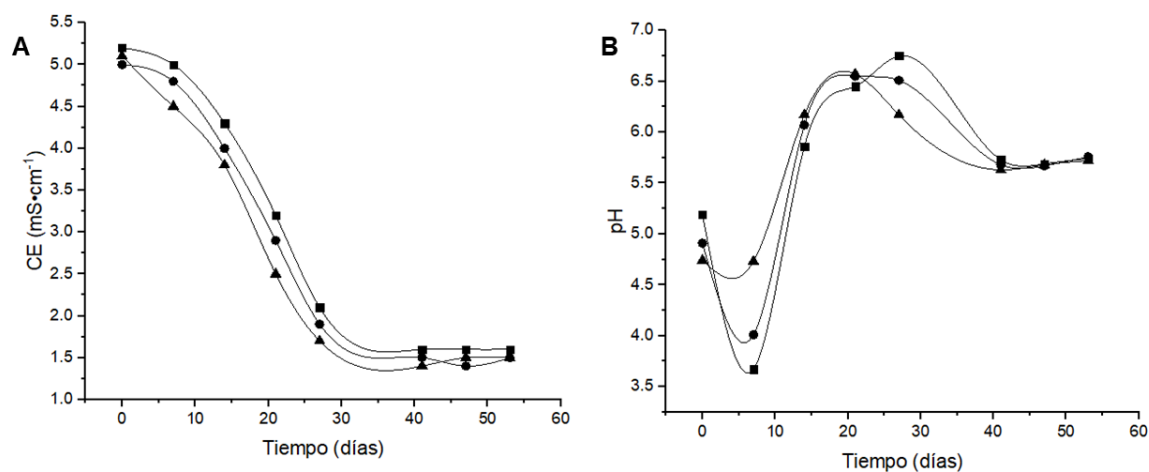
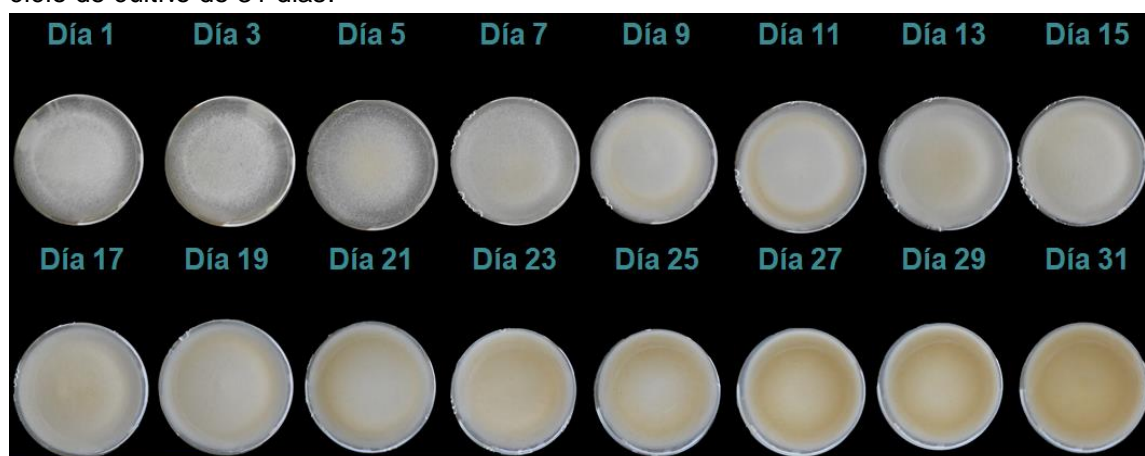


Figura 2.13 Resultados de la prueba de conductividad eléctrica y pH en suspensiones celulares de *P. americana* 'Hass' evaluadas durante 53 días. Se inocularon (■) 100, (●) 250 y (▲) 450 mg en 50 mL de medio MMSE; macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS, suplementado con 1.9 μM de 2,4-D. A) Conductividad eléctrica. B) pH.

2.3.7 Caracterización de las suspensiones celulares de *P. americana*

Una vez concluida la prueba de inóculo se realizó la caracterización de las SC de aguacate 'Hass'. La caracterización se realizó con un inóculo de 450 mg en 50 mL de medio de cultivo MMSE en matraces de 250 mL. Se evaluaron los siguientes parámetros: paquete celular, peso fresco, peso seco, conductividad, pH y viabilidad en días noches durante 33 días. A partir del día 9 se pudo observar un ligero cambio en la coloración de las SC debido al aumento en el volumen celular, lo que podría estar relacionado con el comienzo de la fase de crecimiento exponencial. Los días 15 y 17 mostraron un crecimiento celular que cubrió la base del matraz, sin mostrar aún signos de oxidación. Estos días podrían ser adecuados para realizar los subcultivos para el mantenimiento de las SC, ya que después de día 19 la coloración de las SC cambió ligeramente e incrementó conforme pasaron los días, lo que podría deberse a la presencia de compuestos fenólicos en el medio debido a la elevada densidad celular o el detrimento de los nutrientes en el medio (Cuadro 2.11).

Cuadro 2.11 Crecimiento de SC de *P.americana* 'Hass' inoculadas con 450 mg de células durante un ciclo de cultivo de 31 días.



2.3.7.1 Pesos fresco y seco

El PF incrementó diez veces, pasó de 445.2 mg el primer día a 4561.9 mg para el último día de la evaluación, mientras que el PS aumentó siete veces su biomasa al pasar de 67.7 a 472.5 mg del día 1 al 33 (Figura 2.14). Dado que no se completó el ciclo de cultivo no se pudo identificar correctamente el inicio de las fases de crecimiento, por este motivo no se calcularon los parámetros de crecimiento.

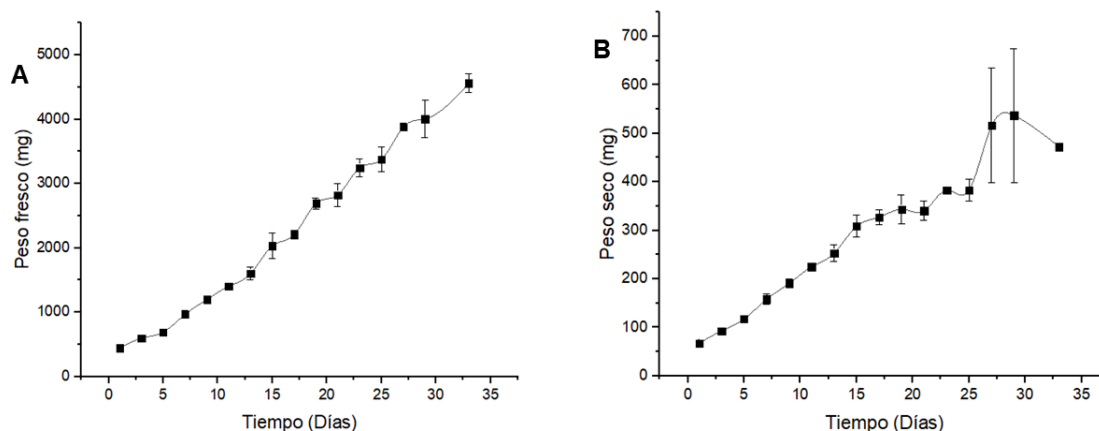


Figura 2.14 Ciclo de cultivo en suspensiones celulares de *P. americana* 'Hass' no embriogénicas. Se inocularon 450 mg de células en 50 mL de medio MMSE; macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS, suplementado con 1.9 μ M de 2,4-D. La evaluación se realizó durante 33 días. A) Peso fresco. B) Peso seco.

2.3.7.2 Paquete celular y viabilidad

El incremento del porcentaje del paquete celular conforme avanza el ciclo de cultivo está relacionado con el incremento en biomasa del cultivo; por lo tanto, se relacionó con las pruebas de los pesos seco y fresco, y de manera indirecta con la conductividad eléctrica. El porcentaje inicial del volumen de paquete celular fue de 2.5% y aumentó 10 veces para el último día (Figura 2.15a). La viabilidad de las SC el primer día fue de 90.74%, después se mantuvo en un rango de 80 a 88% hasta el día 25 y posteriormente disminuyó de 73 a 61% para el último día de evaluación (Figura 2.15b).

