



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**Estudio morfológico y análisis cuantitativo de la
relación auxinas/citocininas en callos de café
(*Coffea arabica* L.)**

Tesis que presenta

JUAN DIEGO UCO SÁNCHEZ

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Bioquímica y biología molecular)

Mérida, Yucatán, México

Febrero, 2025

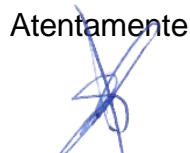
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Juan Diego Uco Sánchez titulado **Estudio morfológico y análisis cualitativo de la relación auxina/citocinina en callos de café (*Coffea arabica* L.)**, fue realizado en la Unidad de biología integrativa, en la línea de investigación Diferenciación Celular y de Desarrollo, en el laboratorio 24 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



Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de febrero de 2025

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 el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, éstos se regirán 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: _____

Juan Diego Uco Sánchez

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Biología Integrativa**, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y forma parte del proyecto titulado **Estudio de la Embriogénesis Somática** bajo la dirección del **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas**.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por brindarme una valiosa oportunidad de realizar el posgrado.

Al CONAHCyT por la beca otorgada con el número 1199569.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por aceptarme como parte de su grupo de investigación, por guiarme hacia la búsqueda de la verdad, a inculcarme el hecho de que toda pregunta tiene una respuesta y brindarnos las herramientas necesarias para el desarrollo de este trabajo. Por sus asesorías y conocimientos para la vida académica, profesional y personal.

A la doctora Rosa María Galáz Ávalos, por su incondicional apoyo técnico y sobre todo por la paciencia, gentileza, humildad y su buen trato hacia nosotros los estudiantes.

A los miembros de mi comité tutorial: Dra. Clelia de la Peña, Dra. Sara Nahuat y Dra. Rosa Us Camas, por sus consejos para mejorar el trabajo de investigación.

A mis compañeros del laboratorio 24, por las vivencias al momento de desarrollar este trabajo y por el aprendizaje que obtuve de cada uno de ellos.

A mis padres y familia por ser la piedra angular que me ayuda a lograr mis objetivos e impulsar mi vida.

DEDICATORIAS

El presente trabajo tiene una dedicatoria especial para toda mi familia, gracias a su sacrificio y esfuerzo he podido salir adelante a pesar de las dificultades que la vida me ha puesto.

Con mucho amor para mi madre Lorena Sánchez y mi padre Pascual Uco, el corazón y la fuerza que necesitaba ellos me la proporcionaron, no dudaron de mí en ningún momento de sus vidas. Espero además poder compartir más logros con ellos en tiempos futuros.

A mis amigos Jhair Soto y Miguel Sánchez, compañeros desde la adolescencia, gracias por seguir alentando mis objetivos y festejar los logros obtenidos.

A mis amigos de la licenciatura Ana Luisa Madrigal y Mauricio Torres, por apoyarme y motivarme a realizar el posgrado.

A todos los involucrados en la realización de este trabajo.

Índice

Contenido

Abreviaturas.....	i
Resumen	1
Abstract.....	1
Introducción	1
CAPÍTULO I.....	4
1. Antecedentes.....	4
1.1 Cafeto. Cultivo y generalidades	4
1.2 Zanahoria. Cultivo y generalidades.....	6
1.3 Cultivo de tejidos vegetales	7
1.4 Callos	10
1.5 Reguladores del crecimiento vegetal	13
1.6 Auxinas	15
1.7 Citocininas.....	18
1.8 Callos como herramienta de estudio para el cultivo de tejidos vegetales.....	21
1.9 Callos y <i>C. arabica</i>	26
1.10 Una breve nota sobre el cultivo de tejidos en <i>Daucus carota</i>	29
1.11 Justificación.....	32
1.12. Objetivos	32
1.12.1. Objetivo general	32
1.12.2. Objetivos específicos.....	33
1.12 Estrategia experimental.....	33
CAPÍTULO II.....	35
Materiales y Métodos.....	35
2.1. Introducción.....	35

2.2. Material vegetal.....	36
2.2.1. <i>Coffea arabica</i>	36
2.2.2. <i>Daucus carota</i>	36
2.3. Metodología para obtención y evaluación de callos	36
2.3.1. Inducción de callos de <i>C. arabica</i>	36
2.3.2. Establecimiento de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i>	37
2.3.3. Establecimiento de los callos de <i>Daucus carota</i>	37
2.3.4. Inducción de las suspensiones celulares	38
2.3.5. Determinación del crecimiento de las suspensiones celulares	39
2.3.6. Parámetros de evaluación del ciclo de cultivo.....	40
2.4 Análisis de los reguladores del crecimiento	41
2.4.1 Extracción de auxinas y citocininas	41
2.4.2 Purificación de auxinas y citocininas	41
2.4.3 Cuantificación de auxinas y citocininas por HPLC	42
CAPÍTULO III.....	43
Establecimiento de cultivo de tejidos de <i>Coffea arabica</i>	43
Resultados	43
3.1. Introducción.....	43
3.2. Inducción de callos.....	43
3.3. Ciclo de cultivo y evaluación de los diferentes parámetros	44
3.3.1 Análisis de los pesos fresco y seco	45
3.3.2 Morfología y dinámicas de crecimiento del ciclo de cultivo	46
3.4 Cuantificación de auxinas y citocininas.....	49
3.4.1 Determinación de auxinas y sus conjugados	49
3.4.2 Determinación de citocininas.....	55
CAPÍTULO IV	61
Establecimiento de cultivo de tejidos de <i>Daucus carota</i>	61

4.1. Introducción.....	61
4.2. Resultados	62
4.2.1. Generación de callos a partir de tubérculos.....	62
4.2.2. Inducción de las suspensiones celulares.....	63
4.2.3. Caracterización de una línea de suspensiones celulares de <i>D. carota</i>	64
4.2.3.1. Pesos fresco y seco	64
4.2.3.2. Conductividad y pH	66
CAPÍTULO V	69
Discusión.....	69
<i>Daucus carota</i>	73
CAPÍTULO VI	75
Conclusiones.....	75
Perspectivas.....	76
BIBLIOGRAFÍA.....	77
ANEXOS.....	95

Índice de figuras

Figura 1.1. Principales regiones productoras de café.....	4
Figura 1.2. Representación de las partes de una planta de <i>C. arabica</i>	5
Figura 1.3. Representación de una planta de <i>Daucus carota</i>	7
Figura 1.4. Descripción general de los procesos de embriogénesis somática (arriba) y organogénesis <i>de novo</i> (abajo) como parte importante del cultivo de tejidos vegetales.	9
Figura 1.5. Relación del contenido de auxinas y citocininas para la formación de callos, brotes y raíces.	11
Figura 1.6. Principales reguladores del crecimiento en plantas.	13
Figura 1.7. Auxinas naturales; A) ácido indol-3-acético (AIA), B) ácido indol-3-butírico (AIB), C) ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-IAA), D) ácido fenilacético (AFA).	16
Figura 1.8. Principales auxinas sintéticas. Ácido 1-naftalenacético, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético, el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram).....	17
Figura 1.9. Citocininas naturales. Existen dos grandes grupos, las tipo isoprenoides (isopentiladenina (iP), <i>cis</i> -zeatina (cZ), <i>trans</i> -zeatina (tZ) y dihidrozeatina (DZ), y las tipo aromáticas (benciladenina (BA), <i>meta</i> -topolina (mT), <i>orto</i> -topolina (oT), <i>meta</i> -metoxitopolina (MemT) y <i>orto</i> -metoxitopolina (MeoT)).	19
Figura 1.10. Citocininas sintéticas. En este grupo se encuentran la kinetina (KIN) y derivados de tipo fenilurea (<i>N,N'</i> -difenilurea (DPU), <i>N</i> -fenil- <i>N'</i> -(2-cloro-4-piridil)-3-fenilurea (CPPU) y tiazurón (TDZ).....	19
Figura 1.11. Diagrama general de la estrategia experimental	34
Figura 2.1 Inducción de callos de <i>C. arabica</i> . Izquierda. Plántulas cultivadas y mantenidas <i>in vitro</i> . Derecha. Hoja colocada en medio MIC.	37
Figura 3.1. Inducción de callos de <i>C. arabica</i> . Izquierda; formación de callos después de 4 semanas de inducción. Centro; callos después de 6 semanas de inducción. Derecha; proliferación de callos después de 10 semanas.....	44
Figura 3.2. Ciclo de crecimiento callos de <i>C. arabica</i> medido como aumento en los pesos fresco y seco. Se observan 4 fases; fase de adaptación (0-14), fase exponencial (14-24), fase lineal (24-31), un periodo de crecimiento decreciente después de la fase lineal (31-35) y una fase de crecimiento continuo similar a la fase lineal (38-42).	45
Figura 3.3. Morfología de callos de <i>C. arabica</i> . a) Callos en el día 0 (inducción). b) día 10. c) día 21. d) día 31 y e) día 42 en el ciclo de crecimiento callo.....	47

Figura 3.4. Contenido endógeno de AIA libre y sus conjugados en un ciclo de cultivo de <i>C. arabica</i> . AIA libre (barras naranjas), AIA-Leu (barras amarillas), AIA-Asp (barras moradas) y AIA-Ala (Barras verdes). Se recolectaron muestras del ciclo de crecimiento que abarcan desde el día 0 hasta el 42. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar (n=3). ..50	
Figura 3.5. Contenido endógeno de auxinas vista como participación del total del AIA libre y sus conjugados durante un ciclo de cultivo de <i>C. arabica</i>	51
Figura 3.6. Contenido de AIA libre en muestras de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).	52
Figura 3.7. Contenido de AIA-Ala en muestras de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).	53
Figura 3.8. Contenido de AIA-Asp en muestras de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).	54
Figura 3.9. Contenido de AIA-Leu en muestras de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).	54
Figura 3.10. Contenido endógeno de tres diferentes citocininas en un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Se recolectaron muestras del ciclo de crecimiento que abarcan desde el día 0 hasta el 42. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).	56
Figura 3.11. Contenido endógeno de citocininas vista como participación del total de la tZ libre y sus conjugados durante un ciclo de cultivo de <i>C. arabica</i>	56
Figura 3.12. Contenido de tZ en muestras de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes.	

Las barras de error representan el error estándar (n=3).	57
Figura 3.13. Contenido de iP en muestras de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).	58
Figura 3.14. Contenido de tZ en muestras de un ciclo de cultivo de callos de <i>C. arabica</i> . Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).	59
Figura 4.1. Inducción de callos de <i>D. carota</i> a partir de tubérculos. a) Asepsia de los tubérculos. b) Recorte transversal del tubérculo que contiene el cambium vascular. c) Crecimiento de callos alrededor del cambium vascular. d) Resiembra de los callos en medio MS (ver materiales y métodos).	62
Figura 4.2. Obtención de los callos de <i>D. carota</i> después de 4 semanas de inducción en medio MS. a) Día 0. b) Día. 14 c) Día 28.	63
Figura 4.3. Inducción de suspensiones celulares de <i>D. carota</i> . a) callo inoculado en un medio líquido. b) Día 30 de inducción. c) Día 60 de inducción.....	64
Figura 4.4. Crecimiento de las suspensiones celulares de <i>D. carota</i> basados en un ciclo de cultivo de 18 días bajo los parámetros de peso fresco (■) y peso seco (▲).	65
Figura 4.5. Crecimiento de las suspensiones celulares de <i>D. carota</i> basados en un ciclo de cultivo de 18 días bajo los parámetros de conductividad (▲) y pH (■).	66
Figura 4.6. Dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares de <i>D. carota</i> basado en un ciclo de cultivo de 18 días. a) Día 0. b) Día 6. c) Día 12. d) Día 18.....	67

Índice de tablas

Tabla 1.1. Protocolos de inducción y regeneración de callos aplicados a diferentes especies vegetales.	22
Tabla 1.2 Protocolos de inducción y regeneración de callos de <i>C. arabica</i>	27
Tabla 1.3. Recopilación de medios y de reguladores del crecimiento empleados para la obtención de callos, suspensiones celulares y embriones somáticos de zanahoria.	30
Tabla 2.1 Componentes del medio de cultivo para la inducción de callos de <i>C. arabica</i> .	38
Tabla 2.2 Componentes del medio de cultivo para la inducción suspensiones celulares de <i>D. carota</i>	39
Tabla 3.1. Resultados de la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación e índice de crecimiento de los callos al final de un ciclo de cultivo de 42 días.	48
Tabla 3.2 Resumen de las características físicas que experimentaron los callos con base en su color y consistencia a través de un ciclo de cultivo.	48

Abreviaturas

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
4-CI-IAA	Ácido 4-cloroindolacético
AIA	Ácido indol-3-acético
AIA-Ala	Ácido indol-3-acético – alanina
AIA-Asp	Ácido indol-3-acético - aspártico
AIA-Leu	Ácido indol-3-acético – leucina
AFA	Ácido fenilacético
AIB	Ácido indol-3-butírico
ANA	Ácido naftalenacético
ARN's	Ácidos ribonucleicos
BA	Benciladenina
CPPU	<i>N</i> -fenil- <i>N'</i> -(2-cloro-4-piridil)-3-fenilurea
cZ	<i>cis</i> -zeatina
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
Dicamba	Ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico
DZ	Dihidrozeatina
DPU	<i>N,N'</i> -Difenilurea
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ICO	Organización Internacional del Café
iP	Isopentiladenina
KIN	Kinetina
MMC	Medio de mantenimiento de callos
MemT	<i>meta</i> -metoxitopolina
MeoT	<i>orto</i> -metoxitopolina
MS	Medio Murashige & Skoog
mT	<i>meta</i> -topolina

oT	<i>orto</i> -topolina
PF	Peso fresco
Picloram	Ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico
PS	Peso seco
TDZ	Tidiazurón
tZ	<i>trans</i> -zeatina

Resumen

Desde el establecimiento del cultivo de tejidos, hace 90 años, este se ha convertido en un conjunto de herramientas que se utilizan desde contestar preguntas de la biología hasta desarrollos tecnológicos utilizando la biotecnología. Se utilizan desde especies que se utilizan solo como modelos biológicos en los laboratorios de investigación hasta la propagación masiva de plantas con fines agrícolas o industrial. Estos son los casos de *Daucus carota* y *Coffea arabica*. La primera de estas especies es un modelo prácticamente sin igual en el cultivo de tejidos, y la segunda es la planta de mayor importancia económica en la agricultura. En nuestro laboratorio hemos propagado de forma masiva *C. arabica* y deseamos utilizar *D. carota* como modelo en estudios biológicos. Para ello en este trabajo se han establecido las plataformas de inicio. En el caso de *C. arabica* se estableció un cultivo de callos con la finalidad de emplearlo como base para la obtención de embriones somáticos con dos finalidades, determinar los cambios bioquímicos y moleculares que convierten a una célula somática en un embrión que produce una planta sana y vigorosa y producir embriones somáticos que permitan la propagación de variedades elite. En el caso de zanahoria se establecieron callos y suspensiones celulares que permitan estudiar la cadena de señalización que provoca el cambio y señalado.

Abstract

Since the establishment of tissue culture 90 years ago, it has become a set of tools used to answer biology questions and develop biotechnology technologies. They range from species used only as biological models in research laboratories to mass propagation of plants for agricultural or industrial purposes. These are the cases of *Daucus carota* and *Coffea arabica*. The first of these species is a practically unrivaled model in tissue culture, and the second is the plant of the most significant economic importance in agriculture. In our laboratory, we have massively propagated *C. arabica* and wish to use *D. carota* as a model in biological studies. To this end, the starting platforms have been established for this work. In the case of *C. arabica*, a callus culture was established and characterized to use it as a base for obtaining somatic embryos with two purposes: to determine the biochemical and molecular changes that convert a somatic cell into an embryo that produces a healthy and vigorous plant and to produce somatic embryos that allow the propagation of elite varieties. In the case of carrots, calluses and cell suspensions were established and characterized to enable the study of the signaling chain that causes the changes already mentioned.

Introducción

El cultivo de tejidos vegetales es una herramienta central en la biotecnología vegetal que permite la propagación, mejora genética y conservación de plantas mediante el uso de pequeños fragmentos de tejido vegetal en condiciones controladas. Una de las etapas fundamentales en este proceso es la formación de callos, que son masas de células indiferenciadas generadas en respuesta a heridas o condiciones específicas de cultivo. Los callos sirven como una base celular versátil que puede ser inducida a diferenciarse en diversos órganos vegetales.

Por otra parte, para promover diferentes respuestas del cultivo *in vitro*, desde hace varios años se sabe que esto es el resultado de la manipulación de los componentes del medio de cultivo, principalmente de los reguladores del crecimiento. Así mismo, los reguladores del crecimiento se caracterizan por generar una respuesta específica entre células, tejidos y/u órganos en las especies vegetales lo que provoca una serie de cambios morfo-fisiológicos.

Al mismo tiempo, los reguladores del crecimiento más estudiados y utilizados para las investigaciones biológicas son las auxinas y las citocininas, siendo estas las principales biomoléculas que generan un vínculo directo con diferentes procesos moleculares por los cuales se puede desarrollar una planta. Las auxinas, como el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido naftalenoacético (ANA), promueven la división celular y la formación inicial de callos, actuando como señales clave para la proliferación de células indiferenciadas. Por otro lado, las citocininas, como la kinetina (KIN) y la benciladenina (BA), son esenciales para la diferenciación y desarrollo de los callos, promoviendo la formación de brotes y la organogénesis.

El descubrimiento de los mecanismos de acción de las auxinas y citocininas, tanto en la naturaleza como en condiciones controladas, han generado varias investigaciones referentes a su participación en la gran mayoría de los procesos con los que cuenta una célula. Por su parte, el estudio de callos vegetales basado en la relación auxinas-citocininas ha sido de gran ayuda para establecer protocolos de inducción y regeneración de plantas.

En la actualidad, el equilibrio entre auxinas y citocininas en los medios de cultivo determina el destino del callo, permitiendo la regeneración de plantas completas a partir de células indiferenciadas. Este equilibrio hormonal es la base para la manipulación eficiente del

cultivo de tejidos vegetales, facilitando avances significativos en la agricultura, horticultura y conservación de especies vegetales.

CAPÍTULO I

1. Antecedentes

1.1 Cafeto. Cultivo y generalidades

El café es la segunda bebida más consumida del mundo y por ende uno de los cultivos agrícolas más importantes. Es un producto de exportación agrícola de más de 50 países considerados en vías de desarrollo de África, Asia, América Latina y Oceanía (Figura 1.1). Así mismo, de acuerdo con la ICO (Organización Internacional del Café), hasta el año 2021 se produjeron más de 1,000 millones de sacos de 60 kg de este producto alrededor del mundo (<https://www.ico.org/>).

En la actualidad, existe una gran demanda de producción de plantas de cafeto para cubrir la exigencia creciente en el mercado internacional. En general, la comercialización del café representa una ganancia de millones de dólares anuales, lo que genera como consecuencia la fuente de negocios y empleos de miles de familias (Aga and Khillare, 2017; Davis *et al.*, 2012; Quintana-Escobar *et al.*, 2021).

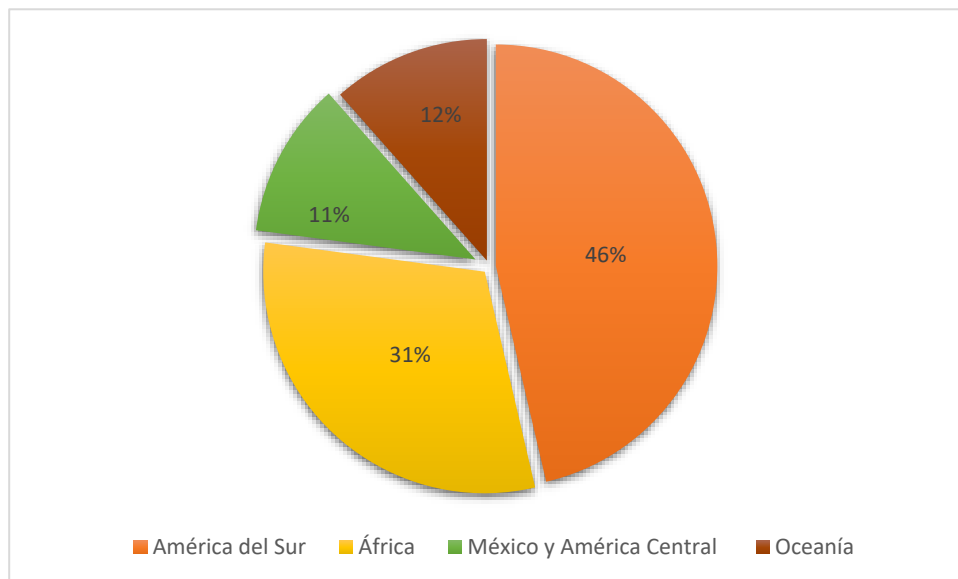


Figura 1.1. Principales regiones productoras de café.

El café es un género de plantas con flores (angiosperma) que pertenece a la familia de las Rubiaceae. En la actualidad, este género cuenta con alrededor de 130 especies reconocidas, las cuales se componen principalmente de árboles perennes y leñosos que difieren, en gran parte, de sus condiciones de adaptación, morfología y tamaño (Melese and Kolech, 2021; Quintana-Escobar *et al.*, 2021).

Entre las especies más importantes de este género, solo dos de ellas con distintas cualidades organolépticas producen el 99% del total del café; *Coffea arabica* (cafeto arábigo) normalmente cultivada en la montaña y la favorita entre los consumidores por su bajo amargor, representa aproximadamente entre el 60-65% de la producción mundial. Por otra parte, *Coffea canephora* (café robusta) se le cultiva preferentemente en tierras bajas intertropicales, se caracteriza por tener un fuerte amargor y un mayor contenido de cafeína, representa entre el 35-40% de la producción mundial en la actualidad (Avila-Victor *et al.*, 2023; van der Vossen *et al.*, 2015).



Figura 1.2. Representación de las partes de una planta de *C. arabica*.

C. arabica es una dicotiledónea de hoja perenne, que puede alcanzar entre los 8 y los 10 m de altura. Entre sus características principales se encuentran la ramificación dimórfica (se encuentran en dos tipos distintos: ramas plagiotrópicas y ramas ortotrópicas), su floración, la cual consiste en dos pasos separados (la iniciación de las yemas y la apertura de las flores), el fruto (pericarpio), que está compuesto por el exocarpio, mesocarpio y endocarpio (donde se encuentra la semilla) y la semilla, caracterizada por contener

principalmente un endospermo corneo verde y un embrión cerca de la base (Ferreira *et al.*, 2019; Melese and Kolech, 2021) (Figura 1.2). *C. arabica* es una especie predominantemente autopolinizada y en consecuencia homocigótica, por lo que suele ser bastante uniformes, por lo que comúnmente se propagan por semillas. Sin embargo, el problema de esta especie radica en que estos cultivares llegan a alcanzar hasta un 20% de alogamia, lo que se traduce como en una pérdida de la conservación de plantas de buena calidad, heterosis y poca resistencia a patógenos (Kumar *et al.*, 2006; Vallejos-Torres *et al.*, 2020).

Aunado a lo anterior, *C. arabica* se caracteriza por ser autógama y la única especie tetraploide de su género ($2n = 4x = 44$ cromosomas), diferenciándose específicamente de *C. canephora* ($2n = 2x = 22$ cromosomas), su ancestro y competidor comercial. Generalmente se cultiva en regiones con altitudes que están entre los 1500 y 2500 msnm (cuanto más se acerca esta especie al ecuador, mayor es la altitud necesaria para un crecimiento óptimo), aunque también se encuentra en extensiones más bajas en un rango de los 500 msnm. Así mismo, la temperatura óptima para el crecimiento y desarrollo de las plantas de *C. arabica* se encuentra entre los 18 y 24 °C aproximadamente (Aguilar *et al.*, 2018; Melese and Kolech, 2021; Méndez-Hernández *et al.*, 2023).

Debido a la importancia mencionadas anteriormente, el estudio de *C. arabica* ha tomado relevancia desde hace tiempo, ya que se encuentra entre las especies agrícolas más importantes para el ser humano. Es por esto por lo que las investigaciones sobre esta especie están centradas en obtener una mayor producción de plantas, un mejor rendimiento de los granos obtenidos, así como mejorar la calidad del sabor y el aroma de la bebida (Avila-Victor *et al.*, 2023; Etienne *et al.*, 2018; Ferreira *et al.*, 2019).

1.2 Zanahoria. Cultivo y generalidades

Las zanahorias (*Daucus carota* ssp. sativus L.) (Figura 1.3) se encuentran entre las 10 principales hortalizas, según los registros de producción mundial de hortalizas primarias, después de los jitomates, las cebollas, el repollo, los pepinos y las berenjenas (<https://www.fao.org/statistics/en>; 27/noviembre/2024). La zanahoria es el único miembro de las Apiaceae entre las 22 hortalizas primarias utilizadas por el hombre (Simon, 2019b). En la actualidad, la zanahoria se cultiva en todo el mundo y se ha adaptado ampliamente a las zonas de producción templadas de Europa, Asia y América, y recientemente se han desarrollado variedades para climas subtropicales e incluso tropicales (Simon *et al.*, 2008).

Las zanahorias anaranjadas son ricas en provitamina A y carotenoides (Simon, 2019a).

La zanahoria pertenece a la familia Apiaceae (Umbelliferae). Esta familia contiene 466 géneros y 3,820 especies (Plunkett *et al.*, 2018) y es una de las familias más grandes de plantas con semillas. Tiene una distribución casi cosmopolita, pero es más diversa en las regiones templadas del hemisferio norte (Downie *et al.*, 2000a; Downie *et al.*, 2000b; Downie *et al.*, 2000c).

Las especies de *Daucus* son generalmente herbáceas bienales, raramente anuales, que crecen a partir de raíces pivotantes delgadas a muy robustas. Debido a la polifilia (organismos que comparten una historia evolutiva descendente de más de un antepasado común) del género descrito, el sistema de clasificación actual de *Daucus* requiere una revisión profunda. Se necesitan datos adicionales de marcadores moleculares y morfológicos antes de proponer un sistema de clasificación viable para el género *Daucus* (Grzebelus *et al.*, 2011). Para poner el problema taxonómico del complejo *Daucus carota* en contexto histórico, se están examinando varios enfoques moleculares examinando su diversidad y relaciones genéticas (Spooner, 2019).



Figura 1.3. Representación de una planta de *Daucus carota*.

1.3 Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) se define como el conjunto de técnicas utilizadas para el establecimiento, desarrollo y mantenimiento de cualquier parte de una planta, bajo condiciones controladas (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018). El CTV es una

herramienta que brinda una serie de sistemas modelo para la investigación fisiológica, bioquímica, y genética, así como estructural, con la finalidad de ponerse en prácticas de clonación, conservación y manipulación *in vitro* de cualquier material vegetal. Las bases de este sistema fueron propuestas por Gottlieb Haberlandt (1902) teniendo como estudio un cultivo de células de diversas especies, dando como resultados los primeros datos acerca de las interrelaciones e influencias complementarias a las que están expuestas las células dentro de un organismo multicelular completo. En la actualidad, gracias al mejoramiento de esta técnica biotecnológica se realizan varios tipos de cultivos de tejidos; siendo los principales el cultivo de plantas completas, órganos, tejidos específicos, cultivo de células, así como co-cultivos (Long *et al.*, 2022; Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018).

En general, el CTV cuenta con tres principios básicos y de estos depende el éxito o fracaso de cualquier trabajo en esta área. El primero de estos principios es la “elección del explante” y radica en la selección de un órgano, tejido o segmento de tejido vegetal específico que será utilizado para el inicio del cultivo. Dentro de las partes de las plantas utilizadas se encuentran la semilla, el segmento de una hoja, un embrión, tallo, un cotiledón entre otros. Aunado a lo anterior, cabe destacar que el tipo de explante seleccionado será determinante para obtener el tipo de respuesta seleccionada (Bidabadi and Jain, 2020; Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018).

El segundo principio es la “elección del medio de cultivo y de las condiciones de cultivo”. Para este caso, el medio de cultivo y el tipo de explante son cruciales en la respuesta que se obtendrá. El medio de cultivo consiste en dos grupos principales de compuestos químicos, el primero se caracteriza por tener compuestos esenciales (vitaminas, minerales y fuente de carbono), siendo estos los que satisfacen las necesidades nutricionales del CTV. El segundo grupo, son los llamados opcionales (reguladores del crecimiento, luz, fotoperiodo, temperatura y humedad), estos no se consideran indispensables para mantener la vida del tejido cultivado, pero si determinan el tipo de respuesta expresada, y por eso de ellos depende el éxito o fracaso del establecimiento y respuesta de los cultivos *in vitro* (Phillips and Garda, 2019). Finalmente, el tercer principio es el “establecimiento de las condiciones asépticas”. Este principio se fundamenta en que para que un cultivo de cualquier tejido prospere de manera adecuada, no debe tener ningún tipo de organismo contaminante. De esta manera, para mantener el medio de cultivo bajo condiciones asépticas debe ser esterilizado para evitar cualquier tipo de contaminante (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018).

Generalmente, la inducción de un brote a partir de un tejido vegetal se puede realizar de dos formas, siendo estas la organogénesis y la embriogénesis somática. Para el caso de la organogénesis *in vitro*, esta se caracteriza por la formación *de novo* de órganos en los explantes cultivados, y está basada en el principio de la totipotencialidad celular, el cual, indica que cada célula tiene toda la información genética necesaria para formar una planta completa o llevar a cabo las funciones de cualquier órgano o tejido vegetal. La organogénesis cuenta con dos vías; la vía directa y la vía indirecta. En el caso de la vía directa, el brote se genera directamente en el explante cultivado previamente, mientras que, en el caso de la vía indirecta, se genera una masa de células denominada callo y posteriormente se forman los brotes (Bidabadi and Jain, 2020; Long *et al.*, 2022) (Figura 1.4).

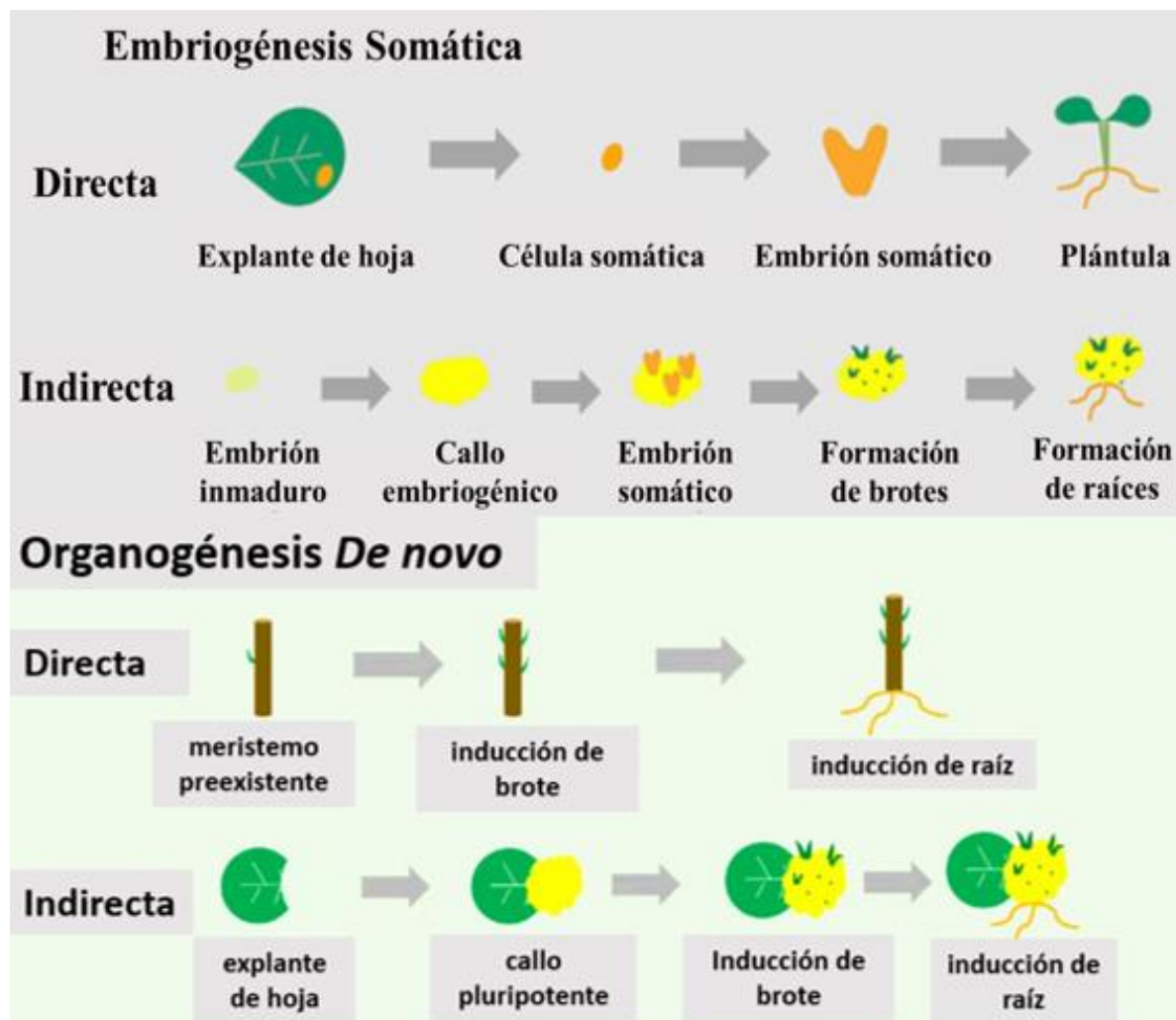


Figura 1.4. Descripción general de los procesos de embriogénesis somática (arriba) y organogénesis *de novo* (abajo) como parte importante del cultivo de tejidos vegetales.

A su vez, la embriogénesis somática puede ser de vía directa o indirecta, teniendo como el fin de su proceso la formación de embriones somáticos. Estos embriones cuentan, al igual que los cigóticos, con la capacidad de generar una nueva planta después de un proceso de germinación, diferenciándose principalmente de que la embriogénesis somática es un proceso asexual, por lo que la planta generada será exactamente igual a la planta donadora del tejido inicial. Dado que para lograr cualquiera de estos procesos se tomará en cuenta el tipo de especie, el regulador de crecimiento vegetal empleado, así como otros factores involucrados en este proceso (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018; Méndez-Hernández *et al.*, 2019).

El CTV cuenta además con varias aplicaciones importantes, entre las cuales destacan la conservación de germoplasma, micropropagación, fitomejoramiento y el mejoramiento genético, ingeniería genética, edición de genomas, entre otras. Además, gracias a esta herramienta tecnológica de regeneración se le ha podido utilizar ampliamente en varios campos de la ciencia, que va desde las investigaciones básicas, hasta la mejora transgénica de un cultivo específico (Long *et al.*, 2022; Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018; Phillips and Garda, 2019).

1.4 Callos

En la naturaleza, las plantas tienen la capacidad de generar masas celulares que no se encuentran organizadas, esto como parte de una respuesta a tensiones como heridas o infecciones por patógenos, lo que también les brinda un método para cerrar lesiones, así como reemplazar partes u órganos perdidos (Ikeuchi *et al.*, 2013). Este tipo de tejido vegetal se denomina “callo” y se forma a partir de células que anteriormente se encontraban en un estadio diferenciado. Los callos cuentan con la capacidad de ser totipotentes, puesto que pueden generar desde un tejido u órgano perdido hasta una planta completa (Efferth, 2019; Fehér, 2019).

Si bien en la actualidad existe un debate entre los investigadores referente al estadio diferenciado de los callos (se considera el hecho de que el tejido pasa de un estadio de mayor a menor diferenciación), se ha reconocido que los callos son muy diversos y hasta pueden clasificarse de acuerdo con sus propiedades macroscópicas, anatómicas, fisiológicas y morfológicas (Lee *et al.*, 2024). Los principales ejemplos son los callos friables o compactos, que se caracterizan por no tener ningún tipo de regeneración y, por otra parte, están los callos que sí cuentan con algún tipo de regeneración aparente, como los callos

embrionarios, puntiagudos y radiculares. Estos últimos se subdividen acorde al órgano que puedan generar (Ikeuchi *et al.*, 2013).

La inducción de los callos bajo un ambiente controlado se puede generar mediante la aplicación exógena de auxinas y citocininas. Así mismo, una concentración elevada de auxinas y una baja de citocininas o un alto contenido en citocininas, pero baja concentración en auxinas en los medios de cultivo de inducción de callos provoca una respuesta que lleva a la formación de raíces y brotes respectivamente (organogénesis) (Phillips and Garda, 2019) (Figura 1.5). Por otra parte, existen otros factores que influyen en la formación y el crecimiento de los callos, estos incluyen la edad fisiológica del órgano o tejido utilizado como fuente del explante, las condiciones ambientales por las cuales se cultivan las plantas previas a tomar el explante, la organización de las células, así como el tamaño y ubicación del explante en la planta (Galaz-Ávalos *et al.*, 2012).

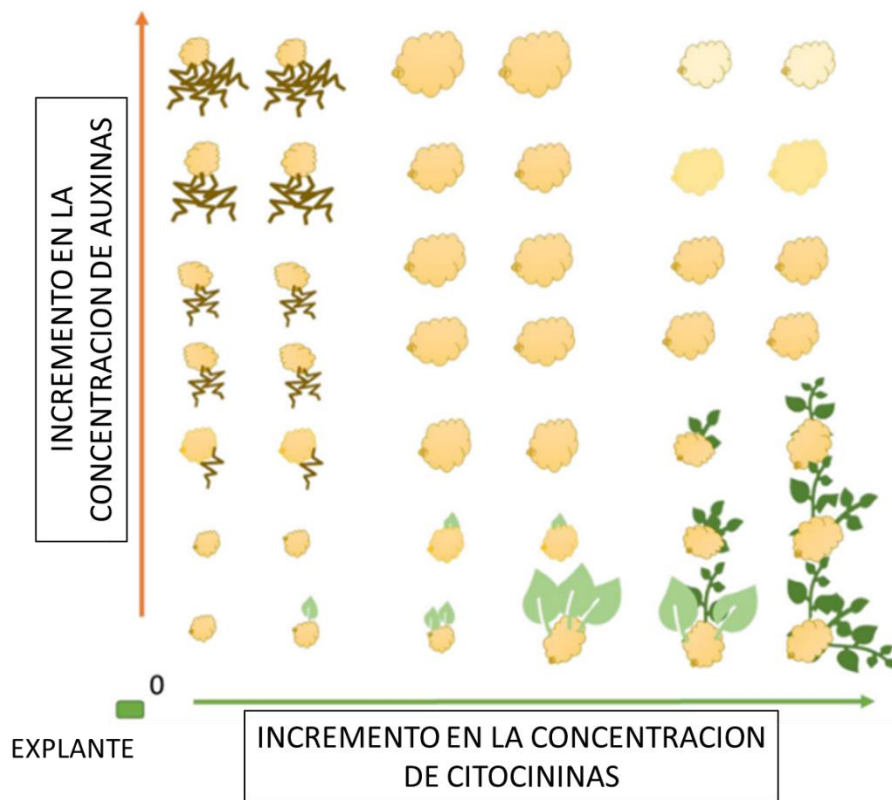


Figura 1.5. Relación del contenido de auxinas y citocininas para la formación de callos, brotes y raíces.

En el caso del crecimiento de los callos *in vitro*, se ha logrado identificar que estos no se originan en todas las células del explante, sino preferencialmente en las células del periciclo que se ubican en los polos del protoxilema. Gracias a lo anterior, se pudo determinar que

el tejido calloso también cuenta con células heterogéneas y con una organización tisular (Fehér, 2019; Lee *et al.*, 2024).

En cuanto a la maquinaria bioquímica y molecular que funciona al interior de los callos, se sabe que la formación del tejido se genera a través de complejos mecanismos moleculares. Uno de estos mecanismos se centra en la supresión del ciclo celular mitótico, lo que genera como resultado una readquisición de la competencia proliferativa de las células. Por otra parte, la activación de un regulador del ciclo celular para un solo núcleo como las ciclinas, por si solas, normalmente no cuentan con la capacidad de regenerar callos por si solas (Efferth, 2019; Zhai and Xu, 2021).

Dado que, en especies estrechamente relacionadas, e incluso entre cultivares de la misma especie la respuesta de los callos pueden ser variables, se han hecho estudios con la finalidad de saber a qué se le atribuye su capacidad de dediferenciación (Fehér, 2019). Una de las alternativas para la determinación de las diferencias del comportamiento genético de las especies es el estudio de sus genes. Mediante la determinación e identificación genética se identificaron varias características y funciones específicas necesarias para adquirir la capacidad de diferenciación para regenerar callos (Shin and Seo, 2018; Zhai and Xu, 2021). Así mismo, diferentes niveles de factores que involucran el procesamiento de varios ARN's también reflejan diferentes tipos de competencia para la división celular, por lo que esto tiene una inferencia directa en el proceso de dediferenciación de los callos (Ikeuchi *et al.*, 2013; Shin and Seo, 2018; Sugiyama, 2015).