2.3.7.3 Conductividad eléctrica y pH del medio de cultivo

La CE del medio de cultivo durante el primer día fue de 5.9 mS cm^{-1} , la cual fue disminuyendo progresivamente con el paso de los días y a medida que las células crecían. La última lectura fue de 2.4 mS cm^{-1} para el día 33. El pH del medio fue ajustado inicialmente a 5.7, y para el día uno ya había disminuido de forma considerable a 5.1, del día tres al día cinco fue cuando el pH fue menor, 3.94 y 4.09; a partir del día 7 comenzó a incrementar, hasta mantenerse estable en un rango de 6.5 a 6.6 a partir del día 17 y hasta finalizar la evaluación (Figura 2.14).

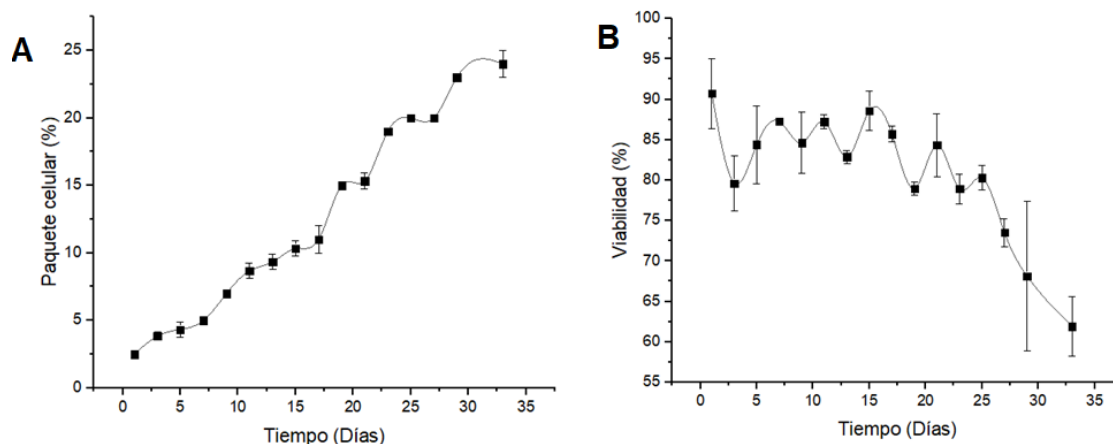


Figura 2.15 Resultados de la evaluación del volumen del paquete celular y viabilidad en suspensiones celulares de *P. americana* 'Hass' no embriogénicas. Se inocularon 450 mg de células en 50 mL de medio MMSE; macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS suplementado con 1.9 μ M de 2,4-D. La evaluación se realizó durante 33 días. A) Paquete celular. B) Viabilidad.

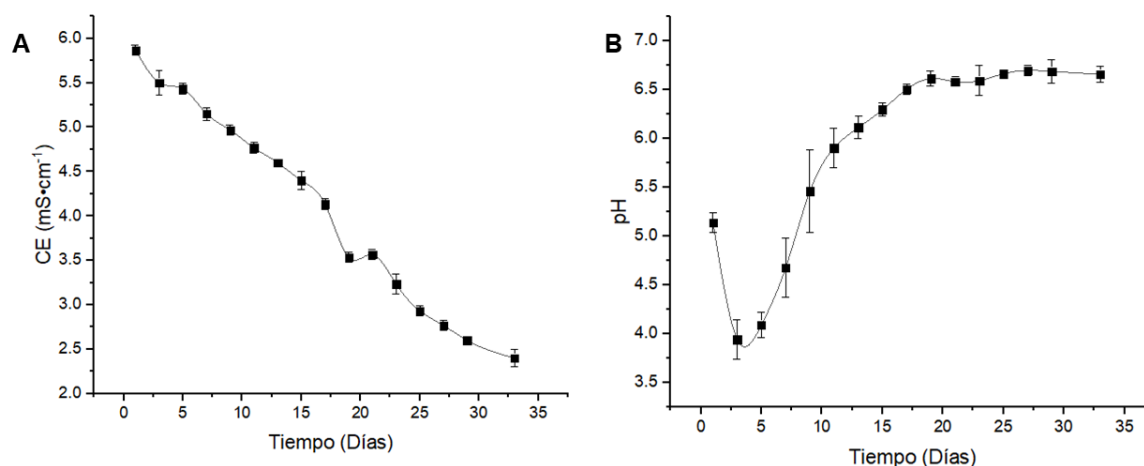


Figura 2.16 Resultados de la evaluación de conductividad eléctrica y pH en suspensiones celulares de *P. americana* 'Hass' no embriogénicas. Se inocularon 450 mg de células en 50 mL de medio MMSE; macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS suplementado con 1.9 μ M de 2,4-D. La evaluación se realizó durante 33 días. A) pH. B) Conductividad eléctrica.

2.3.8 Inducción a la embriogénesis somática en *P. americana*

El potencial embriogénico se perdió con el paso de los subcultivos. Por tanto, se probó un medio de cultivo para restaurar la ES y para inducirla en las SC no embriogénicas. Se inocularon 200 mg de células en 50 mL de medio de inducción (Witjaksono y Litz, 1999)

compuesto por macronutrientes del medio B₅, y micronutrientes y vitaminas del medio MS suplementado con 0.41 μ M de picloram, medio MI (Cuadro A.2, en el anexo) en 50 mL de medio en matraces de 250 mL. El material se incubó en la oscuridad a 25 ± 2 °C y 100 rpm. Después de dos meses no se logró observar la presencia de embriones somáticos. Dado que se obtuvieron resultados favorables sobre el crecimiento de las SC en medio MMSE, se observó en los siguientes subcultivos la presencia de embriones somáticos. Por lo que se decidió estandarizar el método probando un inóculo de 50 mg de células, previamente establecidas en medio MSP, en 50 mL de medio MMSE; desafortunadamente no se logró evaluar el efecto sobre la ES bajo estas condiciones.

2.4 DISCUSIÓN

Se establecieron SC de cafeto y aguacate 'Hass' a partir de callo friable, el cual es considerado el mejor inóculo para la iniciación de las suspensiones celulares (King, 1984). Las SC de *C. arabica* se establecieron en medio de cultivo MS suplementado con 3.9 μM de 2,4-D y 9.3 μM de Kin. Después de 30 días se pudo observar una SC de apariencia fina con un tamaño de agregado pequeño que con el transcurso de los subcultivos fue adoptando una apariencia lechosa. El establecimiento de suspensiones celulares en el cultivo de cafeto ha sido usado para diferentes propósitos, tales como para la obtención de embriones somáticos, el aislamiento de protoplastos, la regeneración de plantas, entre otros (De los Santos-Briones y Hernández-Sotomayor, 2006).

Las SC de aguacate se iniciaron en medio MSP compuesto de sales basales del medio MS suplementado con 0.41 μM de picloram a partir de callo friable y callo embriogénico. Al cabo de 60 días se formaron dos tipos de SC con base en la procedencia del inóculo. Las SC establecidas a partir de callo no embriogénico tuvieron una apariencia blanco-amarillo y de tipo arenoso-cremoso y las de tipo embriogénico fueron de un tono marrón y de apariencia arenosa. A pesar de los subsecuentes filtrados no se logró una SC fina y la apariencia de las SC no embriogénicas se mantuvo, mientras que las SC embriogénicas perdieron su capacidad. Witjaksono y Litz, (1999a) reportaron que el cultivo prolongado en medio MSP puede resultar en la disminución gradual en el ritmo de multiplicación y en la pérdida de la recuperación de embriones somáticos viables.