La historia de los callos como parte de los sistemas de cultivo de tejidos inició en 1938, cuando tres grupos de forma independiente publicaron la obtención de cultivos de callos (Gautheret, 1939; Nobécourt, 1938; White, 1939), esto gracias al descubrimiento del papel que juegan las auxinas en la función celular. En los años posteriores, los avances en el estudio de los callos progresaron de manera rápida, teniendo como los más importantes el desarrollo de nuevos medios de cultivo más específicos para diferentes modelos vegetales, implementación de nuevos protocolos de regeneración de plantas a partir de callos, transformación genética basados en el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, micropropagación clonal y propagación clonal masiva, conservación y bancos de germoplasma, edición genómica y producción de metabolitos secundarios (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018; Thorpe, 2012).

En la actualidad, el estudio de callos se encuentra en expansión debido a que se continua

con el desarrollo de nuevas tecnologías y técnicas que permiten descifrar las interrogantes que continúan sin resolverse. La integración de herramientas de estudio como las ciencias omicas ayudan en cuestiones de manipulación más precisa de los callos. Lo anterior con la finalidad de mejorar la eficiencia y productividad de los cultivos vegetales, añadiendo el uso de bioprocesos los cuales ayudaran al añadir un alto valor a la industria de la biotecnología vegetal.

1.5 Reguladores del crecimiento vegetal

Los reguladores del crecimiento vegetal son compuestos naturales y/o sintéticos caracterizados por modificar los procesos metabólicos del desarrollo en las plantas. Estos compuestos están implicados en prácticamente todos los procesos fisiológicos y morfológicos, siendo los principales el crecimiento de la planta y la formación de raíces, tallos, hojas, floración, y la formación y maduración de frutos, entre otros (EL Sabagh *et al.*, 2022; Sosnowski *et al.*, 2023).

Actualmente las auxinas, el ácido abscísico, las citocininas, el etileno y las giberelinas se reconocen como los primeros cinco tipos de reguladores del crecimiento vegetal naturales determinados, siendo también los más estudiados (Chaiwanon *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2020) (Figura 1.6). Además, se han descubierto nuevas sustancias de crecimiento natural que tienen funciones en el desarrollo de las plantas. Las poliaminas, los jasmonatos, los brasinoesteroides, el ácido salicílico, el óxido nítrico, entre otros (EL Sabagh *et al.*, 2022; Gaspar *et al.*, 1996).

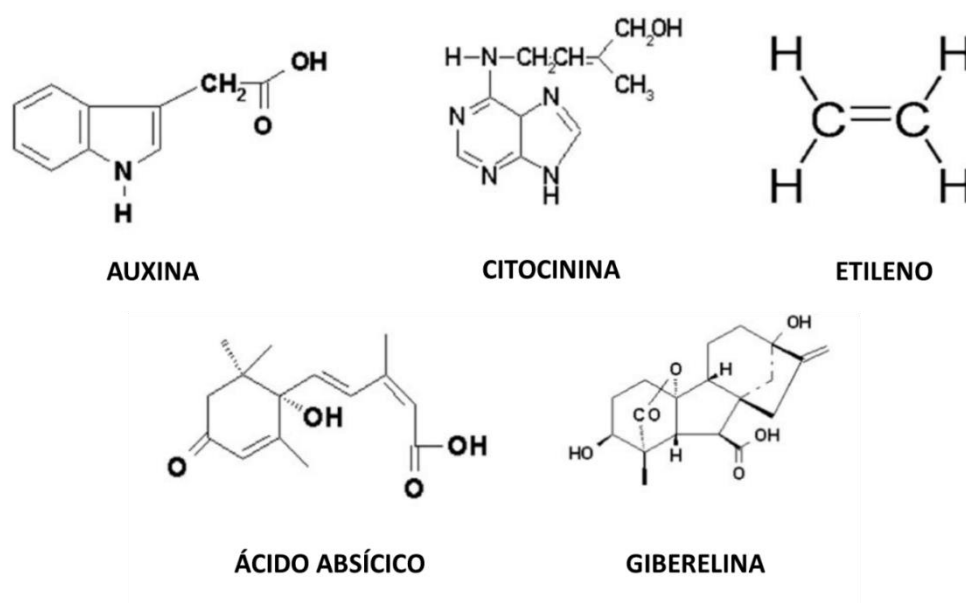


Figura 1.6. Principales reguladores del crecimiento en plantas.

Dentro de los cinco tipos de reguladores del crecimiento presentes de manera natural en las plantas, las auxinas intervienen en procesos tales como fototropismo, gravitropismo, dominancia apical, formación de la raíz, formación del tejido vascular, epinasti y embriogénesis (Blakeslee *et al.*, 2019; Quintana-Escobar *et al.*, 2021). Por otra parte, las citocininas están involucradas en el crecimiento de las plantas, estimulan la formación de las yemas laterales e inhiben el envejecimiento de los órganos y tejidos de la planta (Márquez-López *et al.*, 2019; Sakakibara, 2021). Por su parte las giberelinas inducen la germinación, interrumpen la latencia y estimulan la división celular (Khan *et al.*, 2020). Finalmente, el etileno y el ácido abscísico tienen un efecto opuesto a los tres mencionados previamente, ya que inhiben el crecimiento y desarrollo de la planta y aceleran la senescencia. Todos los reguladores del crecimiento se pueden formar en diferentes partes de la planta y tienen la capacidad de actuar tanto en los tejidos en donde fueron sintetizados, como en tejidos blanco-remotos. En la mayoría de los casos, el mecanismo de acción de los reguladores del crecimiento en las plantas tratadas se basa en la inhibición de la biosíntesis de sus reguladores endógenos o su translocación desde su sitio de producción hasta su sitio de acción y el bloqueo de sus receptores (Gaspar *et al.*, 1996; Sosnowski *et al.*, 2023).

Los efectos de los reguladores del crecimiento aplicado incluso en pequeñas cantidades modifican la fisiología de la planta y modifican su crecimiento y desarrollo. Además, las respuestas de las células, tejidos y órganos dentro de un cultivo controlado varían según diversos factores como las condiciones de cultivo, el tipo de explante y el genotipo (Gaspar *et al.*, 1996; Small and Degenhardt, 2018). Generalmente, se requiere la participación de dos o más reguladores del crecimiento, independientemente si son aplicados simultánea o secuencialmente para generar una respuesta. Por otra parte, se debe tomar en cuenta que además de generar un efecto directo sobre los mecanismos celulares, la mayoría de los reguladores aplicados exógenamente pueden cambiar la síntesis, la activación, el transporte o la sensibilidad a otros reguladores del crecimiento endógenos (Rademacher, 2015; Sosnowski *et al.*, 2023).

Desde el descubrimiento de la acción de los reguladores del crecimiento dentro del cultivo de tejidos, se ha determinado que cada uno de ellos proporciona al explante la capacidad de desarrollarse, en conjunto o por separado (Rademacher, 2015; Thorpe, 2012). Lo anterior se debe a factores específicos como la concentración y las condiciones de incubación controladas. Por otra parte, la adicción de reguladores del crecimiento en varios

sistemas de cultivo tiene una importancia relevante en la inducción de la diferenciación celular (EL Sabagh *et al.*, 2022; Small and Degenhardt, 2018).

En la actualidad, los reguladores de crecimiento naturales rara vez se aplican en los cultivos, si no que normalmente se utilizan reguladores sintéticos. En el caso de las auxinas los principales compuestos sintéticos son el 2,4-D y ANA. En el caso de las citocininas predomina la BA.

Así mismo, en el campo del cultivo de tejidos vegetales, los reguladores del crecimiento se encuentran involucrados en varias áreas de estudios específicas, como lo son el comportamiento celular, la modificación y desarrollo de plantas, la producción de plantas libres de patógenos, el almacenamiento de germoplasma, la propagación clonal y la formación de metabolitos secundarios (Bidabadi and Jain, 2020; Gaspar *et al.*, 1996; Sosnowski *et al.*, 2023). Además, dentro de la planta, estos compuestos pueden tener diferentes respuestas dependiendo del órgano o tejido blanco, la etapa de desarrollo, la concentración relativa de otros reguladores, la disponibilidad, la absorción y almacenamiento de agua y nutrientes, las condiciones climáticas y ambientales, entre otros factores (Small and Degenhardt, 2018).

Generalmente, los reguladores del crecimiento se utilizan en la agricultura con la finalidad de obtener ventajas específicas tales como una menor susceptibilidad a los factores biótico y abiótico, la obtención de una estructura morfológica mejorada, aumentos cuantitativos y cualitativos del rendimiento del grano o la biomasa y una modificación de los componentes moleculares de las plantas. Otra de las aplicaciones principales de estos compuestos radica en utilizarlos para una especie de "ajuste fino" de las plantas que crecen en un lugar determinado bajo condiciones ambientales incontrolables e impredecibles (Rademacher, 2015; Small and Degenhardt, 2018; Sosnowski *et al.*, 2023).

1.6 Auxinas

Las auxinas se definen como ácidos orgánicos de baja masa molecular y se caracterizan por tener en su estructura un anillo indol y una cadena lateral de ácido carboxílico, similar al aminoácido triptofano. El término auxina, procedente de la palabra griega "auxein" que significa "crecer o expandirse", se acuñó para describir sustancias con actividad de señalización basada en el bioensayo de curvatura del coleoptilo (Sosnowski *et al.*, 2023; Yu *et al.*, 2022). Estas moléculas, cuentan con la capacidad de controlar la división y

elongación, alterando la plasticidad de la pared celular, confiriendo polaridad, dominancia apical y respuesta trópica por acción de la luz o la gravedad. Además, intervienen en otros procesos como la respuesta a patógenos, el control de la senescencia, la formación de los frutos, así como la absorción en las hojas (Blakeslee *et al.*, 2019; Gaspar *et al.*, 1996; Ma *et al.*, 2018; Small and Degenhardt, 2018).

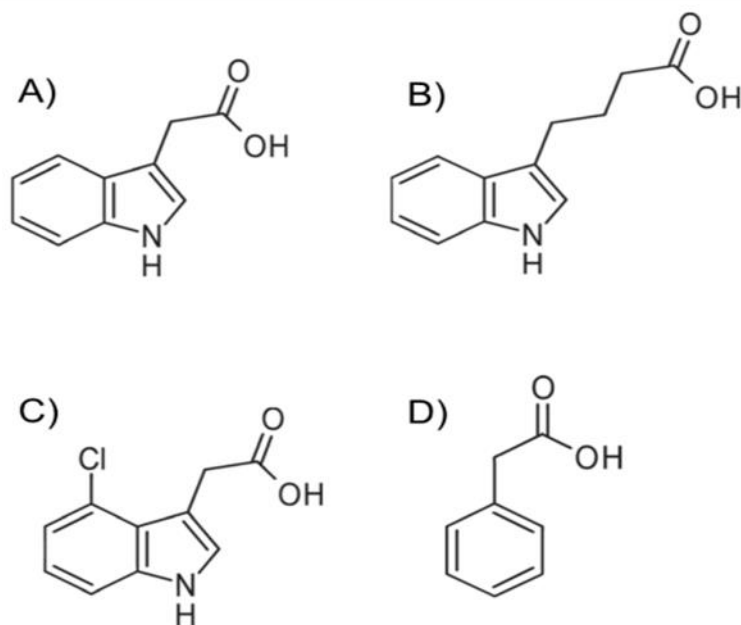


Figura 1.7. Auxinas naturales; A) ácido indol-3-acético (AIA), B) ácido indol-3-butírico (AIB), C) ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-IAA), D) ácido fenilacético (AFA).

Normalmente, las auxinas están divididas en dos grupos principales, naturales y sintéticas. Dentro de las auxinas naturales están el ácido indol-3-acético (AIA), el ácido indol-3-butírico (AIB), el ácido 4-cloroindolacético (4-Cl-IAA) y el ácido fenilacético (AFA) (Figura 1.7), siendo el AIA el compuesto más abundante y junto con el AIB los más estudiados dentro de las plantas superiores (Rademacher, 2015; Yu *et al.*, 2022). Por otra parte, están los análogos sintéticos de auxinas, que difieren en su estructura, pero comparten muchas actividades biológicas parecidas a las auxinas endógenas; entre los cuales destacan el ácido 1-naftalenacético (ANA), el 2,4-D, el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), el

ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram) (Machakova *et al.*, 2008) (Figura 1.8).

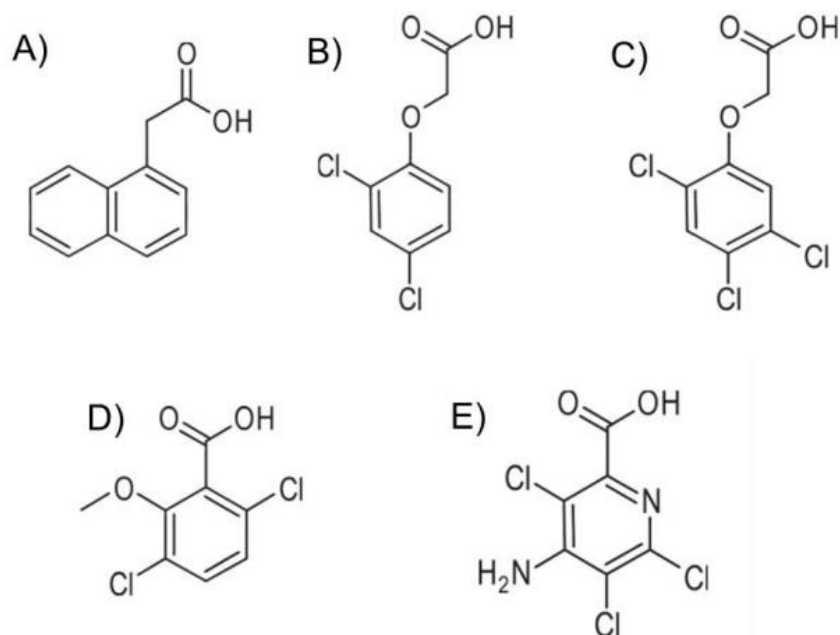


Figura 1.8. Principales auxinas sintéticas. Ácido 1-naftalenacético, el ácido 2-4-diclorofenoxiacético, el ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, el ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (dicamba) y el ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram).

En el caso de los estudios de investigación, raramente se utilizan las auxinas naturales ya que se utilizan principalmente sus contrapartes sintéticas, siendo el 2,4-D el compuesto preferentemente aplicado. Por otra parte, los análogos sintéticos de auxina generan ventajas en su uso, las cuales consisten en su estabilidad química, control y consistencia de su actividad en los medios de cultivo, resistencia a la degradación, lo que las hace más efectivas a lo largo del tiempo, eficacia en inducción de respuestas, versatilidad en aplicaciones, minimización en la variabilidad, así como en la disponibilidad del producto y en sus costos (Gaspar *et al.*, 1996; Machakova *et al.*, 2008; Sosnowski *et al.*, 2023).

Normalmente, las auxinas dentro de la planta se encuentran en dos formas, libres y conjugadas. La forma libre es una pequeña fracción de la cantidad total y es biológicamente activa, mientras que la mayoría de la auxina se encuentra conjugada y no es biológicamente activa. Así mismo, cada auxina cuenta con funciones específicas que las diferencian de las otras, por ejemplo, el AIB es más eficaz para inducir raíces laterales y adventicias que el AIA (Sosnowski *et al.*, 2023). Otra característica distintiva de las auxinas es su transporte. Este se clasifica en dos; el transporte polar, que abarca un movimiento de la sustancia de la parte superior de la planta (ápice) a la parte inferior (raíces), y el transporte celular

dirigido, que radica en un desplazamiento célula a célula a través de transportadores específicos, lo que permite un control preciso en su distribución a través de los tejidos (Hammes *et al.*, 2022). Por otra parte, diferentes partes de la planta (brotes, yemas y raíces) pueden reaccionar de manera diferente a las auxinas, debido a esto, el tipo y la concentración de auxinas elegidas para mejorar en crecimiento de las plantas dependen de la especie, la tasa de absorción y el transporte al tejido blanco, los niveles naturales existentes de auxinas dentro de la planta, la sensibilidad, la tasa metabólica y la interacción entre los reguladores del crecimiento en el interior del tejido blanco (Machakova *et al.*, 2008; Small and Degenhardt, 2018).

Desde su descubrimiento en las plantas, las auxinas han sido objeto de estudios específicos de acción referentes a su asimilación, estructura, transporte, biosíntesis, metabolismo, señalización y degradación lo que la convierte junto con las citocininas en los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados (Gomes and Scortecci, 2021; Hammes *et al.*, 2022; Tan *et al.*, 2021; Yu *et al.*, 2022). En la actualidad, las auxinas están consideradas una herramienta muy importante en el campo del cultivo de tejidos vegetales. Gracias a ellas se pueden promover varios procesos en el desarrollo de tejidos y células vegetales como lo son la inducción de callos, la formación de raíces y brotes, la proliferación celular, la dediferenciación y la rediferenciación, así como la regeneración de plantas (Aloni, 1980; Machakova *et al.*, 2008; Small and Degenhardt, 2018).

1.7 Citocininas

Las citocininas son otro tipo de regulador del crecimiento vegetal que funciona como molécula señal para varios procesos biológicos, entre los que destacan la división y diferenciación celular, el desarrollo vascular y floral, la homeostasis de los nutrientes, la expansión de las hojas, el reloj circadiano, las respuestas al estrés abiótico, la apertura de los estomas, la germinación de las semillas, el mantenimiento del meristemo apical, ramificación y nodulación, la senescencia de las hojas, el desarrollo de las raíces laterales, y la regulación del transporte polar de las auxinas (Kieber and Schaller, 2018; Márquez-López *et al.*, 2019; Sakakibara, 2005).

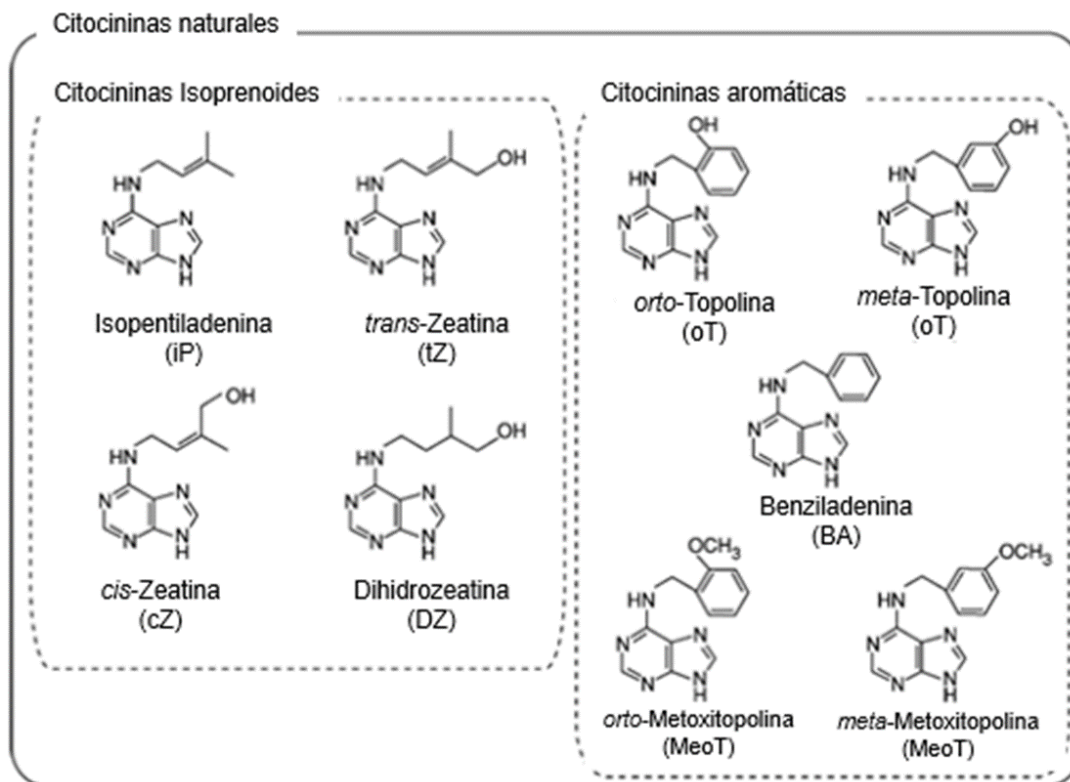


Figura 1.9. Citocininas naturales. Existen dos grandes grupos, las tipo isoprenoides (isopentiladenina (iP), *cis*-zeatina (cZ), *trans*-zeatina (tZ) y dihidrozeatina (DZ), y las tipo aromáticas (benciladenina (BA), *meta*-topolina (mT), *orto*-topolina (oT), *meta*-metoxitopolina (MemT) y *orto*-metoxitopolina (MeoT).

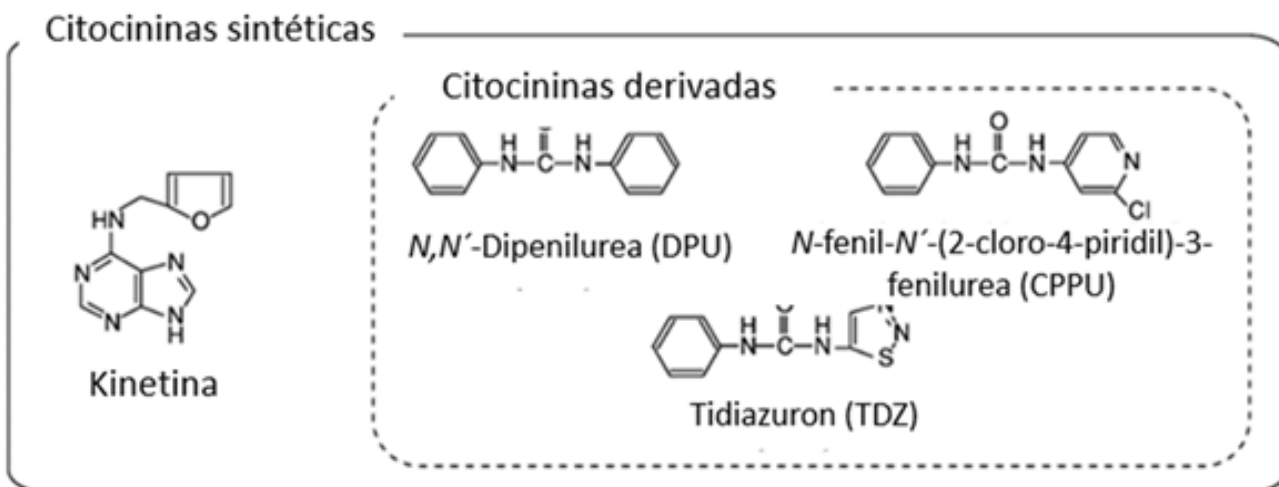


Figura 1.10. Citocininas sintéticas. En este grupo se encuentran la kinetina (KIN) y derivados de tipo fenilurea (*N,N'*-difenilurea (DPU), *N*-fenil-*N'*-(2-cloro-4-piridil)-3-fenilurea (CPPU) y tiazurón (TDZ).

En términos de estructura química y mezclas de compuestos, las citocininas se catalogan

como un grupo de biomoléculas muy complejo. La mayoría de éstas se caracterizan por ser derivados de adenina que llevan una cadena lateral que deriva de un isopreno o una cadena lateral aromática en el extremo N^6 terminal (Kieber and Schaller, 2014; Márquez-López *et al.*, 2019). Por otra parte, la mayoría de las citocininas, al igual que las auxinas se encuentran conjugadas, principalmente como glúcidos, azúcares y fosfatos de azúcar, ya sea en el oxígeno del hidroxilo o en el nitrógeno del anillo de purina. Así mismo, debido a su propia diversidad, estos compuestos tienen la capacidad de interactuar con otros reguladores del crecimiento, como auxinas, giberelinas, ácido abscísico y nitratos (Sakakibara, 2005, 2021).

Las citocininas, al igual que las auxinas, se dividen en dos grupos, las naturales y las sintéticas. Dentro del grupo de las citocininas naturales existe una división particular, por un lado, están las citocininas tipo isoprenoide y en ellas se encuentran la isopentiladenina (iP), la *cis*-zeatina (cZ), la *trans*-zeatina (tZ) y la dihidrozeatina (DZ) (Figura 1.9). Por otra parte, existe el grupo de las citocininas tipo aromático y dentro de este subconjunto está la benciladenina (BA), la *meta*-topolina (mT), la *orto*-topolina (oT), la *meta*-metoxitopolina (MemT) y la *orto*-metoxitopolina (MeoT) (Kieber and Schaller, 2014) (Figura 1.10). En el caso de las citocininas sintéticas se encuentran la kinetina (KIN; 6-furfurilaminopurina) y derivados tipo fenilurea, como la *N,N'*-difenilurea (DPU), el *N*-fenil-*N'*-(2-cloro-4-piridil)-3-fenilurea (CPPU) y el tidiazurón (TDZ) (Kieber and Schaller, 2018; Sakakibara, 2005).

En el caso de las citocininas naturales, su forma más común y activa es la zeatina, la cual se puede encontrar en dos isoformas la *cis*-zeatina (cZ) y la *trans*-zeatina (tZ) y se pueden, bajo ciertas condiciones interconvertir. Por otra parte, las citocininas se encuentran en muy baja cantidad dentro de los tejidos de la planta, lo que dificulta su aislamiento y cuantificación (Kieber and Schaller, 2014). A su vez, la concentración de citocininas en las plantas está controlada por otros reguladores del crecimiento, como las auxinas, las cuales, reducen los niveles de citocininas endógenas y son represores rápidos y eficaces de su biosíntesis. Así mismo, su distribución espacial y su concentración dependen en gran medida de la edad fisiológica de la planta, el tipo de tejido y su interacción con factores abióticos como el estrés o la disponibilidad de nitrato (Márquez-López *et al.*, 2019; Sosnowski *et al.*, 2023).

Las citocininas también funcionan como moléculas mensajeras en la comunicación celular a larga distancia, así mismo intervienen en el crecimiento sistémico utilizando al nitrógeno como señal (Sakakibara, 2021). Las citocininas desempeñan un papel importante en el

transporte y la acumulación de productos de la fotosíntesis que pueden afectar la actividad de otras enzimas. También se ha descubierto que las citocininas regulan la respuesta de las plantas a la luz, los nutrientes, la disponibilidad de agua y los factores estresantes abióticos y bióticos. Lo hacen previniendo la degradación celular, modificando la síntesis de proteínas y mejorando las enzimas protectoras, como los antioxidantes (Small and Degenhardt, 2018).

Desde su descubrimiento en las plantas, las auxinas han sido objeto de estudios específicos de acción referentes a su asimilación, estructura, transporte, biosíntesis, metabolismo, regulación, señalización y degradación lo que la convierte junto con las citocininas en los reguladores del crecimiento vegetal más estudiados (Kieber and Schaller, 2018). En la actualidad, al igual que las auxinas, en el cultivo de tejidos vegetales es poco común el uso de las citocininas naturales, siendo los análogos sintéticos como la BA y la kinetina las principales citocininas empleadas en los estudios de investigación y desarrollo (Sosnowski *et al.*, 2023).

En la actualidad, se ha determinado que las citocininas juegan un papel clave en varios procesos relacionados a este campo, como lo son la inducción de brotes, la promoción de la división celular, la organogénesis, la embriogénesis somática, la micropropagación, el retraso de la senescencia, la formación de callos, el control de la morfogénesis, así como el desarrollo de cultivos comerciales para la agricultura (Kieber and Schaller, 2018; Márquez-López *et al.*, 2019; Sakakibara, 2021).

1.8 Callos como herramienta de estudio para el cultivo de tejidos vegetales

Desde antes del descubrimiento de los reguladores del crecimiento se sabía que las plantas cuentan con la capacidad de regenerarse. Esto tomó importancia al desarrollar las primeras investigaciones sobre cultivo de tejidos vegetales. En el caso de la inducción y regeneración de callos, los primeros estudios se remontan a finales de los años 30 y principios de los 40 del siglo pasado, iniciando así, los cimientos de una rama de la biología que en la actualidad se conoce como biotecnología vegetal (Efferth, 2019; Thorpe, 2012; White, 1939).

A partir de ese momento, los callos pasaron a ser la herramienta principal para varios estudios de regeneración, llegando incluso a participar en el desarrollo de nuevas técnicas y mejorar las técnicas que ya se encontraban disponibles en aquella época (Sugiyama, 2015; Thorpe, 2012). Teniendo en cuenta lo anterior, en la siguiente tabla se muestran algunos estudios referentes a la regeneración de callos en diferentes modelos vegetales,

partiendo desde las primeras aplicaciones de reguladores del crecimiento, hasta los estudios bioquímicos y moleculares que se realizan en la actualidad.

Tabla 1.1. Protocolos de inducción y regeneración de callos aplicados a diferentes especies vegetales.

Especie	Medio de cultivo	Contenido de auxinas/citocininas	Observaciones	Referencia
<i>D. carota</i>	White modificado	10 mg/L de AIA	El crecimiento de los callos enriquecido con AIA se mantuvo indefinidamente. Disminuía el vigor. Formación de raíces después de 4 semanas.	(Wiggans, 1954)
<i>P. hortorum</i>	White modificado	2.3×10^{-5} M de AIA	Crecimiento de callos de manera exponencial después de la segunda semana de cultivo. Disminución del contenido de auxinas.	(Troxler and Hamilton, 1965)
<i>P. vulgaris</i>	Heller modificado	Tratamientos con 0.05, 0.10, 0.25, 0.50 y 1.0 mg de AIA	Se generó una diferenciación de las células en relación con las concentraciones de AIA.	(Jeffer and Northcote, 1966)
<i>N. tabacum</i>	LS (tejido normal), MS (mutantes)	Tratamientos con 0, 1, 25, 100, 1,000 y 10,000 μ g de kinetina	Se observó un crecimiento y proliferación óptima de los callos en el tratamiento de 1,000 μ g de kinetina.	(Linsmaier-Bednar and Skoog, 1966)
<i>O. sativa</i>	MS	Tratamientos con 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1 mg de kinetina y 0, 0.1, 1, 5 y 10 mg de 2,4-D	Las concentraciones altas de 2,4-D, combinadas con concentraciones bajas de kinetina produjeron callos.	(Yamada <i>et al.</i> , 1967b)
<i>C. arabica</i>	LS	0.1 mg/L de kinetina y 0.1 mg/L de 2,4-D	Formación de callos después de 60 días.	(Herman and Haas, 1975)

A. cepa	DBS	Diferentes concentraciones de ANA, 2,4-D, picloram y BA	El uso del análogo sintético mostró mejores resultados al momento de la inducción de callos y formación de raíces.	(Phillips and Luteyn, 1983)
H. annuus	MS	Concentraciones de 0.1, 1, 3 y 5 mg/L de BA y de 1, 2 y 5 mg/L de 2,4-D	En segmentos de hipocótilos se observó una formación de callos del 100% utilizando una concentración de 0.1 mg/L de BA y 2 mg/L de 2,4-D.	(Greco <i>et al.</i> , 1984)
S. bicolor	MS	Tratamientos con 0.05, 0.1 y 0.5 mg/L de kinetina, 3 y 5 mg/L de 2,4-D y 5 mg/L de ANA	Crecimiento de callos con pigmentación amarilla después de 12 días de inducción.	(Cai <i>et al.</i> , 1987)
G. x grandiflorus	MS y MS modificado con hidrolizado de caseína	4.5 y 9 mM de 2,4-D, 26.8 mM de ANA y 29 mM de picloram	El tratamiento en MS modificado adicionado con 9 mM de 2,4-D generó más cantidad de callos y más friabilidad.	(Remotti and Löffler, 1995)
M. x ogiformis	MS	4.5, 13.6, 22.6 y 31.7 μ M de 2,4-D	De los diferentes explantes evaluados, los ápices de los brotes fueron los que produjeron callos embriogénicos.	(Holme and Petersen, 1996)
Z. mays	N6	Concentraciones de 15 y 30 μ M de dicamba	Se determinó que el dicamba en concentraciones de 30 μ M generaba más producción de callos de tipo II.	(Carvalho <i>et al.</i> , 1997)
W. somnifera	MS	Concentraciones de 1, 2, 3, y 4 mg/L de 2,4-D y 0.2, 0.5 y 1 mg/L de kinetina	La regeneración de callos se mostró mejor en raíces y hojas cultivadas bajo concentraciones de 2 mg/L de 2,4-D y 0,2 mg/L de kinetina.	(Rani <i>et al.</i> , 2003)

<i>D. ammoniacum</i>	MS	0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L de 2,4-D y ANA. 1 y 2 mg/L de kinetina y BA	La mejor respuesta se observó en los segmentos de raíz en medio MS que contenía 1 mg/L de ANA y 2 mg/L de BA regenerando el 100% de los callos.	(Irvani <i>et al.</i> , 2010)
<i>S. tuberosum</i>	MS	Tratamientos con 0, 2, 3, 4 y 5 mg/L de ANA	Se observó un desarrollo de callo en un 100% en los tratamientos de 3 y 4 mg/L de ANA.	(Kawochar <i>et al.</i> , 2017)
<i>O. sativa</i>	MS, N6 y LS	Tratamientos con 1, 2, 3 y 4 mg/L de 2,4-D y 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 mg/L de ANA	Se encontró que las cuatro variedades estudiadas exhibieron una alta frecuencia de inducción de callos en medio MS suplementado con 3 mg/L de 2,4-D.	(Binte-Mostafiz and Wagiran, 2018)
<i>A. koreana</i>	MS, DCR y LP	Concentraciones de 0, 0.5, 1, y 2 de 2,4-D, ANA, TDZ, Kinetina y BA	La inducción y proliferación de callos se observó de manera más eficiente en el medio MS y con una alta concentración de 2,4-D.	(Guo and Jeong, 2021)

El estudio de los callos fue evolucionando con el pasar de los años, esto gracias a la invención de nuevas tecnologías que permitieron con más facilidad la obtención de datos referentes a su estructura, composición molecular y métodos de formación (Ikeuchi *et al.*, 2013; Sugiyama, 2015).

Las primeras investigaciones determinaron que los callos pueden regenerarse de manera artificial en el sistema *in vitro* (White, 1939). Dentro de estos estudios, se descubrió que los reguladores del crecimiento vegetal, específicamente las auxinas y las citocininas son cruciales al momento de entrar al estadio de diferenciación y desdiferenciación de las células. Aunado a lo anterior, varias investigaciones se desarrollaron con base en los métodos de inducción y desarrollo de tejido calloso en cultivos como *Daucus carota* (Steward *et al.*, 1958; Wiggans, 1954), *Pelargonium hortorum* (Troxler and Hamilton, 1965), *Phaseolus vulgaris* (Jefferies and Northcote, 1966), *Oryza sativa* (Yamada *et al.*, 1967a), *Nicotiana tabacum* (Linsmaier-Bednar and Skoog, 1966), y *Zea mays* (Carvalho *et al.*, 1997)

entre otras.

Posteriormente, la inducción de callos utilizando como modelos los cultivos agrícolas se convirtió en objeto de estudio más frecuente, lo anterior con la finalidad de obtener sistemas de regeneración de plantas con mayor rendimiento respecto el número de plantas, la resistencia al estrés y a las enfermedades, así como a la cantidad y calidad de los frutos (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018). Varias investigaciones centradas en modelos como *D. carota*, *Z. mays*, *O. sativa*, *P. vulgaris*, *C. arabica*, y *S. lycopersicum* entre otras determinaron que el proceso de inducción y desarrollo de callos para el sistema completo de regeneración de plantas es más viable comparado con otros sistemas desarrollados como parte del CTV (Thorpe, 2012).

Aunado a lo anterior, los resultados obtenidos en varias investigaciones determinaron los componentes de los medios de cultivo específicos para muchas especies vegetales con la capacidad de desarrollo de tejido calloso. Así mismo, se probaron y descubrieron diferentes tipos de reguladores del crecimiento, principalmente derivados de las auxinas y citocininas, que también cuentan con una inferencia importante en el proceso de formación de callos (Sugiyama, 2015). Dentro de los compuestos probados con inferencia positiva en la inducción y desarrollo de callos se encontraron algunas auxinas, de las cuales destacan el 2,4-D (Yamada *et al.*, 1967b), el AIA (Wiggans, 1954), el picloram (Phillips and Luteyn, 1983) y el ANA (Kawochar *et al.*, 2017). Mientras que, en el caso de las citocininas, el descubrimiento de la kinetina y el uso de la benciladenina también promovió efectos benéficos al momento de generar tejido calloso. Otros compuestos probados en los medios fueron la tiamina (Linsmaier-Bednar and Skoog, 1966), la leche de coco (Jeffer and Northcote, 1966), el hidrolizado de caseína (Yamada *et al.*, 1967a), y el extracto de levadura (Gibbs and Dougall, 1965), entre otros.

Posteriormente, se realizaron estudios basados en los mecanismos moleculares para la formación de los callos. Dentro de ellos se determinó que las células tienen una estructura similar a los primordios de las raíces laterales, además de contar con un perfil de expresión génica parecidos a los de los meristemos de la raíz (Efferth, 2019). Así mismo, estudios transcriptómicos determinaron que la pluripotencialidad de los callos se debe al contenido de la relación existente entre las auxinas y las citocininas en una capa específica al momento de su desarrollo (Zhai and Xu, 2021).

Gracias a los análisis genéticos y moleculares se ha podido identificar que la formación de

callos está basada en complejos mecanismos reguladores. De la misma manera, la mayoría de los procesos referentes a la inducción de callos que se describen en la literatura utilizan mecanismos transcripcionales o postranscripcionales, lo que genera modificaciones generales en la expresión génica, así como en la traducción de proteínas (Ikeuchi *et al.*, 2013; Zhai and Xu, 2021). En la actualidad, los callos se utilizan como una herramienta para estudios bioquímicos, genéticos y moleculares, así como para generar suspensiones celulares, cultivo de protoplastos, organogénesis, embriones somáticos y metabolitos secundarios. Lo anterior como parte de estrategias basadas en el CTV que tienen como objetivo la mejora de la agricultura (Bidabadi and Jain, 2020; Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018).

1.9 Callos y *C. arabica*

Debido a su importancia social y económica, el estudio de *C. arabica* tomó relevancia en la década de los 70s del siglo pasado, al mismo tiempo que el comienzo de los trabajos de propagación clonal basados en diferentes tecnologías, como la invención de nuevos medios de cultivo (Herman and Haas, 1975; Staritsky, 1970).

Los primeros reportes de inducción y formación de callos en *C. arabica* fueron con la finalidad de generar protocolos para la regeneración completa de plantas, así como el desarrollo y mantenimiento de los cultivares (Söndahl and Sharp, 1977). Aunado a lo anterior, en los años posteriores se desarrollaron varios protocolos relacionados al estudio de callos, aplicándolos además al estudio de otras ramas del cultivo de tejidos como organogénesis, embriogénesis somática, biología molecular, bioquímica, genética entre otras. Particularmente, los callos de *C. arabica* se utilizan como un sistema intermedio de procesos como la organogénesis y la embriogénesis somática (Aguilar *et al.*, 2018; Silva de Almeida, 2020).