Al contrario de las SC de cafeto, las SC de aguacate demoraron el doble en formarse, dado que su crecimiento fue lento; esto se pudo observar en una prueba de inóculo realizada con tres tamaños 100, 200 y 300 mg de células inoculadas en 50 mL de medio MSP. El crecimiento estuvo relacionado con el tamaño de inóculo y con el tipo de SC. A mayor cantidad de inóculo la densidad celular fue mayor y las SC no embriogénicas crecieron más que las embriogénicas. Las SC embriogénicas alcanzaron la fase estacionaria en el día 14, en el cual el peso fresco del inóculo de 300 mg fue de 485 mg, mientras que las SC no embriogénicas se mantuvieron en la fase lineal para el día 21, solo el inóculo de 300 mg comenzó la fase de crecimiento acelerado para el último día evaluado donde acumuló un PF de 560 mg. Márquez-Martín, (2012) evaluaron el efecto del tiempo de cultivo en medio líquido sobre la capacidad de formar embriones somáticos en SC embriogénicas de tipo PEM y SE de aguacate 'Anaheim' durante

29 días con un inoculo inicial de 0.4 g de callo friable en 40 mL de medio MSP. Reportaron que las SC de tipo SE alcanzaron menor PF durante la fase estacionaria y mostraron un declive más pronunciado en el crecimiento al final del ciclo celular el cual se inició el día 21; sin embargo, la densidad celular fue por mucho superior a la reportada en este trabajo, ya que el PF para el día 21 fue de aproximadamente 5.8 g para cultivos de tipo SE y de 6.2 g para las SC de tipo PEM. Asimismo, los resultados de PF de esta prueba fueron mucho menores a los publicados por Witjaksono y Litz, (1999a), quienes realizaron una curva de crecimiento en SC de aguacate 'Esther', las cuales fueron inoculadas con 450 ± 20 mg de PEM y la fase estacionaria se alcanzó en el día 21 con 3 g de peso fresco. El inicio de la fase estacionaria inició el día 21 como lo reportado en los trabajos anteriormente mencionados; sin embargo, el PF final para ese día fue mucho menor. Esto podría deberse al genotipo o a la edad del inóculo inicial.

López Encina et al., (2014) reportaron una proliferación sostenida y elevada multiplicación de embriones somáticos usando el medio MMSE, en comparación con el crecimiento en medio MSP en cuatro cultivares de aguacate, entre ellos 'Hass'. Con base en ello se decidió hacer una prueba para comparar el crecimiento de las SC en tres medios de cultivo. Se inocularon 130 mg de células de SC aguacate previamente establecidas en medio MSP en tres medios de cultivo: a) medio MSP, b) medio de inducción: macronutrientes del medio B₅ y micronutrientes MS y c) medio MMSE: macronutrientes B₅, micronutrientes MS, vitaminas del medio MS, suplementado con 2.74 μM de glutamina, 1.9 μM de 2,4-D y 100 mL L⁻¹ de agua de coco durante un periodo de 41 días. En el medio de cultivo MMSE se mostraron los parámetros de crecimiento superiores en relación a los otros dos medios, ya que se tuvo un índice de crecimiento de 1.30, con respecto a 0.45 en el medio MSP y 0.33 en medio de inducción. El crecimiento fue tal que después de los 41 días de evaluación el ciclo de cultivo se mantuvo en la fase lineal y acumuló una biomasa máxima de 3,249.3 mg que fue once y dieciséis veces mayor que la acumulada en los medios MSP y MI, respectivamente. Asimismo, la transferencia de las SC no embriogénicas de aguacate del medio MSP al medio MMSE promovió su embriogénesis.

Un aspecto que no se había considerado anteriormente en otros trabajos que han empleado SC de aguacate ha sido el pH y la CE, los cuales son factores cruciales para el óptimo crecimiento celular, ya que de ello depende la disponibilidad de los nutrimentos (Bonga y Durzan, 1987). La prueba de medios mostró un comportamiento poco usual para ambos

parámetros en SC establecidas en medio MSP y MI, lo cual podría estar indirectamente relacionado con su escaso crecimiento celular. El pH de los tres medios de cultivo se ajustó a 5.7 previa esterilización. El día cero, después de la inoculación el pH descendió a 4.78, continuó descendiendo hasta 3.31 el día 14, que fue la lectura más baja, posteriormente mantuvo un ascenso continuo hasta llegar a su punto más alto que fue de 6.5 el día 35 y a partir de esa fecha se mantuvo en un pH constante hasta el día 41, mientras que en las SC inoculadas en medio MSP y MI el comportamiento fue similar al de las SC en medio MMSE pero solo hasta el día 14, dado que el pH continuó descendiendo hasta el día 27, posteriormente el pH se mantuvo constante. Los resultados del pH en las SC en medio MMSE están en concordancia con lo mencionado por George et al., (2008a), quienes mencionan que es común que los medios de cultivo que contienen iones de nitrato y amonio disminuyan ligeramente su pH para que después incremente y regrese a un valor cercano o superior al valor de ajuste original; esto se debe a que por lo general las células absorben preferencialmente NH_4^+ lo que ocasiona la disminución del pH durante los primeros días de cultivo, posteriormente utiliza el NO_3^- lo que aumenta gradualmente el pH al expulsar iones OH^- al medio de cultivo para compensar la carga. Sin embargo, esto no sucedió en las SC de los medios MSP y MI, lo que podría estar relacionado con algunos de los mecanismos que cambian el pH del medio del cultivo donde se incluyen la absorción de CO_2 , el uso diferencial de NH_4^+ y NO_3^- , la secreción de compuestos orgánicos u aminoácidos, así como la secreción e intercambio de H^+ por las células. Algunos de los productos podrían secretarse de manera activa o como consecuencia de la muerte de las células (Bonga y Durzan, 1987). Asimismo, la presencia de glutamina en el medio MMSE pudo haber servido de amortiguador para el pH, ya que los aminoácidos pueden actuar como amortiguadores. La presencia de picloram como regulador de crecimiento en ambos medios podría haber contribuido a la disminución del pH, ya que las auxinas pueden modificar la liberación de H^+ de las células, acidificando el medio de cultivo (George et al., 2008a).

Hahlbrock et al., (1974) evaluaron los cambios en la conductividad eléctrica de cultivos celulares de soya, los cuales mostraron una correlación con el crecimiento de los cultivos y la absorción de nitratos; cuando el crecimiento celular aumentó, tanto el contenido de iones y la conductividad eléctrica disminuyó, mostrando una relación inversamente proporcional entre el crecimiento celular y la CE. Los resultados de la CE de las SC de aguacate en medio MMSE coinciden con estos datos, ya que la CE descendió de manera constante de 5.01 el día siete a 2.0 mS cm^{-1} para el último día de evaluación. En el caso de las SC en medio MSP y MI la CE

se mantuvo constante en un rango de 7.5 a 7.8 mS cm⁻¹ en el medio MSP y de 5.3 a 4.8 mS cm⁻¹ en el medio de inducción; esto se puede deber a la presencia de algún factor que limite la absorción de nutrientes liberado por las células.

Después de haber obtenido resultados favorables con el uso del medio MMSE en SC de aguacate se procedió a realizar una prueba de inóculo con la finalidad de elegir un tamaño adecuado para la caracterización de las SC. Márquez-Martín, (2012) menciona que el tamaño del inóculo es uno de los factores críticos que influyen en la habilidad de los cultivos de alcanzar la maduración. Se evaluaron tres tamaños de inóculo: 100, 250 y 450 mg en 50 mL de medio MMSE durante 53 días. Los parámetros de crecimiento y el ciclo de cultivo fueron muy similares a pesar de la densidad de inóculo inicial. El inóculo de 100 mg mostró el mayor índice de crecimiento, se duplicó en menor tiempo y a mayor velocidad. Las primeras fases del ciclo de cultivo no se vieron del todo definidas sobre todo para la fase de retardamiento, ya que las SC mostraron un crecimiento acelerado desde el primer día de evaluación. Se decidió utilizar el tamaño de inóculo de 450 mg porque para la prueba de PF se pudo observar un ciclo de cultivo completo hasta la fase estacionaria.

La caracterización de SC de aguacate 'Hass' se evaluó durante 33 días. El día 21 tuvo un PF de 2.8 g, el cual fue muy parecido a lo reportado por Witjaksono y Litz, (1999a), ya que obtuvieron alrededor de 3 g para el mismo día usando medio MSP, mientras que el PF reportado por Márquez-Martín, (2012) para SC del cultivar 'Anaheim' fue el doble de lo que reportamos en este trabajo para el día 21. A pesar de no mostrar un PF superior para ese día, la biomasa acumulada fue superior; así mismo, la duración del ciclo de cultivo fue mayor lo que podría ahorrar tiempo y materiales para el mantenimiento de las SC. La viabilidad del primer día fue de 90.7% y disminuyó con el paso de los días hasta ser de 61.8% para el último día.

La prueba de inóculo de SC de cafeto fue realizada con tres tamaños de inóculo: 100, 200 y 300 mg. Se pudo observar que el incremento de la densidad celular fue directamente proporcional a la cantidad inicial de inóculo. Estos resultados concuerdan con lo publicado por Zamarripa, (1994), quien a su vez relacionó la densidad de inóculo con la producción y desarrollo de embriones somáticos. El inóculo de 100 mg mostró los parámetros de crecimiento más favorables para la prueba de PF con un índice de crecimiento de 1.33, una velocidad de crecimiento de 0.17 y un tiempo de duplicación de 4.04. Los resultados fueron parecidos a los publicados por Galaz-Ávalos et al., (2012) quienes evaluaron el crecimiento de dos líneas

celulares, L1 y L2, inoculadas con 100 mg en medio MS suplementado con 13.6 μM de 2,4-D y 4.4 μM de BA durante 24 y 42 días, respectivamente. La línea L2 tuvo un índice de crecimiento superior de 10.12, en tanto el de L1 fue de 3.51. Los tiempos de duplicación oscilaron entre 3.62 y 3.55 para la prueba de PF. A pesar de los resultados favorables del inóculo de 100 mg se decidió realizar la caracterización de las SC con un inóculo de 200 mg, ya que para la prueba de PS se lograron observar claramente todas las fases de crecimiento. Las SC de cafeto tuvieron un índice de crecimiento de 4.81, una velocidad de crecimiento de 0.18 y un tiempo de duplicación de 3.94 días para la prueba de PF. Se lograron observar todas las fases del ciclo de cultivo, siendo la fase exponencial del día 8 al 18. La mayor cantidad de biomasa se alcanzó el día 38 con 10.3 g. Los resultados son parecidos a lo publicado por Galaz-Ávalos et al., (2012); sin embargo, se pudo observar antes el inicio de la fase exponencial; así mismo, la biomasa total fue mayor para el caso de las SC establecidas en este trabajo.

Para la inducción de la ES de cafeto se colocaron 200 mg de SC, previamente establecidas en medio de mantenimiento, 50 mL de medio MPA el cual está compuesto por sales basales del medio MS a la mitad de su fuerza iónica, suplementado con 11.5 μM de 2,4-D y 4.4 μM de BA durante 42 días. Trascurrido ese tiempo se transfirieron a medio de inducción formado con sales del medio MS a la mitad de su fuerza iónica suplementado con 2.3 μM de Kin y 0.22 μM de ANA. No se logró inducir la embriogénesis; esto podría deberse al tipo de callo. Mukul-López et al., (2012) utilizó callo compacto de difícil disgregación que no permitió el establecimiento de SC finas, pero sí promovió la inducción de la ES. Otros factores que podrían estar afectando son el genotipo, ya que se ha demostrado que la capacidad embriogénica de *C.arabica* depende del genotipo (Molina, 2002) o la densidad de inóculo empleada, ya que la producción y desarrollo de los embriones somáticos se inhibe a elevadas densidades de inóculo (Zamarripa et al., 1991).

CAPÍTULO III

3 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

3.1 CONCLUSIONES

Se estableció una línea de suspensiones celulares de *C. arabica* posiblemente resistente a roya. Este sistema tiene la ventaja de suministrar material celular de forma continua y confiable. Puede ser usado de manera eficiente en estudios bioquímicos y moleculares, algunos de los cuales podrían estar involucrados en el desarrollo de materiales con resistencia a factores bióticos y abióticos, en este caso particular, enfermedades como *Hemileia vastatrix*. Así mismo, las SC establecidas podrían ser utilizadas como una fuente potencial para la generación de plántulas a gran escala a través de la ES.

El ciclo de cultivo de las SC de café tuvo una duración de 40 días. Se pudo identificar la fase de crecimiento retardado, fase exponencial, fase lineal, fase de crecimiento desacelerado y fase estacionaria. Presentaron un índice de crecimiento de 4.81 y un tiempo de duplicación de 3.94 días durante la fase exponencial que se identificó del día 8 al 18. La caracterización del crecimiento del cultivo, como de algunos factores involucrados en este proceso es esencial para obtener resultados más confiables en los experimentos que se realicen; así mismo, permitirá el mantenimiento y manejo adecuado del cultivo.

Se establecieron SC de *P. americana* 'Hass' en medio MSP con un índice de crecimiento de 0.45 y un tiempo de duplicación de 13.17 días. La transferencia a medio de cultivo MMSE incrementó el índice de crecimiento celular en un 189% y redujo el tiempo de duplicación de 13.17 a 5.82 días. Así mismo, promovió la respuesta embriogénica. El uso del medio MMSE permitirá el mantenimiento a largo plazo y la regeneración de plántulas lo que podrá servir para el desarrollo de estudios relacionados con la transformación genética y conservación de germoplasma.

Las suspensiones celulares establecidas y caracterizadas como parte de este trabajo servirán como fuente de material biológico para futuras investigaciones relacionadas con el estudio de las proteínas secretadas al medio de cultivo bajo condiciones embriogénicas y no embriogénicas.

3.2. PERSPECTIVAS

Inducir la ES a partir de SC de cafeto.

Evaluar el papel de la glutamina en el medio de mantenimiento de aguacate.

Realizar una prueba de medio condicionado con el medio MSP y MMSE de aguacate.

Identificar las proteínas excretadas al medio de cultivo en las SC embriogénicas y no embriogénicas de ambos cultivos, usando geles de doble dimensión y espectrometría de masas.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal, G. K., N.-S. Jwa, M.-H. Lebrun, D. Job y R. Rakwal (2010). Plant secretome: unlocking secrets of the secreted proteins. *Proteomics*, 10, 799-827.
- Aguilar-Hernández, V. y V. M. Loyola-Vargas (2018). Advanced proteomic approaches to elucidate somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1658.
- Ali, S., B. A. Ganai, A. N. Kamili, A. A. Bhat, Z. A. Mir, J. A. Bhat, A. Tyagi, S. T. Islam, M. Mushtaq y P. Yadav (2018). Pathogenesis-related proteins and peptides as promising tools for engineering plants with multiple stress tolerance. *Microbiological Research*, 212, 29-37.
- Alves, A., A. Caeiro, S. I. Correia, P. Veríssimo y J. Canhoto (2017). Establishment and biochemical characterization of tamarillo (*Solanum betaceum* Cav.) embryogenic cell suspension cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 53, 606-618.
- Amar, A. B., P. Cobanov, K. Boonrod, G. Krczal, S. Bouzid, A. Ghorbel y G. M. Reustle (2007). Efficient procedure for grapevine embryogenic suspension establishment and plant regeneration: role of conditioned medium for cell proliferation. *Plant Cell Reports*, 26, 1439-1447.
- Awada, R., D. Verdier, S. Froger, E. Brulard, S. de Faria Maraschin, H. Etienne y D. Breton (2020). An innovative automated active compound screening system allows high-throughput optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Scientific Reports*, 10, 810.
- Baumann, T. W. y P. M. Frischknecht, (1988). Caffeine: production by plant (*Coffea* spp.) cell cultures, en: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 4. Medicinal and Aromatic Plants I, Bajaj, Y. P. S., (ed). Springer-Verlag. Berlin. pp. 264-281.
- Belchí-Navarro, S., L. Almagro, R. Bru-Martínez y M. A. Pedreño (2019). Changes in the secretome of *Vitis vinifera* cv. Monastrell cell cultures treated with cyclodextrins and methyl jasmonate. *Plant Physiology and Biochemistry*, 135, 520-527.
- Bonga, J. M. y D. J. Durzan (1987). *Cell and Tissue Culture in Forestry*. Vol. 1. General Principles and Biotechnology, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. 422 p.
- Burns, J. A. y H. Y. Wetzstein (1997). Development and characterization of embryogenic suspension cultures of pecan. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48, 93-102.
- Campos, N. A., L. V. Paiva, B. Panis y S. C. Carpentier (2016). The proteome profile of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. *Proteomics*, 16, 1001-1005.
- Campos, N. A., B. Panis y S. C. Carpentier (2017). Somatic embryogenesis in coffee: The evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1460.
- Carneiro, M. F. (1997). Coffee biotechnology and its application in genetic transformation. *Euphytica*, 96, 167-172.