Tabla 1.2 | Protocolos de inducción y regeneración de callos de *C. arabica*

Especie	Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento	Observaciones	Referencia
C. arabica	Heller & LS	N/A	No hubo formación de callos en <i>C. arabica</i> , pero si en <i>C. canephora</i> .	(Staritsky, 1970)
	LS	0.1 mg/L de 2,4-D y kinetina	Se produjo un crecimiento lento del callo. Se formaron numerosos organoides en la periferia del callo después de 60 días de incubación.	(Herman and Haas, 1975)
	MS	9.2 µM de kinetina y 4.5 µM de 2,4-D	El inicio de la proliferación ocurrió en el área periférica de los explantes, especialmente en la proximidad de las secciones transversales venosas.	(Söndahl and Sharp, 1977)
	MS	20 µM de kinetina y 5 µM de 2,4-D	Formación de callos lenta. Aproximadamente 50 días	(Söndahl <i>et al.</i> , 1985)
	MS	5 µM de BA	Se observó formación de embriones junto a los callos ocho semanas después de la inducción.	(Yasuda <i>et al.</i> , 1985)
	MS y B5	3 mg/L de BA	Después de tres meses, en el 5% de los explantes de hojas, se formó un grupo de células embriogénicas que cubrieron gran parte de la superficie del callo.	(Acuña and de Pena, 1991)
	MS	0.5mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de IBA	Los genotipos de <i>C. arabica</i> respondieron menos respecto a la formación de callos.	(Van Boxtel and Berthouly, 1996)
	MS	4.5 µM 2,4-D, 9.2 µM kinetina	Evaluación de dos diferentes concentraciones de AS en	(Quiroz-Figueroa <i>et</i>

		suspensiones celulares derivadas de callo	<i>al.</i> , 2001)
MS	4.5 mM de 2,4-D y 17.7 mM de BA	Estudio para generación de suspensiones y búsqueda de marcadores moleculares	(Landey <i>et al.</i> , 2013)
MS	Diferentes combinaciones de auxinas (0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg/l y 1 mg/l de IAA, ANA, IBA y 2, 4D) y citocininas (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, y 5 mg/l) empleando Kinetina y BA	Protocolo para determinar la mejor combinación de reguladores del crecimiento que genere una mejor formación de callos.	(Aga and Khillare, 2017)
MS	20 µM de 2.4-D, 9.84 µM de 2-iP y 4.92 µM AIB	Los callos formados se utilizaron para análisis histológicos durante los pasos posteriores (embriogénesis somática).	(Bartos <i>et al.</i> , 2018)
MS	Medio 1 contiene 0.5 mg/L de 2,4-D 1.0 mg/L BA. Medio 2 contiene 1.0 mg/L de 2,4-D and 1.0 mg/L de BA	Protocolo para determinar a los mejores componentes de los medios utilizados para inducir callos y embriogénesis somática.	(Avila-Victor <i>et al.</i> , 2023)

Hoy en día, los estudios de formación de callos de *C. arabica* ayudan a responder diversas preguntas biológicas correspondientes al comportamiento y funcionamiento de la especie, tanto en la naturaleza, como bajo condiciones controladas. Además, lo anterior tiene una implicancia importante en la industria del café, por lo que también las investigaciones se encuentran avanzando a métodos más eficientes y comprensivos, los cuales aprovechan la combinación de técnicas de biotecnología vegetal, tanto tradicionales como modernas (Aguilar *et al.*, 2018; Avila-Victor *et al.*, 2023; Méndez-Hernández *et al.*, 2023).

1.10 Una breve nota sobre el cultivo de tejidos en *Daucus carota*

D. carota fue una de las dos primeras especies en ser estudiadas a partir del CTV en los años 30s del siglo pasado, siendo desde el primer momento un cultivo de fácil manejo y una rápida respuesta de crecimiento y desarrollo de diferentes tejidos y órganos (Caplin and Steward, 1948; Gautheret, 1939). Desde entonces, las investigaciones se ramificaron en diferentes vertientes que van desde los estudios morfológicos y fisiológicos, hasta los bioquímicos y moleculares, entre otros (Halperin, 1964; Iorizzo *et al.*, 2016; Kamada and Harada, 1979; Wiggans, 1954; Zhou *et al.*, 1996).

En el caso del estudio de los callos de zanahoria, los primeros reportes de su inducción y formación mostraron que los compuestos presentes en los medios de cultivo eran muy importantes para obtener una respuesta por parte del tejido, así como las diferentes secciones de la planta que se utilizaran para la inducción (Newcomb and Wetherell, 1970; Reinert *et al.*, 1967; Stehse and Caplin, 1969). Posteriormente, los callos de zanahoria se utilizaron como herramienta para generar protocolos para el estudio de diferentes disciplinas relacionadas con el CTV como la morfogénesis, la organogénesis y la embriogénesis somática (Halperin, 1964; Nag and Street, 1973; Tazawa and Reinert, 1969). Al mismo tiempo, el estudio de las condiciones controladas en las que se cultivan los callos de zanahoria, así como de las concentraciones y tipos de reguladores del crecimiento en los medios de cultivo mostraron su efecto al producir mejores respuesta (Bayliss, 1977; De Vries *et al.*, 1988; Newcomb and Wetherell, 1970; Tianran and Neumann, 1985).

El éxito de estos estudios proporcionó el conocimiento necesario para la posterior propagación a gran escala, así como el estudio de diversos aspectos que involucraban a las proteínas y la expresión de genes en callos, suspensiones celulares y embriones somáticos (Steward *et al.*, 1975; Sung and Okimoto, 1981). Se determinó además que diferentes compuestos como las poliaminas, la arginina y diferentes compuestos influyen directamente en la formación y desarrollo de estos tejidos (Bradley *et al.*, 1984; Feirer *et al.*, 1984; Suzich *et al.*, 1985).

Otro de los estudios que tomaron relevancia basados en el uso de callos y suspensiones celulares fueron los relacionados con los ácidos nucleicos ADN y ARN. En este caso, las investigaciones determinaron que la manipulación de los componentes del medio de cultivo, combinada con las condiciones de incubación, afectaban el desarrollo de los callos y las suspensiones celulares de zanahoria a nivel molecular (Manna *et al.*, 1995; Palmgren *et al.*,

1991; Seitz, 1980).

Recientemente, los callos y suspensiones celulares de *D. carota* se están utilizando para el estudio de genes y transcritos específicos derivados de los cambios que provocan los factores bióticos y abióticos en los cultivos. Además, con el desarrollo de las herramientas bioinformáticas, la identificación de factores de transcripción proporciona información importante de la especie para estudios bioquímicos y moleculares. Así mismo, la identificación de estos genes proporciona un mapa que sirve como modelo para el estudio de otras especies (Iorizzo *et al.*, 2016; Kielkowska *et al.*, 2014; Klimek-Chodacka *et al.*, 2018; Shibukawa *et al.*, 2009).

En la actualidad, *D. carota* es una de las principales especies modelo en el campo del CTV. Debido a lo anterior, diversos estudios de esta especie se han introducido en las ciencias ómicas, lo que proporciona nuevas perspectivas y nuevos resultados complementando los ya obtenidos con los estudios bioquímicos y moleculares (Iorizzo *et al.*, 2016; Klimek-Chodacka *et al.*, 2019).

Tabla 1.3. Recopilación de medios y de reguladores del crecimiento empleados para la obtención de callos, suspensiones celulares y embriones somáticos de zanahoria.

Especie	Medio de cultivo	Reguladores del crecimiento	Observaciones	Referencia
D. carota	White Modificado	0.04 mg L ⁻¹ de AIA	El crecimiento de los callos fue constante, además de presentar raíces cortas en un periodo de 8-10 semanas	(Wiggans, 1954)
	MS	0.2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	Después de 1 año se observó el crecimiento de callos y la formación de embriones somáticos.	(Jones, 1974)
	MS	0.1, 1, 2, 5, 10, y 15 µM de 2,4-D	Se observó un patrón de crecimiento celular lineal de las suspensiones celulares en 10 días	(Bayliss, 1977)
	MS	1 mg L ⁻¹ de 2,4-D	Aumentó el peso fresco, además de incrementarse los niveles de ácido glutámico y de glutamina durante la formación de los embriones	(Kamada and Harada, 1984)
	B ₅	2.3 µM de 2,4-D y 1.1 µM de BA	Hubo un aumento en la división celular en los primeros 10 días, además de la formación de embriones somáticos	(Mengoli <i>et al.</i> , 1989)
	MS	0.5 µM de 2,4-D	La inducción de los callos a partir de hipocótilos se utilizó para la producción de embriones somáticos	(Chung <i>et al.</i> , 1992)
	B ₅	2.3 µM de 2,4-D	Las suspensiones celulares inducidas a partir de hipocótilos se desarrollaron en 10 días, mientras que los PEM's se desarrollaron 20 días después.	(Guzzo <i>et al.</i> , 1994)
	B ₅	0.2 mg L ⁻¹ de 2,4-D	Se observó una diferencia entre las suspensiones generadas en biorreactores con respecto a matraces. Además de utilizar diferentes concentraciones de NH ₄ ⁺	(Archambault <i>et al.</i> , 1995)
	MS modificado	2.26 µM de 2,4-D	La concentración de boro afectó de manera significativa el desarrollo de las suspensiones celulares (medio B ₅).	(Mashayekhi and Neumann, 2006)

MS modificado	0.1 de KIN, 0.3 mg L ⁻¹ de ANA (medio 1). 1 mg L ⁻¹ de 2,4-D (medio 2)	La mejor combinación respecto a la eficacia de inducción y las propiedades antioxidantes medidas se encontró en el callo del cultivar 'Flacoro'	(Keutgen <i>et al.</i> , 2022)
------------------	--	--	--------------------------------

1.11 Justificación

C. arabica es una de las especies de café más cultivadas del mundo, siendo conocida por su alta calidad y por contener un sabor superior. En ese sentido, la propagación clonal y la mejora genética de este cultivo son fundamentales para asegurar su productividad, calidad y resistencia a las enfermedades. Por otra parte, una de las herramientas principales que han contribuido al desarrollo de diferentes estudios de *C. arabica* son los callos. Así mismo, los callos cuentan con una inferencia importante en los sistemas de regeneración de plantas como lo son la organogénesis y en la embriogénesis somática.

Aunado a lo anterior, se han develado diferentes componentes que participan en la maquinaria molecular que comprende la formación de los callos, entre los que destacan los reguladores de crecimiento, específicamente las auxinas y citocininas. Dado que estas biomoléculas juegan un papel clave en el crecimiento y desarrollo de plantas, un estudio profundo de la relación auxinas-citocininas durante el crecimiento de callos podría ser clave descifrar como se provoca el cambio específico en la dediferenciación celular. Por lo que la finalidad es determinar cuál relación existe entre el contenido de auxinas y citocininas durante un ciclo de crecimiento de *C. arabica*.

Por otro lado, *D. carota* ha sido un modelo excepcional en el campo del cultivo de tejidos. En nuestro laboratorio vamos a emplear a *D. carota*, junto con *Coffea spp.* para el estudio de la cadena de señalización que convierte a una célula somática en un embrión que produce una planta sana y vigorosa. Para ello es necesario establecer un cultivo de callos y suspensiones celulares estable que permita la obtención de embriones somáticos con regularidad.

1.12. Objetivos

1.12.1. Objetivo general

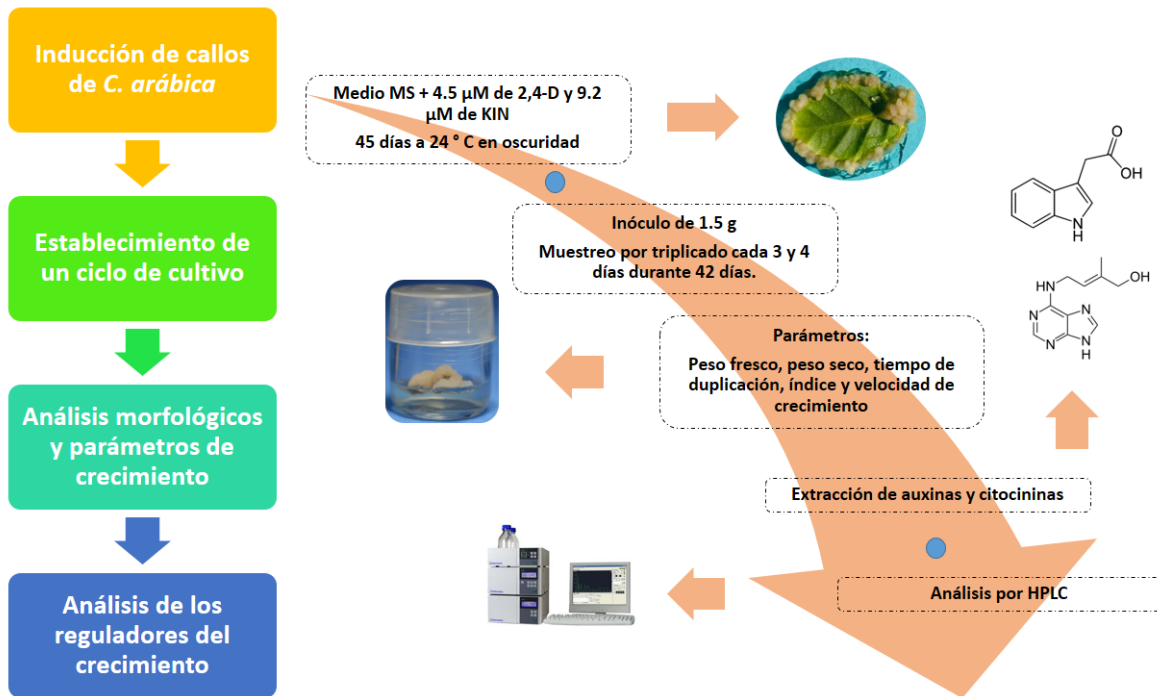
Establecer callos de *C. arabica* y *D. carota* que sirvan como una fuente estable, confiable y

reproducibile para la obtención de embriones somáticos.

1.12.2. Objetivos específicos

- Inducir callos a partir de explantes de hoja de *C. arabica*.
- Determinar el crecimiento de los callos a partir de un ciclo de cultivo de *C. arabica*.
- Cuantificar el contenido de auxinas y citocininas dentro del ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*.
- Inducir callos y suspensiones celulares a partir de tubérculos de zanahoria.
- Determinar el crecimiento de los callos y suspensiones celulares a partir de un ciclo de cultivo de *D. carota*.

1.12 Estrategia experimental



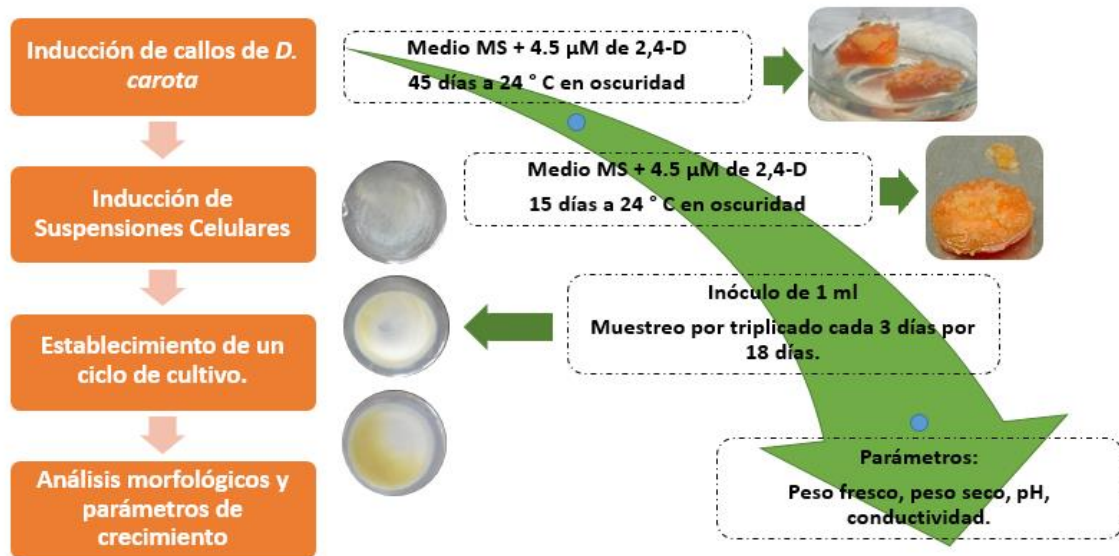


Figura 1.11. Diagrama general de la estrategia experimental

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

2.1. Introducción

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica crucial en la biotecnología vegetal que permite la propagación, mejora genética y conservación de plantas mediante el uso de pequeños fragmentos de tejido vegetal en condiciones controladas. Una de las etapas fundamentales en este proceso es la formación de callos, que son masas de células indiferenciadas generadas en respuesta a heridas o condiciones específicas de cultivo. Los callos sirven como una base celular versátil que puede ser inducida a diferenciarse en diversos órganos vegetales.

Por otra parte, para promover diferentes respuestas al cultivo *in vitro*, desde hace varios años se sabe que esto es el resultado de la manipulación de los componentes del medio de cultivo, específicamente de los reguladores del crecimiento. Así mismo, los reguladores del crecimiento se caracterizan por generar una respuesta específica entre células, tejidos y/u órganos en las especies vegetales lo que provoca una serie de cambios morfo-fisiológicos.

Al mismo tiempo, los reguladores del crecimiento más estudiados y utilizados para las investigaciones biológicas son las auxinas y las citocininas, siendo estas las principales biomoléculas que generan un vínculo directo con diferentes procesos moleculares por los cuales se puede desarrollar una planta. Las auxinas, como el 2,4-D y el ácido naftalenoacético (NAA), promueven la división celular y la formación inicial de callos, actuando como señales clave para la proliferación de células indiferenciadas. Por otro lado, las citocininas, como la kinetina y la benciladenina (BA), son esenciales para la diferenciación y desarrollo de los callos, promoviendo la formación de brotes y la organogénesis.

El descubrimiento de los mecanismos de acción de las auxinas y citocininas, tanto en la naturaleza como en condiciones controladas han generado diversas investigaciones referentes a su participación en la gran mayoría de los procesos con los que cuenta una célula. Por su parte, el estudio de callos vegetales basado en la relación auxinas-citocininas ha sido de gran ayuda para establecer protocolos de inducción y regeneración de plantas.

En la actualidad, el equilibrio entre auxinas y citocininas en los medios de cultivo determina el destino del callo, permitiendo la regeneración de plantas completas a partir de células indiferenciadas. Este equilibrio hormonal es la base para la manipulación eficiente del cultivo de tejidos vegetales, facilitando avances significativos en la agricultura, horticultura y conservación de especies vegetales.

2.2. Material vegetal

2.2.1. *Coffea arabica*

El modelo de estudio fueron plantas de *C. arabica* cultivadas *in vitro* las cuales se cultivan en medio de mantenimiento, sin reguladores de crecimiento. El medio está compuesto por sales basales de medio MS (Murashige and Skoog, 1962) (ver anexos) (PhytoTech Labs, M524), complementado con 29.6 μM de tiamina-HCl (Sigma, T3902), 555 μM de mio-inositol (Sigma, I5125), 0.15 μM de cisteína (Sigma C121800), 16.24 μM de ácido nicotínico (Sigma N-4126), 9.72 μM de piridoxina (Sigma P-9755), 87.64 mM de sacarosa (Sigma, S539), 0.28 % (p/v) de gellan gum powder (PhytoTech Labs, G434) y pH ajustado a 5.8. Posteriormente, el medio fue esterilizado a 121 °C por 15 minutos. Las plántulas fueron incubadas a 25 ± 2 °C en condiciones de fotoperiodo ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) con 16 h luz/8 h oscuridad.

2.2.2. *Daucus carota*

El material de zanahoria para la inducción de los callos fueron tubérculos de la planta comprados comercialmente.

2.3. Metodología para obtención y evaluación de callos

2.3.1. Inducción de callos de *C. arabica*

El explante seleccionado para la inducción de los callos fueron el tercer y cuarto par de hojas de la plántula, las cuales se cortaron de los bordes (generación de herida), puestas en posición adaxial y colocadas en frascos Gerber, los cuales contenían 25 mL de medio de inducción de callo (S1). El medio de inducción de callos consistió con sales MS (Murashige and Skoog, 1962) (Phyto Technology Laboratories, M524), suplementado con 29.6 μM de tiamina-HCl (Sigma, T3902), 550 μM de mio-inositol (Sigma, I5125), 210 μM de cisteína (Sigma, C8277), 4.5 μM de 2,4-D, 9.2 μM de KIN, 87.7 μM de sacarosa (Sigma, S539) y 0.285% (p/v) Gellan gum (PhytoTechnology Laboratories, G434) ajustado a pH 5.8 (Tabla 2.1). Los frascos se mantuvieron en condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C durante

45 días.

Al pasar los 45 días, el callo obtenido se resembró en un medio de mantenimiento de callos (MMC), el cual se encuentra a la mitad de fuerza iónica de las sales MS.



Figura 2.1 Inducción de callos de *C. arabica*. Izquierda. Plántulas cultivadas y mantenidas *in vitro*. Derecha. Hoja colocada en medio MIC.

Así mismo, las mismas especificaciones de vitaminas y reguladores del crecimiento mencionadas anteriormente fueron mantenidas. Lo anterior bajo las mismas condiciones de temperatura, así como de oscuridad por un periodo de 30 días adicionales.

2.3.2. Establecimiento de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*

Una vez obtenida suficiente cantidad de tejido calloso, se inició un ciclo de cultivo, en el cual se inocularon 1.5 g de biomasa en el medio MMC. Los muestreos del ciclo se realizaron por triplicado en los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38 y 42 respectivamente.