-
- CESAVEG (Comité Estatal de Sanidad Vegetal de Guanajuato). (2008). Campaña de manejo fitosanitario del aguacatero. Irapuato, Guanajuato. 12 p.
- Chanderbali, A. S., D. E. Soltis, P. S. Soltis y B. N. Wolstenholme, (2013). Taxonomy and botany, en: *The Avocado: Botany, Production and Uses*, Schaffer, B., B. N. Wolstenholme y A. W. Whiley, (eds). CABI. Oxfordshire. pp. 31-50.
- Chanderbali, A. S., V. A. Albert, V. E. T. M. Ashworth, M. T. Clegg, R. E. Litz, D. E. Soltis y P. S. Soltis (2008). *Persea americana* (avocado): bringing ancient flowers to fruit in the genomics era. *BioEssays*, 30, 386-396.
- Chaparro-Pulido, C. A., M. M. Montiel, E. Palomo-Ríos, J. A. Mercado y F. Pliego-Alfaro (2014). Development of an efficient transient transformation protocol for avocado (*Persea americana* Mill.) embryogenic callus. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50, 292-298.
- Chapman, A., A. S. Blervacq, J. Vasseur y J. L. Hilbert (2000). Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of b-glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta*, 211, 305-314.
- Chen, X., Z. Deng, C. Yu, C. Yan y J. Chen (2016). Secretome analysis of rice suspension-cultured cells infected by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryza* (Xoo). *Proteome Science*, 14, 2.
- Cordewener, J., H. Booij, H. Van der Zandt, F. A. Van Engelen, A. Van Kammen y S. C. De Vries (1991). Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, 184, 478-486.
- Cruz-Hernández, A., Witjaksono, R. E. Litz y M. A. Gómez-Lim (1998). *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of embryogenic avocado cultures and regeneration of somatic embryos. *Plant Cell Reports*, 17, 497-503.
- De Fera, M., E. Jiménez, R. Barbón, A. Capote, M. Chávez y E. Quiala (2003). Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 1-6.
- De los Santos-Briones, C. y S. M. T. Hernández-Sotomayor (2006). Coffee biotechnology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18, 217-227.
- Dudley, M. I. y A. K. Cowan (2003). Mevastatin-induced inhibition of cell growth in avocado suspension cultures and reversal by isoprenoid compounds. *African Journal of Biotechnology*, 2, 264-270.
- Egertsdotter, U. y S. Von Arnold (1995). Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum*, 93, 334-345.
- Etienne, H., B. Bertrand, F. Anthony, F. Cote y M. Berthouly, (1997). L'embryogenese somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier, en: 17è Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Anonymous, Association Scientifique Internationale du Café. Paris. pp. 457-465.

- Etienne, H., (2005). Somatic embryogenesis protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.), en: Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants, Jain, S. y P. Gupta, (eds). Springer. Netherlands. pp. 167-179.
- Etienne, H., D. Breton, J. C. Breitler, B. Bertrand, E. Déchamp, R. Awada, P. Marraccini, S. Lérant, E. Alpizar, C. Campa, P. Courtel, F. Georget y J.-P. Ducos (2018). Coffee somatic embryogenesis: How did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1630.
- FAOSTAT (Food and Agriculture Organization of the United Nations). (2018). Statistics database. <http://www.fao.org/faostat/en#home>. (Acceso: diciembre del 2018).
- Ferreira, Thiago, Schuler J, Guimaraes R., Farah, A (2019). Introduction to Coffee Plant and Genetics. *Coffee: Production, Quality and Chemistry*. Ed. Adriana Farah. Croydon, UK: The Royal Society of Chemistry. 3-25.
- Galaz-Ávalos, R. M., S. Aguilar-Díaz, P. A. Xool-González, S. M. M. Huchín-May y V. M. Loyola-Vargas, (2012). Callus, suspension culture, and hairy roots. Induction, maintenance and characterization, en: *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 877, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Humana Press. Heidelberg. pp. 29-40.
- Gamborg, O. L., R. A. Miller y K. Ojima (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- Gavish, H., A. Vardi y R. Fluhr (1992). Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta*, 186, 511-517.
- George, E. F., M. A. Hall y G.-J. De Klerk (2008a). Plant propagation by tissue culture. Volume 1. The background, Springer, Dordrecht. 501 p.
- George, E. F., M. A. Hall y G.-J. De Klerk, (2008b). The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems, en: *Plant Propagation by Tissue Culture*, George, E. F., M. A. Hall y G. J. De Klerk, (eds). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp. 115-173.
- Ghahremani, M., K. A. Stigter y W. Plaxton (2016). Extraction and characterization of extracellular proteins and their post-translational modifications from *Arabidopsis thaliana* suspension cell cultures and seedlings: A critical review. *Proteomes*, 4, 25.
- Gokulakannan, G. G. y K. Niehaus (2010). Characterization of the *Medicago truncatula* cell wall proteome in cell suspension culture upon elicitation and suppression of plant defense. *Journal of Plant Physiology*, 167, 1533-1541.
- Grèzes, J., D. Thomas, y B. Thomasset (1994). Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 36, 91-97.
- Guerra-Guimaraes, L., C. Pinheiro, I. Chaves, D. R. Barros y C. P. Ricardo (2016). Protein dynamics in the plant extracellular space. *Proteomes*, 4, 22.

- Gupta, S., V. Wardhan, S. Verma, S. Gayali, U. Rajamani, A. Datta, S. Chakraborty y N. Chakraborty (2011). Characterization of the secretome of chickpea suspension culture reveals pathway abundance and the expected and unexpected secreted proteins. *Journal of Proteome Research*, 10, 5006-5015.
- Guzmán-García, E., C. Sánchez-Romero, B. Panis y S. C. Carpentier (2013). The use of 2D-DIGE to understand the regeneration of somatic embryos in avocado. *Proteomics*, 13, 3498-3507.
- Hahlbrock, K., J. Ebel y A. Oaks (1974). Determination of specific growth stages of plant cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium. *Planta*, 118, 75-84.
- Hanai, H., T. Matsuno, M. Yamamoto, Y. Matsubayashi, T. Kobayashi, H. Kamada y Y. Sakagami (2000). A secreted peptide growth factor, phyto-sulfokine, acting as a stimulatory factor of carrot somatic embryo formation. *Plant and Cell Physiology*, 41, 27-32.
- Imin, N., F. de Jong, U. Mathesius, G. Van Noorden, N. A. Saeed, X. Wang, R. J. Rose y B. G. Rolfe (2004). Proteome reference maps of *Medicago truncatula* embryogenic cell cultures generated from single protoplasts. *Proteomics*, 4, 1883-1896.
- Jorrín-Novo, J. V., S. Komatsu, R. Sanchez-Lucas y L. E. Rodríguez de Francisco (2019). Gel electrophoresis-based plant proteomics: Past, present, and future. Happy 10th anniversary *Journal of Proteomics!* *Journal of Proteomics*, 198, 1-10.
- Jung, Y.-H., S.-H. Jeong, S. H. Kim, R. Singh, J.-E. Lee, Y.-S. Cho, G. K. Agrawal, R. Rakwal y N.-S. Jwa (2008). Systematic secretome analyses of rice leaf and seed callus suspension-cultured cells: Workflow development and establishment of high-density two-dimensional gel reference maps. *Journal of Proteome Research*, 7, 5187-5210.
- Kim, S. T., Y. H. Kang, Y. Wang, J. Wu, Z. Y. Park, R. Rakwal, G. K. Agrawal, S. Y. Lee y K. Y. Kang (2009). Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor. *Proteomics*, 9, 1302-1309.
- King, P. J., K. J. Mansfield y H. E. Street (1973). Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures. *Canadian Journal of Botany*, 51, 1807-1823.
- King, P. J., (1984). Induction and maintenance of cell suspension cultures, en: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vasil, I. K., (ed). Vol. 1, Academic Press. Orlando. pp. 130-138.
- Knoch, E., A. Dilokpimol y N. Geshi (2014). Arabinogalactan proteins: focus on carbohydrate active enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 5, 198.
- Kobayashi, T., C. H. Eun, H. Hanai, Y. Matsubayashi, Y. Sakagami y H. Kamada (1999). Phytosulphokine-a, a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *Journal of Experimental Botany*, 50, 1123-1128.

- Kobayashi, T., K. Higashi, K. Sasaki, T. Asami, S. Yoshida y H. Kamada (2000). Purification from conditioned medium and chemical identification of a factor that inhibits somatic embryogenesis in carrot. *Plant and Cell Physiology*, 41, 268-273.
- Kong, E. Y. Y., J. Biddle, M. Foale y S. W. Adkins (2020). Cell suspension culture: A potential *in vitro* culture method for clonal propagation of coconut plantlets via somatic embryogenesis. *Industrial Crops and Products*, 147, 112125.
- Krause, C., S. Richter, C. Knöll y G. Jürgens (2013a). Plant secretome - From cellular process to biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1834, 2429-2441.
- Krause, C., S. Richter, C. Knöll y G. Jürgens (2013b). Plant secretome - From cellular process to biological activity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1834, 2429-2441.
- Kusumawati, L., N. Imin y M. A. Djordjevic (2008). Characterization of the secretome of suspension cultures of *Medicago* species reveals proteins important for defense and development. *Journal of Proteome Research*, 7, 4508-4520.
- Lippmann, R., S. Kaspar, T. Rutten, M. Melzer, J. Kumlehn, A. Matros y H. P. Mock (2009). Protein and metabolite analysis reveals permanent induction of stress defense and cell regeneration processes in a tobacco cell suspension culture. *International Journal of Molecular Sciences*, 10, 3012-3032.
- Litz, R. E. y W. Litz, (2000). Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana*) and its application for plant improvement, en: *International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits*, Anonymous, pp. 133-138.
- Litz, R. E., S. H. Raharjo, D. Efendi, y M. A. Gomez-Lim (2007) Plant recovery following transformation of avocado with anti-fungal protein and SAM hydrolase genes. *Acta Horticulturae* 73: 447-450.
- López Encina, C., A. Parisi, C. O'Brien y N. Mitter (2014). Enhancing somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) using a two-step culture system and including glutamine in the culture medium. *Scientia Horticulturae*, 165, 44-50.
- LoSchiavo, F., G. Giuliano, S. C. De Vries, A. Genga, R. Bollini, L. Pitto, F. Cozzani, V. Nuti-Ronchi y M. Terzi (1990). A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Molecular and General Genetics*, 223, 385-393.
- Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (2016). Somatic embryogenesis. An overview, en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 1-10.
- Loyola-Vargas, V. M., J. R. Avilez-Montalvo, R. N. Avilez-Montalvo, R. E. Márquez-López, R. M. Galaz-Ávalos y E. Mellado-Mojica, (2016). Somatic embryogenesis in *Coffea* spp., en: *Somatic embryogenesis. Fundamental aspects and applications*, Loyola-Vargas, V. M. y N. Ochoa-Alejo, (eds). Springer. Switzerland. pp. 241-266.

- Lyngved, R., J. Renaut, J. F. Hausman, T. H. Iversen y A. K. Hvoslef-Eide (2008). Embryo-specific proteins in *Cyclamen persicum* analyzed with 2-D DIGE. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27, 353.
- Márquez-Martín, B., R. Sesmero, M. A. Quesada, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero (2011). Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, 168, 2028-2034.
- Márquez-Martín, B., A. Barceló-Muñoz, F. Pliego-Alfaro y C. Sánchez-Romero (2012). Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): influence of embryogenic culture type. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 21, 180-188.
- Martínez-Esteso, M. J., S. Sellés-Marchart, J. C. Vera-Urbina, M. A. Pedreño y R. Bru-Martínez (2009). Changes of defense proteins in the extracellular proteome of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Gamay) cell cultures in response to elicitors. *Journal of Proteomics*, 73, 331-341.
- Martínez-Estévez, M., J. A. Muñoz-Sánchez, V. M. Loyola-Vargas y S. M. T. Hernández-Sotomayor (2001). Modification of the culture medium to produce aluminum toxicity in cell suspensions of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell Reports*, 20, 469-474.
- Matthys-Rochon, E. (2005). Secreted molecules and their role in embryo formation in plants: a mini-review. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 47, 23-29.
- Méndez-Hernández, H. A., M. Ledezma-Rodríguez, R. N. Avilez-Montalvo, Y. L. Juárez-Gómez, A. Skeete, J. Avilez-Montalvo, C. De la Peña y V. M. Loyola-Vargas (2019). Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10, 77.
- Miernyk, J. A., A. A. Jett y M. L. Johnston (2016). Analysis of soybean tissue culture protein dynamics using difference gel electrophoresis. *Journal of Proteomics*, 130, 56-64.
- Molina D. M., M. E. Aponte, H. Cortina, y G. Moreno (2002). The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 71: 117-123
- Mooney, P. A. y J. v. Staden (1987). Induction of embryogenesis in callus from immature embryos of *Persea americana*. *Canadian Journal of Botany*, 65, 622-626.
- Mukul-López, H. G., C. De-la-Peña, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2012). Evaluation of the extracellular proteome profile during the somatic embryogenesis process of *Coffea spp.* *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56, 72-79.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Mustafa, N. R., W. De Winter, F. Van Iren y R. Verpoorte (2011). Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols*, 6, 715-742.
- Ngara, R., J. Rees y B. K. Ndimba (2008). Establishment of sorghum cell suspension culture system for proteomics studies. *African Journal of Biotechnology*, 7, 744-749.

- Ngara, R. y B. K. Ndimba (2011). Mapping and characterisation of the sorghum cell suspension culture secretome. *African Journal of Biotechnology*, 10, 253-266.
- Nic-Can, G. I., R. M. Galaz-Ávalos, C. De-la-Peña y V. M. Loyola-Vargas (2015). Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. *PLoS ONE*, 10, e0126414.
- Nogueira, F., E. Goncalves, E. Jereissati, M. Santos, J. Costa, O. Oliveira-Neto, A. Soares, G. Domont y F. Campos (2007). Proteome analysis of embryogenic cell suspensions of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Plant Cell Reports*, 26, 1333-1343.
- O'Brien, C., J. C. A. Hiti-Bandaralage, A. Hayward y N. Mitter, (2018). Avocado (*Persea americana* Mill.), en: *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants: Volume II*, Jain, S. M. y P. Gupta, (eds). Springer. Cham. pp. 305-328.
- Oh, I. S., A. R. Park, M. S. Bae, S. J. Kwon, Y. S. Kim, J. E. Lee, N. Y. Kang, S. Lee, H. Cheong y O. K. Park (2005). Secretome analysis reveals an Arabidopsis lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *The Plant Cell*, 17, 2832-2847.
- Okushima, Y., N. Koizumi, T. Kusano y H. Sano (2000). Secreted proteins of tobacco cultured BY2 cells: identification of a new member of pathogenesis-related proteins. *Plant Molecular Biology*, 42, 479-488.
- Paiva, E. A. S. (2016). How do secretory products cross the plant cell wall to be released? A new hypothesis involving cyclic mechanical actions of the protoplast. *Annals of Botany*, 117, 533-540.
- Palomo-Ríos, E., C. Pérez, J. A. Mercado y F. Pliego-Alfaro (2013). Enhancing frequency of regeneration of somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.) using semi-permeable cellulose acetate membranes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 115, 199-207.
- Pan, Z., R. Guan, S. Zhu y X. Deng (2009). Proteomic analysis of somatic embryogenesis in Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). *Plant Cell Reports*, 28, 281-289.
- Pan, Z., S. Zhu, R. Guan y X. Deng (2010). Identification of 2,4-D-responsive proteins in embryogenic callus of Valencia sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck) following osmotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103, 145-153.
- Pateña, L. F., L. R. Carlos-Refuerzo y R. C. Barba (2002). Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mango (*Mangifera indica* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38, 173-177.
- Perán-Quesada, R., C. Sánchez-Romero, A. Barceló-Muñoz y F. Pliego-Alfaro (2004). Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulturae*, 102, 61-73.
- Pliego-Alfaro, F. y T. Murashige (1988). Somatic embryogenesis in avocado (*Persea americana* Mill.) *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 12, 61-66.
- Poon, S., R. L. Heath y A. E. Clarke (2012). A chimeric arabinogalactan protein promotes somatic embryogenesis in cotton cell culture. *Plant Physiology*, 160, 684-695.