2.3.3. Establecimiento de los callos de *Daucus carota*

Para la obtención de los callos de zanahoria se eligieron tubérculos sin daños y se lavaron con agua destilada. Se eliminaron un cm de la parte superior y dos cm de la parte inferior, desechándose ambos cortes. A partir de ese momento, las siguientes manipulaciones se llevaron a cabo al interior de una campana de flujo laminar. Los fragmentos de alrededor de 7 cm se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 2% (v/v) por 25 minutos. A continuación, el material vegetal fue transferido a un vaso de precipitados que contenía 200 mL de agua destilada estéril y se lavaron 3 veces por 10 minutos para eliminar los residuos del hipoclorito. Inmediatamente después cada segmento del tubérculo se transfirió

a una caja de Petri con papel filtro y se eliminó un segmento de un cm de espesor de ambos extremos con un bisturí. A continuación, se cortaron transversalmente rodajas de 1 mm de grosor. Se transfirieron entre 2 y 3 explantes a frascos Gerber que contenía 25 mL de medio MS suplementado con sacarosa 3%, gelrite 0.8% (p/v), 2,4-D 4.54 μM y el pH ajustado a 5.8. Una vez que los frascos fueron tapados y sellados se llevaron al cuarto de cultivo y se incubaron a 25 °C en la oscuridad. La formación de los callos se monitoreó cada siete días, hasta los 28 días. A las cuatro semanas se seleccionaron los mejores callos y se transfirieron a medio fresco para obtener el material biológico necesario para los experimentos.

Tabla 2.1 | Componentes del medio de cultivo para la inducción de callos de *C. arabica*.

<i>Componente</i>	<i>mM</i>	<i>g/L</i>
Sales MS	---	4.33 g
Tiamina-HCl	29.6 μM	10 mg
Mio-inositol	550 μM	100 mg
L-cisteina	210 μM	25 mg
2,4-D	4.5 μM	1 mg
Kinetina	9.2 μM	2 mg
Sacarosa	87.7 μM	30 g
Gel-Rite	---	2.8 g

2.3.4. Inducción de las suspensiones celulares

Para la generación de las líneas de suspensiones celulares se usaron callos de 4 semanas de edad. Aproximadamente un g de callo se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 50 mL de medio MS, suplementado con sacarosa 3% y 2,4-D 4.54 μM . Los matraces así inoculados se colocaron en un orbitador (New Brunswick Scientific, modelo G-53), con una agitación a 100 rpm en la oscuridad y a una temperatura de 25 °C. Las suspensiones celulares fueron propagadas cada 15 días por un periodo de 3 meses. Para estimular el correcto crecimiento celular, las suspensiones celulares se filtraron a través de una malla metálica en cada subcultivo. Esto permitió eliminar los grumos grandes del cultivo

y el establecimiento de suspensiones celulares de buena calidad.

Tabla 2.2 | Componentes del medio de cultivo para la inducción suspensiones celulares de *D. carota*

<i>Componente</i>	<i>mM</i>	<i>g/L</i>
Sales MS	----	4.33 g
Tiamina-HCL	29.6 μ M	10 mg
Mio-inositol	550 μ M	100 mg
L-cisteina	210 μ M	25 mg
Acido nicotínico	123.1 μ M	1 mg
2,4-D	4.5 μ M	1 mg
Sacarosa	87.7 μ M	30 g

2.3.5. Determinación del crecimiento de las suspensiones celulares

Para caracterizar una línea celular de suspensiones celulares, en primera instancia el contenido de varios matraces se juntó y las células se tamizaron para obtener un tamaño homogéneo de los racimos de células que conforman la suspensión celular. Se decantó el medio de cultivo de este stock de suspensiones celulares. El stock se resuspendió en el mismo medio en el que se van a cultivar las células. Del stock filtrado y resuspendido se tomó un mL de células y se inoculó en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 49 mL de medio MS suplementado con sacarosa 3% y 2,4-D 4.5 μ M. Los muestreos se realizaron por triplicado cada tres días hasta el día 18.

Cada muestra se filtró y se determinaron diferentes parámetros de crecimiento,

- **Peso fresco.** Las suspensiones celulares se filtraron con la ayuda de un embudo Büchner, una vez que las células fueron colectadas en el papel filtro, se pesaron en una balanza analítica (Scientech, modelo SL 400). Una vez pesadas, las células se envolvieron en papel aluminio y se guardaron a -80 °C.
- **Peso seco.** Las células utilizadas para la determinación del peso fresco y congeladas, se liofilizaron para eliminar el agua del tejido y se pesaron en una balanza analítica (Scientech, modelo SL 400).

- **Conductividad.** Con la ayuda de un conductímetro se determinó la conductividad del medio de cultivo. Este parámetro servirá para medir el crecimiento en función del uso de los nutrientes del medio de cultivo.

Sumado a los tres parámetros mencionados en los párrafos anteriores, también se midió el pH del medio de cultivo para cada una de las muestras en las que se determinó el crecimiento de las células.

2.3.6. Parámetros de evaluación del ciclo de cultivo

En el caso de los callos de *C. arabica* se determinó el crecimiento de los callos a lo largo de un ciclo de cultivo de 42 días. Para ello se midió el cambio en el peso fresco que se generó de la biomasa acumulada en los días de muestreo mencionados en el inciso 2.3.3. Una vez obtenido el peso fresco de todos los días de muestreo correspondientes, el material fue liofilizado con la finalidad de obtener el peso seco total de la biomasa generada en cada punto de muestreo.

Una vez obtenido los parámetros de peso fresco y peso seco, se procedió a obtener los siguientes parámetros:

- **Velocidad de crecimiento:** Para calcular la velocidad de crecimiento se utilizó la siguiente fórmula:

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_o}{t_f - t_o}$$

En la que μ = velocidad de crecimiento, X_f = peso final, X_o = peso inicial, t_f = tiempo final y t_o = tiempo inicial.

- **Tiempo de duplicación:** Para calcular el tiempo de duplicación del cultivo se utilizó la siguiente fórmula:

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En la que Td = tiempo de duplicación y μ = velocidad de crecimiento.

- **Índice de crecimiento:** Para calcular el índice de crecimiento se utilizó la siguiente fórmula:

$$I = \frac{X_f - X_0}{X_0}$$

En la que I = índice de crecimiento, X_f = peso final, X_0 = peso inicial.

Además de los parámetros ya mencionados, los callos también fueron evaluados a partir de características morfológicas como su coloración, friabilidad y compactación.

2.4 Análisis de los reguladores del crecimiento

2.4.1 Extracción de auxinas y citocininas

Para la extracción de auxinas y citocininas, las muestras del tejido calloso previamente liofilizadas fueron trituradas en un mortero y se recolectaron 50 mg del peso seco obtenido de cada día del ciclo de cultivo, es decir, los días 0, 3, 7, 10, 14, 17, 21, 24, 28, 31, 35, 38 y 42 respectivamente. El tejido fue colocado en tubos Eppendorf de 2 mL y almacenado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso. Posteriormente, a las muestras contenidas en el tubo se les adicionó 0.5 mL de solvente de extracción más 100 μL de HTB (ver anexos) (disuelto en acetato de etilo). Una vez añadido el solvente de extracción se procedió a agitar los tubos mediante un vortex durante un minuto. Luego, las muestras fueron centrifugadas a $20,000 \times g$ a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 20 minutos y el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 2 mL. A continuación, se extrajo nuevamente la pastilla con 0.5 mL de amortiguador de extracción, nuevamente se agitaron en el vortex por 1 minuto, dejándose reposar por 30 min y se volvieron a centrifugar con las mismas especificaciones mencionadas anteriormente. Finalmente, se mezclaron los 2 sobrenadantes y se utilizó un SpeedVac a 10 mBar, a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ para la evaporación de la muestra hasta $\frac{1}{4}$ de su volumen inicial (menos de 0.25 mL).

2.4.2 Purificación de auxinas y citocininas

Para el caso de la purificación de los extractos, las columnas se equilibraron con 1 mL de metanol, seguida de 1 mL de solvente de carga SPE (Anexos, Tabla 3). Posteriormente, las muestras se diluyeron parcialmente con 0.5 mL de solvente de carga SPE y se aplicó a la columna, se eliminó el eluato. A continuación, se lavó la columna con 0.5 mL de solvente

de carga SPE, seguido de 1 mL de agua HPLC. Nuevamente se eliminó el eluato. Una vez realizado lo anterior, se aplicaron 0.5 mL de solvente de elución 1 (solvente de elución SPE 1) (Ver anexos), se recuperó el eluato en un tubo Eppendorf de 2 mL (fracción A; auxinas). Se repitió la acción anterior y posteriormente se mezclaron las dos eluciones generadas en los pasos previos (fracción A). Luego, se aplicaron 0.5 mL de solvente de elución 2 (solvente de elución SPE 2) (Anexos, Tabla 4) y se recuperó el eluato en un tubo nuevo de 2 mL fracción B (citocininas). Se repitieron los pasos anteriores y se mezclaron los eluatos como se menciona (fracción B). Finalmente, las fracciones colectadas se evaporaron en un SpeedVac a 10 mBar y a 40 °C hasta sequedad y se almacenarán a -20 °C.

2.4.3 Cuantificación de auxinas y citocininas por HPLC

Las muestras almacenadas a -20 °C fueron resuspendidas en el sistema de elución de auxinas (fracción A) y citocininas (fracción B), respectivamente. Se filtraron a través de un filtro de 0.2 µm y se colocaron en un vial para HPLC.

Para las lecturas de las muestras se utilizó un cromatógrafo de líquidos marca Agilent modelo 1200, con los siguientes módulos: bomba cuaternaria, automuestreador, termostato para columnas, detectores de arreglo de diodos y de fluorescencia. Se empleó una columna Kromasil C₁₈ de 5 µ 100 A, fase reversa (250 x 4.6 mm), marca Phenomenex.

Condiciones cromatográficas para la determinación de las auxinas: la separación cromatográfica se realizó de forma isocrática en una columna de fase reversa C₁₈ utilizando como fase móvil una relación de acetonitrilo-ácido acético 0.5 % (6:4, v/v), previamente desgasificada y a una velocidad de flujo de 0.6 mL min⁻¹. La detección se realizó por fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 280 nm y de emisión de 340 nm.

Condiciones cromatográfica para la determinación de citocininas: la separación cromatográfica se realiza de forma isocrática en una columna de fase reversa C₁₈ utilizando como fase móvil una relación de acetonitrilo-agua (ácido acético 0.5 %) (7:3, v/v), previamente desgasificada y a una velocidad de flujo de 1.0 mL min⁻¹. La detección se realizó con un detector de arreglo de diodos a una λ de 280 nm.

CAPÍTULO III

Establecimiento de cultivo de tejidos de *Coffea arabica*

Resultados

3.1. Introducción

Normalmente los callos bajo condiciones *in vitro* se forman a partir de heridas hechas al tejido. Estos tienen un periodo de crecimiento que varía según la especie y dependiendo de la edad, el tipo de explante, el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento utilizados, así como las condiciones de temperatura y luminiscencia. Por otra parte, el estudio de callos a lo largo de los años ha sido objeto de desarrollos de varias investigaciones relacionadas al campo del cultivo de tejidos vegetales. Los callos se utilizan principalmente para el estudio de la organogénesis (regeneración de tejidos u órganos completos de una planta), embriogénesis somática (regeneración de una planta completa a partir de una célula que no es producto de la fusión de gametos) y generación y mantenimiento de suspensiones celulares. Estos procesos normalmente tienen implicaciones en la bioquímica, biología molecular, ciencias ómicas, entre otras áreas de estudio.

La mejor alternativa para producir callos es a partir de explantes de hojas, en el caso de *C. arabica*, existen varios protocolos para la inducción de callos. El más utilizado fue el descubierto por Söndahl & Sharp (1977), quienes utilizaron medio MS más una relación específica de 2,4-D y kinetina, lograron obtener biomasa pre-embriogénica o callos en explantes de hojas en un periodo no mayor a los 45 días. A partir de estos datos, los análisis posteriores del tejido se priorizaron en su morfología, anatomía, así como la caracterización de su dinámica de crecimiento. Desde entonces, el estudio de la inducción de callos se ha intentado modificar a partir de los cambios de la concentración de las auxinas y citocininas, obteniendo resultados variables.

3.2. Inducción de callos

La inducción de los callos se llevó a cabo en hojas de plántulas de *C. arábica*. El segundo y tercer par de hojas fueron colocadas en medio MS, suplementado con 4.5 μM de 2,4-D, 9.2 μM de KIN por un periodo de 10 semanas; a la sexta semana se realizó un cambio de medio. Lo anterior se realizó con la finalidad de retirar el callo formado de la cantidad de

hoja restante y obtener una mejor proliferación.

Durante las primeras semanas de la inducción de callo, no se vieron cambios en los explantes a simple vista. Fue a partir de la semana 4 (30 días) que se pudo observar la formación de biomasa alrededor de las heridas generadas en los explantes. Para la semana 6 (45 días) los explantes ya contaban con una proporción incrementada de tejido caloso, el cual, presentaba una coloración blanca-cremosa. Al cabo de la semana 10 (73 días) la proporción de los callos aumentó y se comenzó a observar un cambio de coloración (Figura 3.1).



Figura 3.1 Inducción de callos de *C. arabica*. Izquierda; formación de callos después de 4 semanas de inducción. Centro; callos después de 6 semanas de inducción. Derecha; proliferación de callos después de 10 semanas.

Conforme transcurrió el tiempo, las características morfológicas del callo cambiaron, pasando de ser una masa pre-embriogénica, a convertirse en un callo compacto y luego friable.

3.3. Ciclo de cultivo y evaluación de los diferentes parámetros

Para caracterizar cualquier ciclo de cultivo de una línea celular existen diferentes parámetros. Uno de los principales es el peso fresco, el cual proporciona información del aumento de la biomasa que se está produciendo (implica la síntesis de materia orgánica y la asimilación de nutrientes) y la elongación determinada por la entrada de agua al tejido. Sin embargo, el peso fresco tiende a tener mucha variación debido a diferentes factores, particularmente la dificultad de eliminar el agua que se encuentra fuera de las células. Por su parte, uno de los parámetros más confiables para medir los componentes de una célula es el peso seco, por lo que, para un análisis más efectivo respecto a los componentes, se prefiere la medida de este parámetro.

3.3.1 Análisis de los pesos fresco y seco

El crecimiento del callo medido como el aumento en el peso fresco se generó de manera progresiva. Se apreciaron cuatro fases de crecimiento: La fase de adaptación (I), fase exponencial (II), fase lineal (III), un periodo de crecimiento decreciente después de la fase lineal (IV) (Figura 3.2), además de un periodo de crecimiento continuo similar a la fase lineal en los últimos días del ciclo. El callo no llegó a su fase estacionaria durante el ciclo de cultivo estudiado.

La fase de adaptación del cultivo comprendió del día 0 de inducción al día 10, en ella se observó un crecimiento mínimo. A continuación, se presentó una fase exponencial, la cual se generó entre los días 10 y 24 teniendo un crecimiento más marcado. Posteriormente, se presentó un crecimiento lineal entre los días 24 y 31, en los cuales el aumento del tejido mostró la misma cantidad en comparación de los puntos anteriores juntos (alrededor de 4.20 g). Entre el día 31 y 35 se generó un decrecimiento en el cultivo, consistente con un retardo en la proliferación celular. Finalmente, entre los días 35 y 42 se observó un estado de crecimiento continuo similar a la fase exponencial (aproximadamente de 5.50 g) (Figura 3.2).

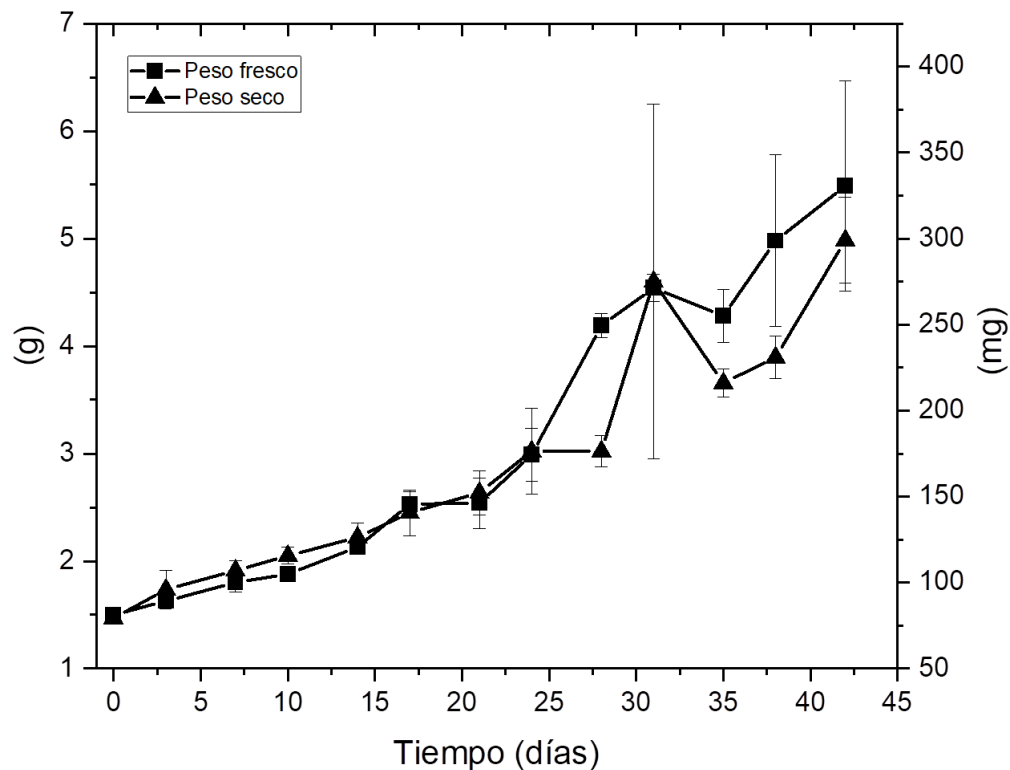


Figura 3.2. | Ciclo de crecimiento callos de *C. arabica* medido como aumento en los pesos

fresco y seco. Se observan 4 fases; fase de adaptación (0-14), fase exponencial (14-24), fase lineal (24-31), un periodo de crecimiento decreciente después de la fase lineal (31-35) y una fase de crecimiento continuo similar a la fase lineal (38-42).

Por otra parte, el peso seco se obtuvo después de que los callos han pasado por un proceso de liofilización (deshidratación de la muestra). Durante la evaluación del peso seco se obtuvieron resultados parecidos al parámetro de peso fresco respecto al crecimiento celular. La fase de adaptación del cultivo se mantuvo hasta el día 14. Así mismo, el crecimiento exponencial se presentó entre los días 17 y 24. En estas dos fases, el crecimiento se manifestó progresivamente desde el día 3 después de la inducción, extendiéndose hasta el día 24, obteniendo un incremento similar en cuanto a cantidad de peso (aproximadamente 100 mg). A partir de los días 28 y 31 se presentó la fase lineal, la cual generó la misma cantidad de peso en comparación con las fases anteriores juntas (aproximadamente 100 mg). Posteriormente, entre los días 31 y 35 hubo una disminución del peso comparado con la fase anterior, indicando una desaceleración que concuerda con la fase limitante del ciclo de crecimiento. Finalmente, entre los días 38 y 42 se presentó un crecimiento similar a la fase lineal (días 28 y 31), lo que indica un segundo crecimiento de la biomasa en el ciclo.

3.3.2 Morfología y dinámicas de crecimiento del ciclo de cultivo

Los callos se observaron a lo largo del ciclo de cultivo. A medida que aumentó la biomasa, la morfología presentó modificaciones en su estructura y coloración. Partiendo de callos color blanco/crema en el día de inducción (0), no hubo modificaciones en su coloración hasta el día 17, donde se detectó un cambio a un color crema y una consistencia compacta. Durante los siguientes días, que corresponden a la fase exponencial, los callos presentaron una coloración blanca y consistencia menos compacta. Al momento de llegar a la fase lineal, los callos cambiaron su coloración nuevamente a blanco, esto podría deberse a que en esta etapa se encuentra la mayor división celular durante el ciclo de cultivo, por lo que la biomasa vio afectada su morfología. A su vez, en esta misma fase, el tejido comenzó a presentar una mayor friabilidad (Figura 3.3; Tabla 3.1).

Normalmente, los callos obtenidos se caracterizaron por su alta friabilidad entre los días 31 y 35, lo que coincidió con la fase lineal del cultivo, así como por tener una coloración blanca/crema. La alta friabilidad que presentaron los callos en estos días de cultivo garantizaron una suspensión celular fina, altamente disgregada. Finalmente, durante los días 38 y 42, se presentó una segunda fase de crecimiento, lo que indica que el ciclo no

generó la fase estacionaria (Tabla 3.2).