- POWO (Plants of the world). (2018). <http://powo.science.kew.org> (Acceso: diciembre del 2018).
- Prusky, D., H. Hamdan, R. Ardi y N. T. Keen (1996). Induction of biosynthesis of epicatechin in avocado suspension cells treated with an enriched CO₂ atmosphere. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 48, 171-178.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Méndez-Zeel, A. Larqué-Saavedra y V. M. Loyola-Vargas (2001). Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports*, 20, 679-684.
- Quiroz-Figueroa, F. R., S. C. Kú-Rodríguez y V. M. Loyola-Vargas (2002a). Patrón proteico extracelular durante la embriogénesis somática en suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. *Revista de la Sociedad Química de México*, 46, 259-263.
- Quiroz-Figueroa, F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002b). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20, 1141-1149.
- Quiroz-Figueroa, F. R., M. Méndez-Zeel, F. Sánchez-Teyer, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas (2002c). Differential gene expression in embryogenic and non-embryogenic clusters from cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. *Journal of Plant Physiology*, 159, 1267-1270.
- Quiroz-Figueroa, F. R., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2006). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 285-301.
- Raharjo, S. H. y R. E. Litz (2005). Micrografting and *ex vitro* grafting for somatic embryo rescue and plant recovery in avocado (*Persea americana*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 1-9.
- Rakleova, G., A. Keightley, I. Panchev, I. Tsacheva y M. Tchorbadjieva (2010). Cysteine proteinases and somatic embryogenesis in suspension cultures of orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.). *General and Applied Plant Physiology*, 36, 100-109.
- Rakleova, G., A. Keightley, I. Pantchev, I. Tsacheva y M. Tchorbadjieva (2012). Identification, molecular cloning, and recombinant gene expression of an extracellular α -amylase from *Dactylis glomerata* L. embryogenic suspension cultures. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 26, 3192-3200.
- Rode, C., K. Lindhorst, H. P. Braun y T. Winkelmann (2012). From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta*, 235, 995-1011.
- Ruíz-May, E., C. De-la-Peña, B. A. Ayil-Gutiérrez, G. I. Nic-Can, H. G. Mukul-López, R. M. Galaz-Ávalos y V. M. Loyola-Vargas (2010). Protein secretion by cell cultures: an essential biological issue. *Acta Horticulturae*, 849, 213-222.
- Sabater-Jara, A. B., L. Almagro, S. Belchí-Navarro, M. J. Martínez-Esteso, S. M. Youssef, J. Casado-Vela, J. C. Vera-Urbina, S. Sells-Marchart, R. Bru-Martínez y M. A. Pedreño,

- (2014). Suspension-cultured plant cells as a tool to analyze the extracellular proteome, en: Jorrin-Novo, J., S. Komatsu, W. Weckwerth, y S. Wienkoop (eds) Plant Proteomics. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols), vol 1072. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 407-433.
- Sánchez-Romero, C., B. Márquez-Martín y F. Pliego-Alfaro, (2006). Somatic and zygotic embryogenesis in avocado, en: Somatic Embryogenesis, Mujib, A. y J. Samaj, (eds). Springer. Berlin Heidelberg. pp. 271-284.
- Schaffer, B., N. Wolstenholme y A. W. Whiley (2013). The avocado. Botany, production and uses, CABI, Oxfordshire. 560 p.
- Sharifi, G., H. Ebrahimzadeh, B. Ghareyazie, J. Gharechahi y E. Vatankhah (2012). Identification of differentially accumulated proteins associated with embryogenic and non-embryogenic calli in saffron (*Crocus sativus* L.). Proteome Science, 10, 3.
- Silva, A. T., D. Barduche, K. G. Do Livramento y L. V. Paiva (2015). A putative BABY BOOM-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 51, 93-101.
- Söndahl, M. R. y W. R. Sharp (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 81, 395-408.
- Stintzi, A., T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedemann-Merdinoglu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand y B. Fritig (1993). Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens. Biochimie, 75, 687-706.
- Su Y. H., L. P. Tang, X. Y. Zhao y X. S. Zhang, (2020). Plant cell totipotency: Insights into cellular reprogramming, Journal of Integrative Plant Biology. (En prensa).
- Suarez, I. E., R. A. Schnell, D. N. Kuhn y R. E. Litz (2006). Recovery and indexing of avocado plants (*Persea americana*) from embryogenic nucellar cultures of an avocado sunblotch viroid-infected tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 84, 27-37.
- Szabados, M., L. A. Mroginski y W. Roca, (1993). Suspensiones celulares: descripción, manipulación y aplicaciones, en: CULTIVO DE TEJIDOS EN LA AGRICULTURA. Fundamentos y aplicaciones, Roca, W. M. y L. A. Mroginski, (eds). CIAT. Cali. pp. 173-195.
- Talhinhas, P., D. Batista, I. Diniz, A. Vieira, D. N. Silva, A. Loureiro, S. Tavares, A. P. Pereira, H. G. Azinheira y L. Guerra-Guimaraes (2017). The coffee leaf rust pathogen *Hemileia vastatrix*: one and a half centuries around the tropics. Molecular Plant Pathology, 18, 1039-1051.
- Tchorbadjieva, M., I. Pantchev y N. Harizanova (2004). Two-dimensional protein pattern analysis of extracellular proteins secreted by embryogenic and non-embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. Biotechnology & Biotechnological Equipment, 18, 20-27.

- Tchorbadjieva, M. I. y I. Y. Pantchev (2006). Secretion of a chitinase-like protein in embryogenic suspension cultures of *Dactylis glomerata* L. *Biologia Plantarum*, 50, 142-145.
- Tchorbadjieva, M., (2016). Advances in proteomics of somatic embryogenesis, en: *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*, Mujib, A., (ed). Springer. India. pp. 67-90.
- Tonietto, Â., J. Hiromi Sato, J. Batista Teixeira, E. M. de Souza, F. O. Pedrosa, O. L. Franco y A. Metha (2012). Proteomic analysis of developing somatic embryos of *Coffea arabica*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 30, 1393-1399.
- Torres, L. F., L. E. C. Diniz, K. G. Do Livramento, L. L. Freire y L. V. Paiva (2015). Gene expression and morphological characterization of cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Catigua MG2 in different cultivation stages. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 175.
- Townsley, P. M. (1974). Production of coffee from plant cell suspension cultures. *J. Inst. Can. Food Sci. Technol. Aliment.*, 7, 79-81.
- Tran, H. T. y W. C. Plaxton (2008). Proteomic analysis of alterations in the secretome of *Arabidopsis thaliana* suspension cells subjected to nutritional phosphate deficiency. *Proteomics*, 8, 4317-4326.
- Umehara, M., S. Ogita, H. Sasamoto, H. Koshino, T. Asami, S. Fujioka, S. Yoshida y H. Kamada (2005). Identification of a novel factor, vanillyl benzyl ether, which inhibits somatic embryogenesis of Japanese larch (*Larix leptolepis* Gordon). *Plant and Cell Physiology*, 46, 445-453.
- Van Bostel, J. y M. Berthouly (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44, 7-17.
- Van Hengel, A. J., A. Van Kammen y S. C. De Vries (2002). A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGP) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiologia Plantarum*, 114, 637-644.
- Van Loon, L. C., M. Rep y C. M. J. Pieterse (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, 44, 135-162.
- Vega, F. E., F. Infante, A. Castillo y J. Jaramillo (2009). The coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleoptera: Curculionidae): a short review, with recent findings and future research directions. *Terrestrial Arthropod Reviews*, 2, 129-147.
- Vidales-Fernandez, I., R. Salgado-Garciglia, M. A. Gomez-Lim, E. Angel-Palomares y H. Guillen-Andrade (2003). Embriogénesis somática de aguacate (*Persea americana* Mill. cv. Hass). *Proceedings V World Avocado Congress*, 89-95.
- Von Arnold, S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok y L. Filonova (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 233-249.