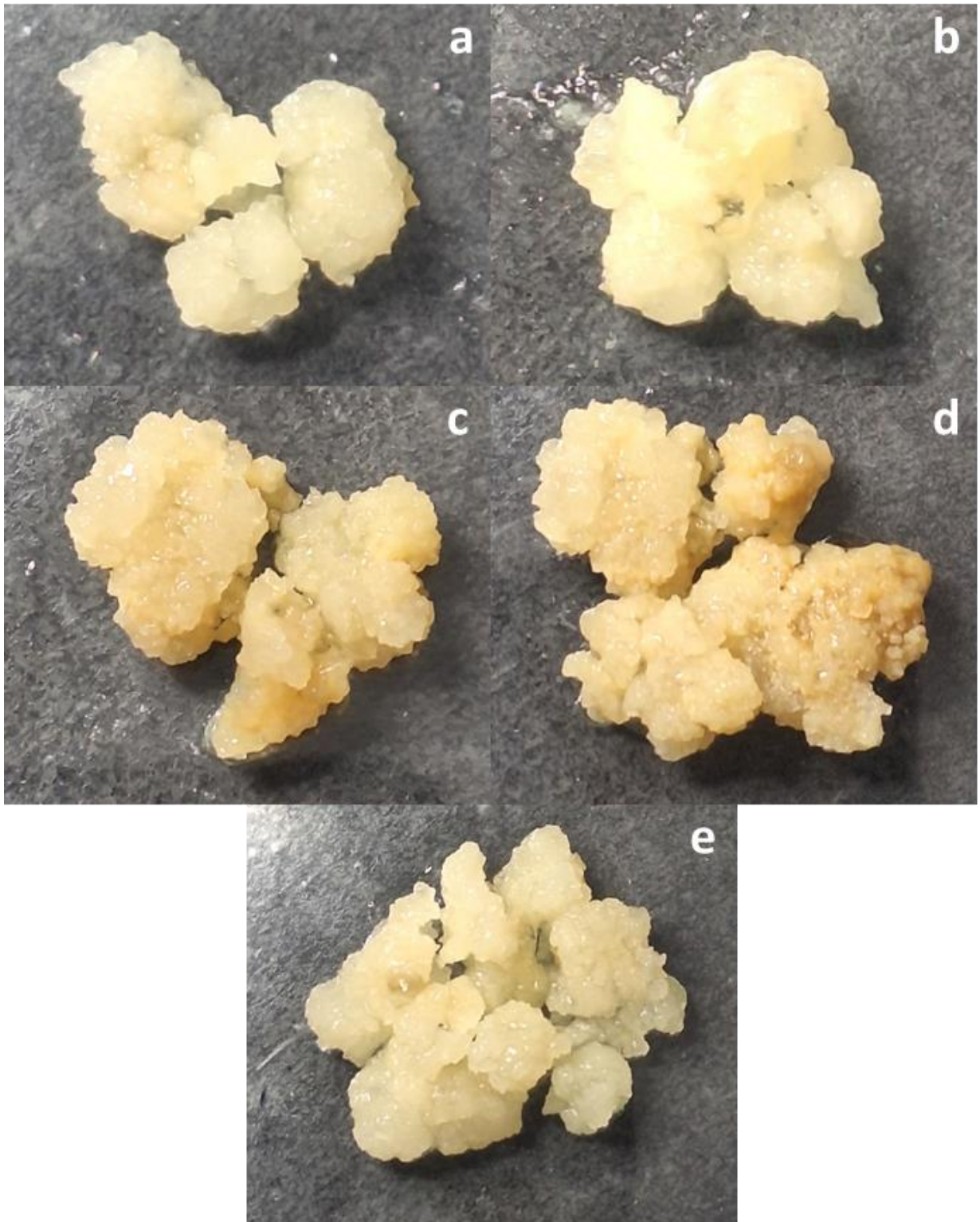


Figura 3.3 | Morfología de callos de *C. arabica*. a) Callos en el día 0 (inducción). b) día 10. c) día 21. d) día 31 y e) día 42 en el ciclo de crecimiento callo.

Tabla 3.1 | Resultados de la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación e índice de crecimiento de los callos al final de un ciclo de cultivo de 42 días.

Parámetro	Inóculo (mg)	Tiempo de duplicación (td) (días)	Velocidad de crecimiento (μ_{max}) (días ⁻¹)	Índice de crecimiento (IC) (días)
		$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$	$\mu = \frac{\ln Xf - \ln Xo}{tf - to}$	$I = \frac{Xf - Xo}{Xo}$
Peso fresco	1500	22.399	0.0309	2.6622
Peso seco	79	21.72	0.0319	2.828

Por otro lado, de acuerdo con los datos obtenidos de peso seco y fresco, se pudieron calcular los parámetros de crecimiento y desarrollo como el índice de crecimiento, el tiempo de duplicación y la velocidad de crecimiento. En el caso del índice de crecimiento del peso fresco de los callos, su resultado fue de 2.6622, teniendo un tiempo de duplicación de 22.399 días, así como una velocidad de crecimiento de 0.0309. Lo anterior indica que los callos tomaron los nutrientes del medio de cultivo de manera adecuada, por lo que se ve reflejado en el aumento de la biomasa. Finalmente, utilizando en el peso seco como indicador su índice de crecimiento fue de 2.828, mientras que su tiempo de duplicación fue de 21.72 días y su velocidad de crecimiento terminó siendo de 0.0319.

Tabla 3.2 | Resumen de las características físicas que experimentaron los callos con base en su color y consistencia a través de un ciclo de cultivo.

Características de los callos de las diferentes edades de *C. arabica*.

Edad de los callos		Características de los callos		
Días	Callos Formados	Color	Friable	Compacto
0	n/a	Blanco/Crema	-	-
3	+	Crema	-	*

7	+	Crema	-	*
10	+	Crema	-	*
14	+	Crema	-	*
17	+	Crema	*	*
21	++	Blanco	*	-
25	++	Blanco	*	-
28	++	Crema	**	-
31	+++	Blanco	**	-
35	+++	Blanco	**	-
38	+++	Blanco/Crema	**	*
42	+++	Blanco/Crema	**	*

Cantidad de callos formados, friable, compacto.

(+): Ligera formación. (-): No friable. (-): No compacto.

(++): Media formación. (*): Poco friable (*): Compacto

(+++): Abundante formación. (**): Friable.

3.4 Cuantificación de auxinas y citocininas

Para la obtención de la cantidad de auxinas y citocininas en el muestreo del ciclo de crecimiento se utilizó la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Se compararon los tiempos de retención, los patrones de fraccionamiento de los estándares y las auxinas y citocininas extraída de los callos.

Por su parte, las principales auxinas a identificar fueron el AIA de manera libre y sus conjugados específicos como lo son el AIA-Ala, AIA-Asp y AIA-Leu. Mientras que las citocininas a identificar fueron tZ, iP y BA.

3.4.1 Determinación de auxinas y sus conjugados

En general, los callos presentaron diferencias en su contenido endógeno de AIA libre y sus conjugados a lo largo del ciclo de crecimiento de los callos. De acuerdo con los datos obtenidos, el conjugado de AIA-Leu presentó los niveles más altos, llegando a niveles de 2 picomoles g⁻¹ de peso seco. El contenido de AIA-Asp osciló alrededor de los 0.45 picomoles g⁻¹ de peso seco a partir del día 14, mientras que sus niveles fueron indetectables durante los primeros 14 días del ciclo de cultivo. El contenido de AIA libre, el cual representa al regulador del crecimiento activo, llegó a niveles de 0.7 picomoles g⁻¹ de peso seco durante

los primeros nueve días del ciclo para luego disminuir a niveles prácticamente indetectables. Los niveles del conjugado AIA-Ala solo se detectó de forma importante hasta los días 38 y 42 del ciclo de cultivo, alcanzando niveles de 0.3 picomoles g⁻¹ de peso seco (Figura 3.4). El conjugado de AIA-Leu representa más del 46% del total de auxina en los callos de *C. arabica*, en tanto que los contenidos de los conjugados de AIA-Ala y AIA-Asp fueron el 17.3% y 21.5%, respectivamente. Mientras que la auxina libre es menos del 15% del total de auxina en el cultivo (Figura 3.5).

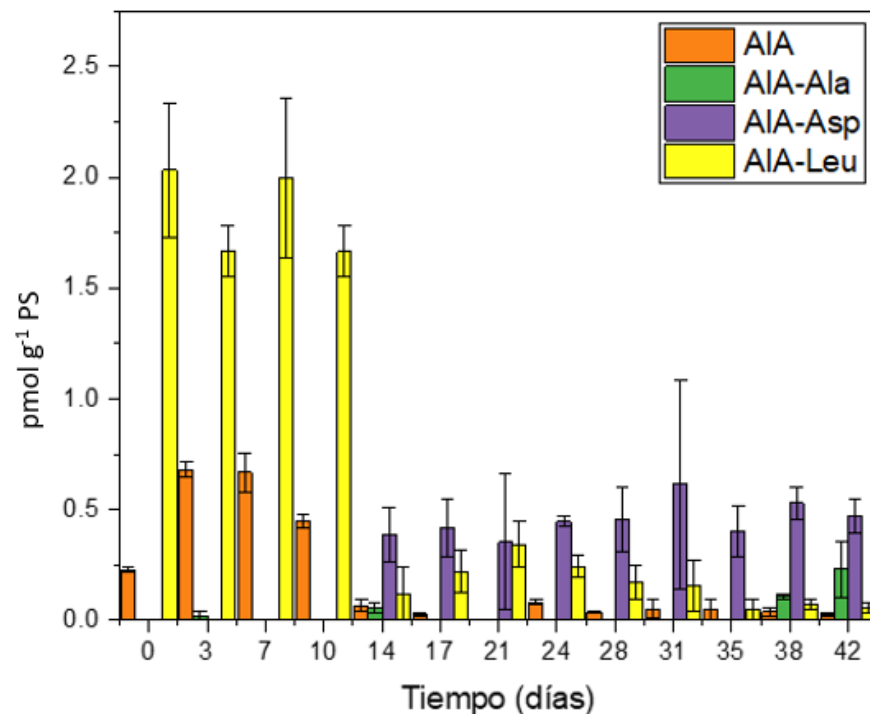


Figura 3.4 | Contenido endógeno de AIA libre y sus conjugados en un ciclo de cultivo de *C. arabica*. AIA libre (barras naranjas), AIA-Leu (barras amarillas), AIA-Asp (barras moradas) y AIA-Ala (Barras verdes). Se recolectaron muestras del ciclo de crecimiento que abarcan desde el día 0 hasta el 42. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

Auxinas

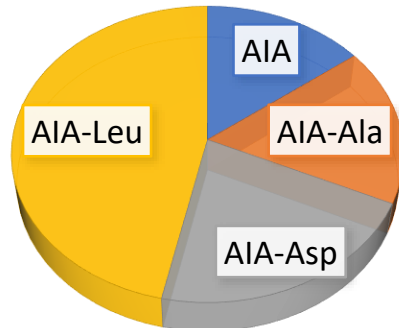


Figura 3.5 | Contenido endógeno de auxinas vista como participación del total del AIA libre y sus conjugados durante un ciclo de cultivo de *C. arabica*.

Con la finalidad de hacer un análisis más puntual sobre el contenido de AIA y sus conjugados a lo largo del ciclo de cultivo, se presentan las gráficas individuales de cada uno de los analitos analizados junto con los datos del ciclo de cultivo.

El contenido endógeno de AIA al día 0 del ciclo de crecimiento fue de $0.23 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$ y aumento más de dos veces durante los días 7, 10 y 14 respectivamente, siendo el día 7 con un promedio de $0.68 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$ en el que se tuvo más cantidad de AIA durante todo el ciclo. Posterior a estos días se observó una baja notable llegando al día 21 cuando ya no se detectó AIA. A partir de día 24 los niveles endógenos de AIA se mantuvieron por debajo del $0.1 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$ finalizando en el día 42 con un registro de $0.03 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$ (Figura 3.6).

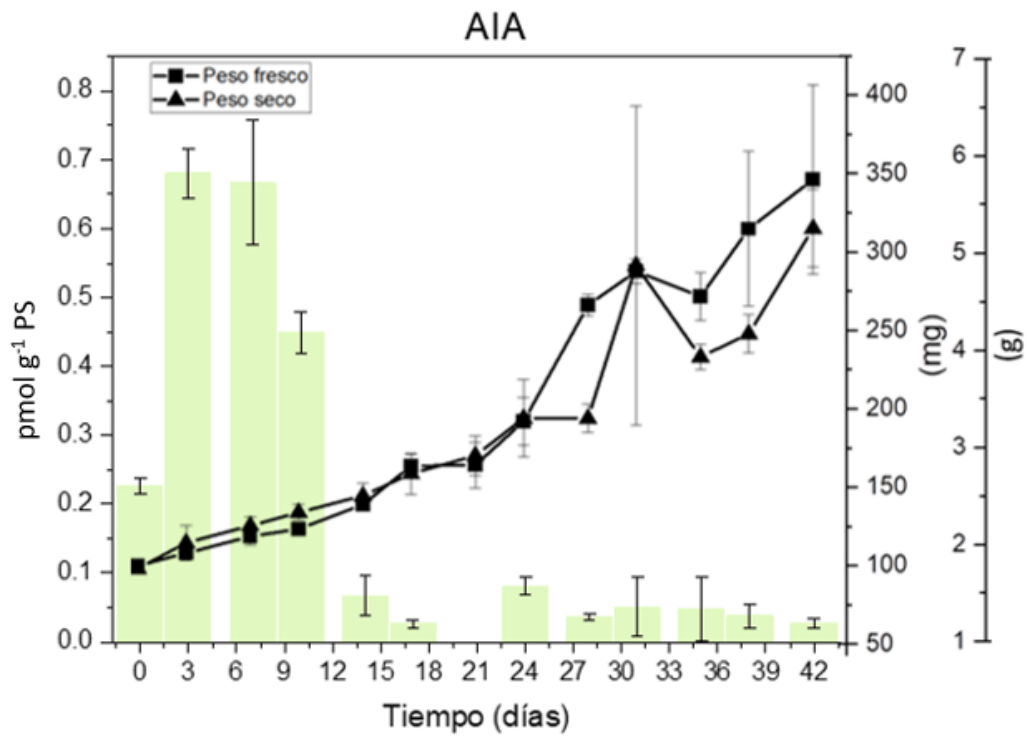


Figura 3.6 | Contenido de AIA libre en muestras de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

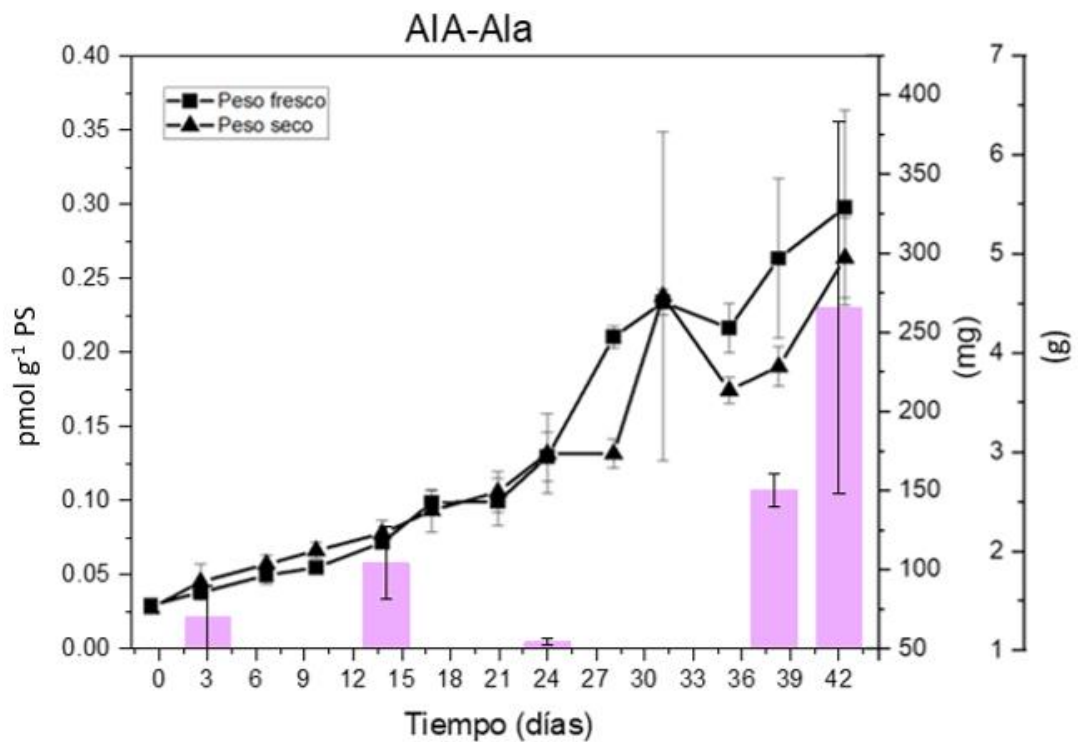


Figura 3.7 | Contenido de AIA-Ala en muestras de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

El conjugado de AIA-Ala se presentó en fracciones durante el ciclo de crecimiento. La detección abarcó los días 3, 14, 24, 38 y 42 siendo este último día en donde el promedio de AIA-Ala fue mayor con $0.23 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$ (Figura 3.7).

No hubo detección de AIA-Asp en los primeros 12 días del ciclo de cultivo, teniendo el primer registro con un promedio de $0.39 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$ en el día 14. En los días posteriores el promedio de AIA-Asp se mantuvo entre los 0.35 y los $0.45 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$ llegando así hasta el día 28. Así mismo, al llegar al día 31 se registró el promedio más alto del ciclo con $0.61 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$. Finalmente, en los días 35, 38 y 42 el promedio de AIA-Asp estuvo en $0.50 \text{ pmol g}^{-1} \text{ PS}$. En general, los datos obtenidos hacen énfasis en que el AIA-Asp no está presente durante la fase de adaptación del ciclo de crecimiento y que su punto máximo de presencia se ubica en la fase lineal, donde también se genera el mayor peso de los callos (Figura 3.8).

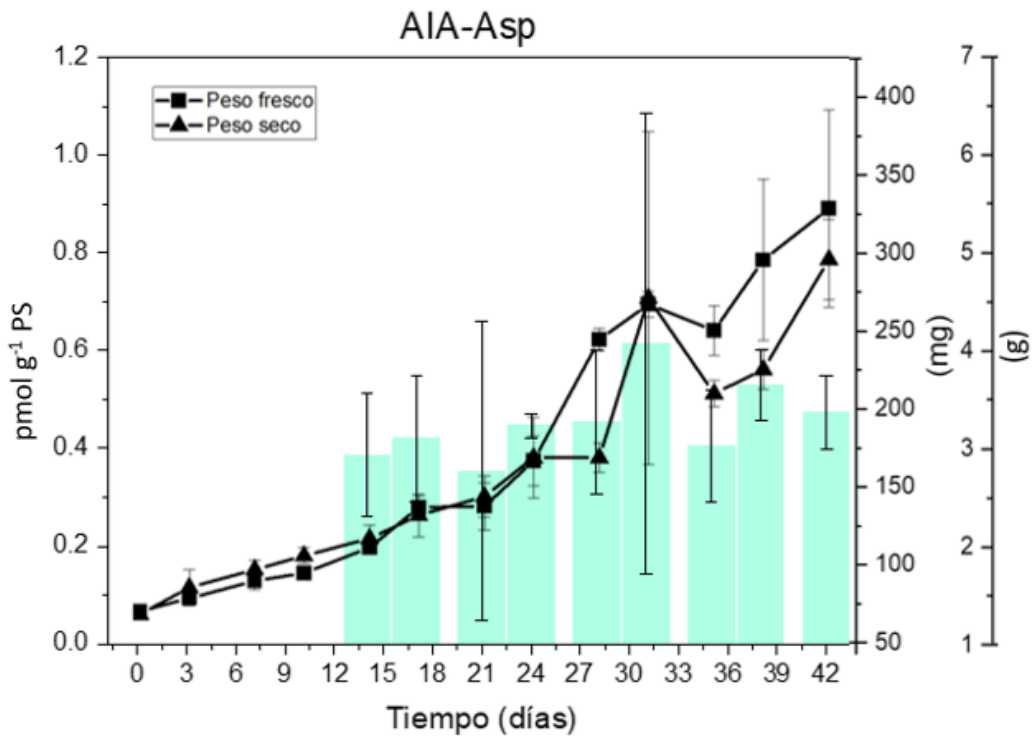


Figura 3.8 | Contenido de AIA-Asp en muestras de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

A diferencia del contenido de los conjugados de AIA-Asp y AIA-Ala, el conjugado de AIA-Leu estuvo presente en todos los puntos de muestreo, compartiendo una similitud respecto a cantidad comparada con el AIA libre. En los primeros 10 días, se registraron los niveles más elevados de este conjugado, siendo el día 0 con el promedio más alto con 2.03 pmol g⁻¹ PS y para los días 7 y 10 con un promedio de 2 y 1.67 pmol g⁻¹ PS. En los días posteriores, hubo una reducción notable de más de 10 veces y teniendo como el valor más alto el día 21 con un promedio de 0.34 pmol g⁻¹ PS. Al final del ciclo en el día 42 el contenido de AIA-Leu se redujo a la cantidad más baja registrada, con un valor de 0.06 pmol g⁻¹ PS. De acuerdo con estos datos, la cantidad de AIA-Leu es más alta en la primera fase del ciclo en comparación con las últimas etapas del ciclo (Figura 3.9).