- Wang X., K. P. Chung, W. Lin y L. Jiang, (2017). Protein secretion in plants: conventional and unconventional pathways and new techniques, *Journal of Experimental Botany*, 69, 21-37.
- Wink, M. (1994). The cell culture medium--A functional extracellular compartment of suspension-cultured cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 307-319.
- Witjaksono, R. E. Litz y J. W. Grosser (1998). Isolation, culture and regeneration of avocado (*Persea americana* Mill.) protoplasts. *Plant Cell Reports*, 18, 235-242.
- Witjaksono y R. E. Litz (1999a). Induction and growth characteristics of embryogenic avocado cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 19-29.
- Witjaksono y R. E. Litz (1999b). Maturation of avocado somatic embryos and plant recovery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58, 141-148.
- Witjaksono, R. E. Litz y F. Pliego-Alfaro, (1999). Somatic embryogenesis of avocado (*Persea americana* Mill.), en: *Somatic Embryogenesis in Woody Plants: Volume 5*, Jain, S. M., P. K. Gupta y R. J. Newton, (eds). Springer. Dordrecht. pp. 197-214.
- Yadav, N., S. M. P. Khurana y D. Yadav, (2015). Plant secretomics: Unique initiatives, en: *PlantOmics: The Omics of Plant Science*, Barh, D., M. S. Khan y E. Davies, (eds). Springer. India. pp. 357-384.
- Zamarripa, C. A., J. P. Ducos, H. Tessereau, H. Bollon, A. B. Eskes y V. Pétiard, (1991). Développement d'un procédé de multiplication en masse du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide, en: 14^e Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Anonymous, Association Scientifique Internationale du Café. Paris. pp. 392-402.
- Zamarripa, C. A. (1994). Optimización de la embriogénesis somática de café arabusta (*Coffea canephora* P. *Coffea arabica* L.) a partir de una suspensión celular. *Agricultura Técnica de México*, 20, 27-41.

ANEXOS

Cuadro A.1 Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y proceso de inducción de la ES en SC de *C. arabica*.

Componentes	Masa Molar (g mol ⁻¹)	Medio de cultivo		
		MA	MPA*	MI*
Macroelementos		mg L ⁻¹ (mM)	mg L ⁻¹ (mM)	mg L ⁻¹ (mM)
NH ₄ NO ₃ (Sigma, A9642)	80.04	1,650 (20.6)	1,650 (20.6)	1,650 (20.6)
KNO ₃ (Fermont, 91842)	101.10	1,900 (18.8)	1,900 (18.8)	1,900 (18.8)
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma, C8106)	147.02	440 (3.0)	440 (3.0)	440 (3.0)
KH ₂ PO ₄ (Sigma, P-0662)	136.1	170 (1.25)	170 (1.25)	170 (1.25)
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, F-7002)	278	27.80 (0.1)	27.80 (0.1)	27.80 (0.1)
Na ₂ EDTA (J.T.Baker, 8993-01)	372.24	37.30 (100)	47.30 (100)	47.30 (100)
MgSO ₄ ·7H ₂ O (J.T.Baker, 2500-01)	246.48	370 (1.50)	370 (1.50)	370 (1.50)
Microelementos		mg L ⁻¹ (μM)	mg L ⁻¹ (μM)	mg L ⁻¹ (μM)
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O (Sigma, S-6646)	241.9	0.25 (1.0)	0.25 (1.0)	0.25 (1.0)
H ₃ BO ₃ (Sigma, B6768)	61.83	6.183 (100.0)	6.183 (100.0)	6.183 (100.0)
MnSO ₄ ·4H ₂ O	223.06	15.10 (100.0)	15.10 (100.0)	15.10 (100.0)
CuSO ₄ ·5H ₂ O (J.T.Baker, 1843)	249.68	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, Z-0501)	287.56	8.62 (30.0)	8.62 (30.0)	8.62 (30.0)
KI (J.T.Baker, 3162-50)	166.00	0.83 (5.0)	0.83 (5.0)	0.83 (5.0)
CoCl ₂ ·6H ₂ O (Merck, 275839)	237.93	0.024 (0.1)	0.024 (0.1)	0.024 (0.1)
Componentes orgánicos		mg L ⁻¹ (μM)	mg L ⁻¹ (μM)	mg L ⁻¹ (μM)
Tiamina HCl (Sigma, T3902)	337.27	10 (29.6)	10 (29.6)	10 (29.6)
Mio-inositol (Sigma, I5125)	180.16	100.0 (555)	100.0 (555)	100.0 (555)
Cisteína (Sigma, C121800)	157.62	25 (158.8)	25 (158.8)	25 (158.8)
Sacarosa (Sigma, S539)	342.3	30,000 (87.64 mM)	30,000 (87.64 mM)	30,000 (87.64 mM)
Reguladores de crecimiento				

2,4-D (Sigma,D6679)	261.03	1 (3.9)	3 (11.5)	-
Kin (Sigma,K0753)	215.21	2 (9,3)	-	0.5 (2.3)
BA (Phytotech labs,B800)	226.3	-	1 (4.4)	-
ANA (Sigma,N1145)	224.30	-	-	0.05 (0.22)
pH		5.8	5.8	5.8

*Medios a la mitad de su fuerza iónica. MA=medio de mantenimiento. MPA=medio de pre-acondicionamiento. MI=medio de inducción.

Cuadro A.2 Composición de los medios de cultivo utilizados para el establecimiento y proceso de inducción de la ES en SC en *P. americana*.

Componentes	Masa Molar (g mol ⁻¹)	Medio de cultivo		
		MSP mg L ⁻¹ (mM)	MI mg L ⁻¹ (mM)	MMSE mg L ⁻¹ (mM)
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermont,63052)	132.14	-	132.2 (1)	132.2 (1)
NH ₄ NO ₃ (Sigma, A9642)	80.04	1,650 (20.60)	-	-
KNO ₃ (Fermont, 91842)	101.10	1,900 (18.80)	2527.5 (25)	2527.5 (25)
CaCl ₂ ·2H ₂ O (Sigma, C8106)	147.02	440 (3.00)	147 (1)	147 (1)
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O (J.T.Baker,3818-01)	137.99	-	138 (1)	138 (1)
FeSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma, F-7002)	278	27.80 (100)	27.80 (100)	27.80 (100)
Na ₂ EDTA (J.T.Baker, 8993-01)	372.24	37.30 (100)	37.30 (100)	37.9 (74.95)
MgSO ₄ ·7H ₂ O (J.T.Baker, 2500-01)	246.48	370 (1.50)	246.5 (1)	246.5 (1)
Microelementos		mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)
Na ₂ MoO ₄ ·H ₂ O (Sigma, S-6646)	241.9	0.25 (1.0)	0.25 (1.0)	0.25 (1.0)
H ₃ BO ₃ (Sigma, B6768)	61.83	6.20 (100.0)	6.20 (100.0)	6.20 (100.0)
MnSO ₄ ·4H ₂ O	223.06	15.10 (100.0)	15.10 (100.0)	15.10 (100.0)
CuSO ₄ ·5H ₂ O (J.T.Baker, 1843)	249.68	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)
*ZnSO ₄ ·7H ₂ O (Sigma,Z-0501)	287.56	8.60 (30.0)	8.60 (30.0)	8.60 (30.0)

KI (J.T.Baker,3162-50)	166.00	0.83 (5.0)	0.83 (5.0)	0.83 (5.0)
CoCl ₂ ·6H ₂ O (Merck,275839)	237.93	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)	0.025 (0.1)
Componentes orgánicos		mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)	mg L⁻¹ (μM)
Piridoxina HCl (Sigma,P-9755)	205.6	-	-	0.5 (2.5)
Ácido nicotínico (Sigma,N-4126)	123.1	-	-	0.5 (4.0)
Tiamina HCl (Sigma,T3902)	337.27	4.0 (12)	0.4 (1.19)	1 (2.96)
Mio-inositol (Sigma,I5125)	180.16	100.0 (555)	100.0 (555)	100.0 (555)
Glicina (Sigma,68898)	75.07	-	-	2.0 (26.64)
Glutamina (Sigma, G8540)	146.14	-	-	400 (2.74)
Sacarosa (Sigma, S539)	342.3	30,000 (87.64 mM)	30,000 (87.64 mM)	60,000 (175.28 mM)
Agua de coco (Acapulco)	-	-	-	100 ml
Reguladores de crecimiento				
Picloram	241.46	0.1 (0.41)	0.1 (0.41)	-
2,4-D (Sigma, D6679)	261.03	-	-	0.5 (1.9)
pH		5.7	5.7	5.7