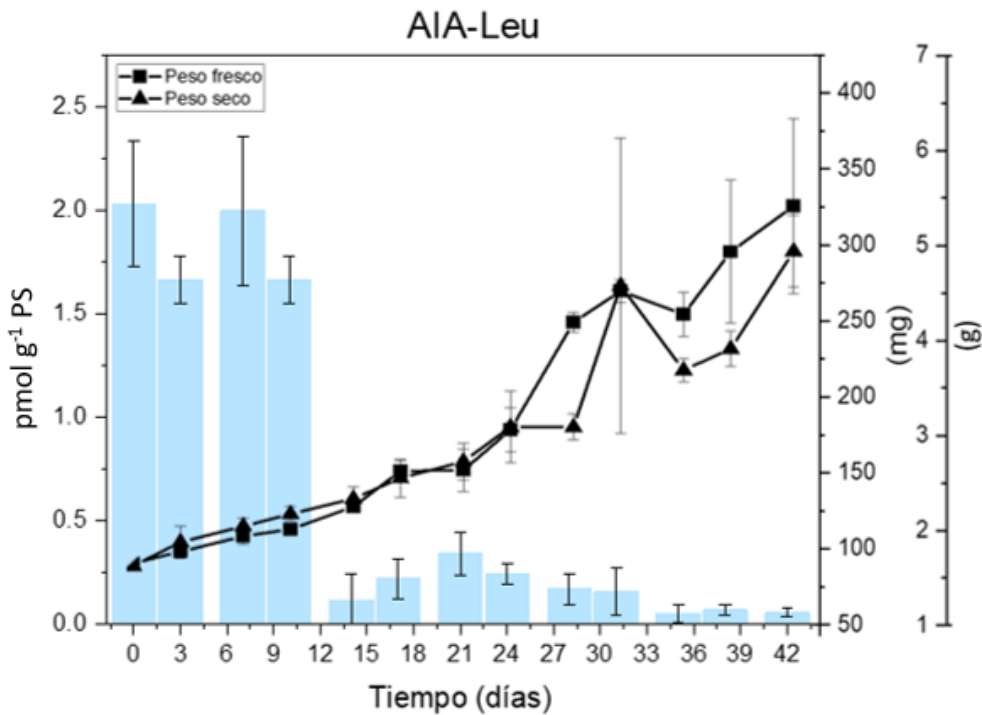


Figura 3.9 | Contenido de AIA-Leu en muestras de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

3.4.2 Determinación de citocininas

Después de observar el crecimiento de los callos durante el ciclo de cultivo, se determinaron los cambios en el contenido de varias de las citocininas endógenas en los mismos días de muestreo del ciclo que se utilizaron para determinar el contenido de auxinas. Se midió el contenido de *trans*-zeatina (*tZ*), isopentenil-adenina (*iP*) y benciladenina (*BA*). Para las determinaciones del contenido de citocininas se usó el material empleado en la determinación del peso seco de los callos.

En general, se determinaron diferencias notables en el contenido de las tres citocininas analizadas durante el ciclo de crecimiento. La cantidad de *tZ* fue mucho mayor en relación de las otras citocininas evaluadas. Por otra parte, el contenido de *iP* se mantuvo en niveles similares a lo largo del ciclo de cultivo. El contenido de *BA* fue el más bajo de las tres citocininas determinadas (Figura 3.10). El contenido de *tZ* llegó a niveles de más de 5,000 picomoles por gramo de peso seco. Los niveles más bajos fueron de alrededor de 1,000 picomoles por gramo de peso seco. El contenido de *iP* osciló alrededor de 250 picomoles por gramo de peso seco durante todo el ciclo de cultivo. La *BA* varió más a lo largo del ciclo de cultivo, desde contenidos tan bajos como 10 picomoles por gramo de peso seco, hasta un poco más de 60 picomoles por gramo de peso seco después de 35 días de cultivo. La *tZ* representó el 90% de la concentración total de citocininas, mientras que la *iP* y la *BA* representaron el 8.6% y el 1%, respectivamente (Figura 3.11).

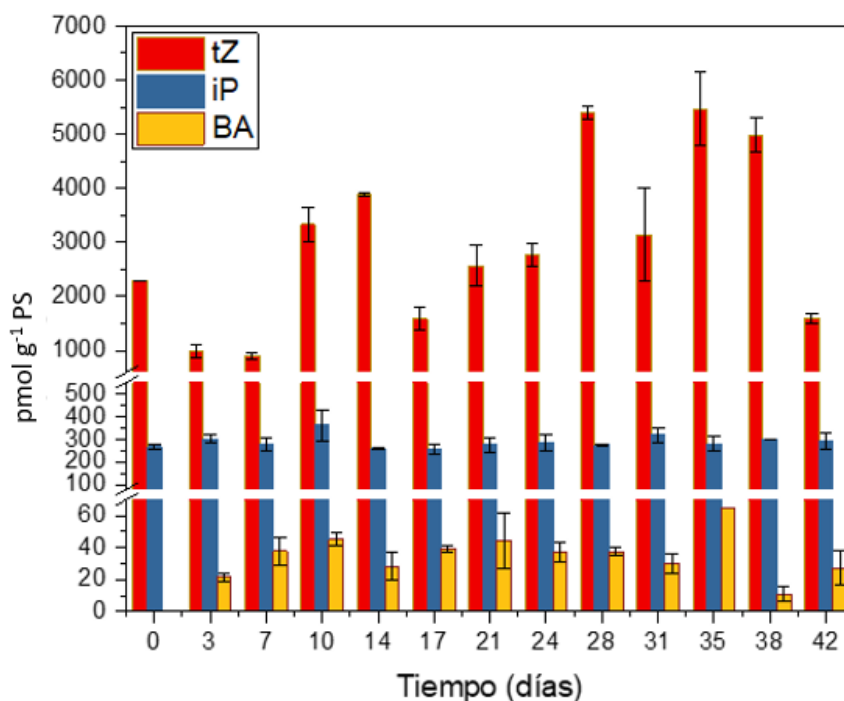


Figura 3.10 | Contenido endógeno de tres diferentes citocininas en un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Se recolectaron muestras del ciclo de crecimiento que abarcan desde el día 0 hasta el 42. Las muestras se analizaron como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos independientes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

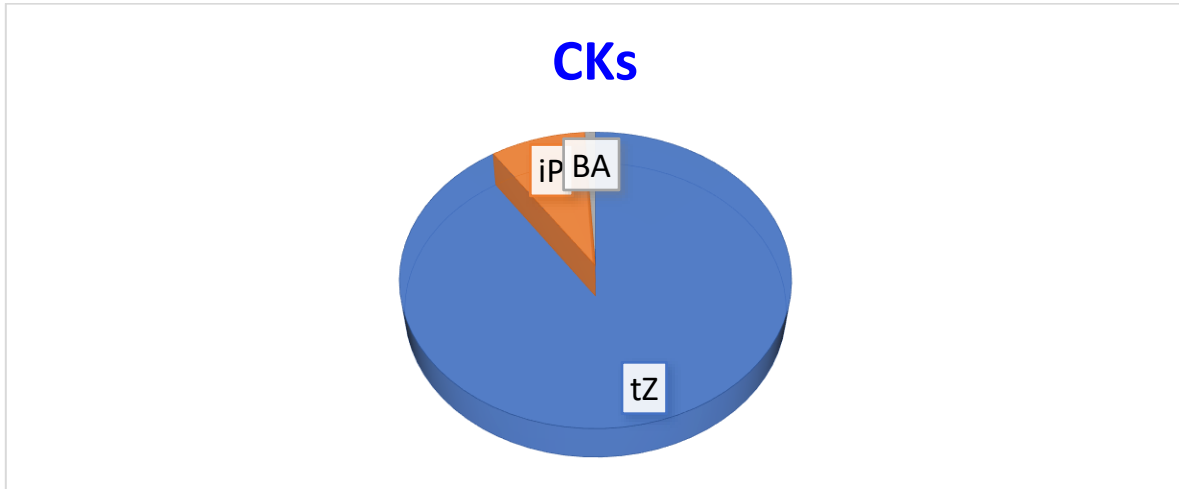


Figura 3.11 | Contenido endógeno de citocininas vista como participación del total de la *tZ* libre y sus conjugados durante un ciclo de cultivo de *C. arabica*.

El contenido de *tZ* aumentó conforme el callo crecía. Como puede apreciarse en la Figura 3.12 el cultivo no presentó una fase de retardamiento de manera clara, probablemente por la cantidad de callo utilizada como inóculo, sino que empezó a crecer de manera sostenida. Durante este tiempo el contenido de *tZ* aumentó de manera progresiva hasta 3,894 pmol g⁻¹ PS. Durante la pequeña fase exponencial del cultivo, el contenido de *tZ* disminuyó hasta 1,581 pmol g⁻¹ PS en el día 17 y de ahí aumentó hasta alrededor de 5,400 pmol g⁻¹ PS el día 38. Para el día 42 hubo una disminución hasta 1,590 pmol g⁻¹ PS (Figura 3.12).

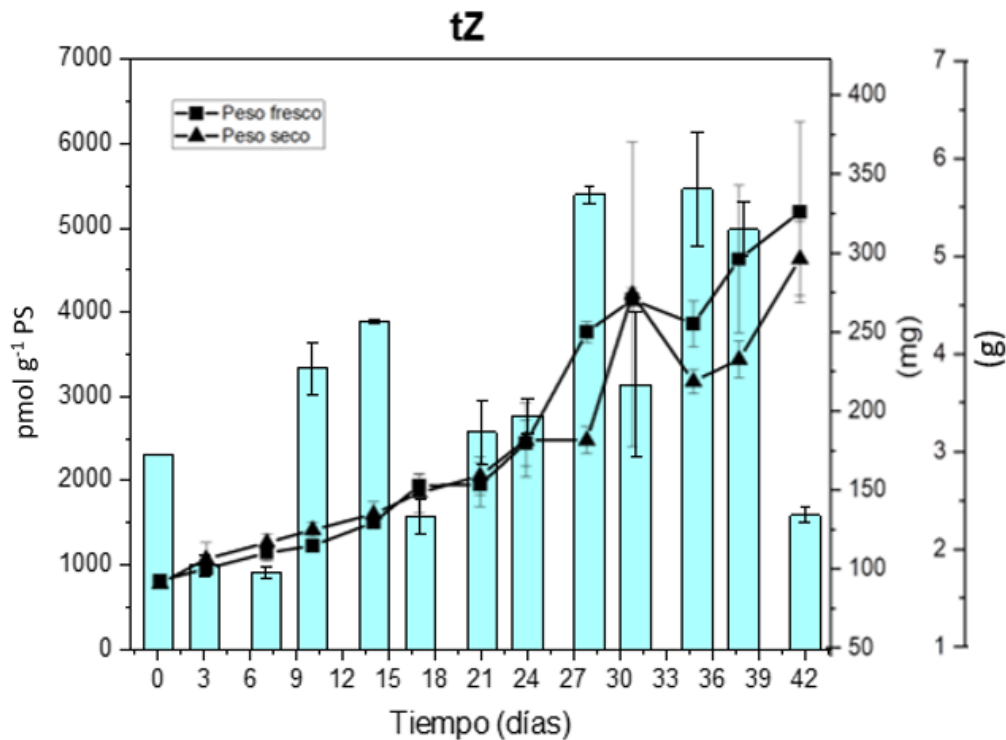


Figura 3.12 | Contenido de tZ en muestras de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

En el caso de la iP el contenido determinado para cada día de muestreo en el ciclo de crecimiento de los callos se mantuvo alrededor de los 290 pmol g PS⁻¹. En general, la cantidad de iP detectada durante todos los puntos de muestreo del ciclo de crecimiento estuvo entre los 250 y los 320 pmol g⁻¹ PS. La mayor cantidad de iP se obtuvo en el día 10, teniendo un promedio de 311.6 pmol g⁻¹ PS, mientras que la cantidad más baja se reflejó en el día 17 con un promedio de 256.3 pmol g⁻¹ PS, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 3.13).

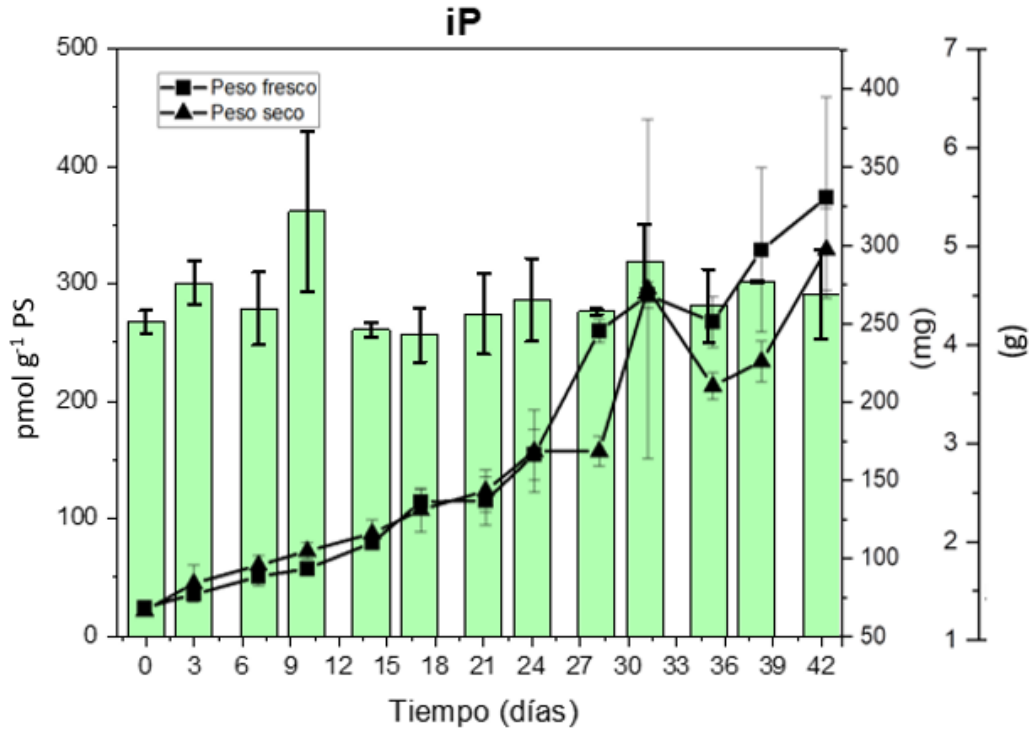


Figura 3.13 | Contenido de iP en muestras de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

La cuantificación de la BA a lo largo del ciclo de cultivo mostró que en el día 3 había una cantidad de 22 pmol g PS⁻¹. Entre los días 6 y 30 del ciclo de cultivo la cantidad de BA osciló alrededor de 38 pmol g⁻¹ PS. Si bien hay diferencias, estas no son estadísticamente significativas. En el día 36 hay un aumento importante en la cantidad de BA que alcanza los 65 pmol g PS⁻¹. Después de este aumento la cantidad de BA disminuye notablemente en los días 39 y 42 (Figura 3.14).

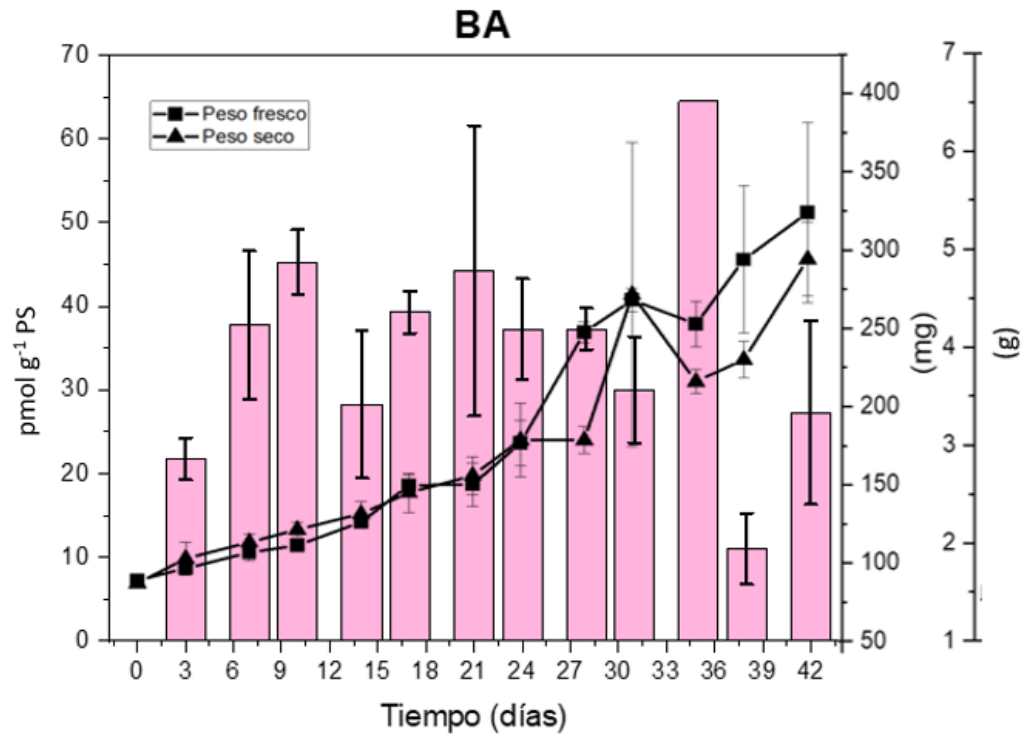


Figura 3.14 | Contenido de tZ en muestras de un ciclo de cultivo de callos de *C. arabica*. Las muestras fueron analizadas como se describe en materiales y métodos. Todos los análisis se realizaron con 3 réplicas biológicas de por lo menos 2 experimentos diferentes. Las barras de error representan el error estándar (n=3).

CAPÍTULO IV

Establecimiento de cultivo de tejidos de *Daucus carota*

4.1. Introducción

Los tubérculos de zanahoria tienen una larga tradición en el campo del cultivo de tejidos vegetales. Dos de los tres primeros reportes de inducción de callos hace 90 años, reportaron su uso (Gautheret, 1939; Nobécourt, 1939). Veinte años después, otra vez dos de los tres primeros reportes sobre la producción de embriones somáticos reportaron el uso de zanahoria (Reinert, 1959; Steward *et al.*, 1958). Los primeros estudios sobre el efecto de la fuente de nitrógeno en la inducción de la embriogénesis somática se llevaron a cabo en zanahoria (Halperin, 1964) y el primer reporte sobre morfogénesis, a partir de una sola célula realizado por un grupo japonés, indicaba que el modelo utilizado fue el de zanahoria (Kato and Takeuchi, 1963). Los cultivos de zanahoria también se han empleado para los estudios de los componentes de la cadena de señalización que involucra al AMPc (Kurosaki *et al.*, 1993; Kurosaki and Nishi, 1993).

En las siguientes tres décadas los japoneses, en particular el grupo encabezado por el Profesor Atsushi Komamine publicaron una gran cantidad de artículos sobre diferentes aspectos del cultivo de tejidos de zanahoria, desde su mejoramiento hasta los primeros estudios bioquímicos y moleculares sobre el comportamiento de los callos, las suspensiones celulares y el desarrollo de los embriones somáticos (Fujimura, 2014).

En la actualidad, el cultivo de tejidos de zanahoria sigue siendo ampliamente empleado para contestar preguntas científicas sobre diversos aspectos de la biología de las células vegetales. Nuestro grupo lo ha utilizado en el pasado como testigo positivo en diversos experimentos sobre embriogénesis somática (Nic-Can *et al.*, 2015). En la actualidad nuestro grupo está interesado en diversos aspectos de la cadena de señalización que lleva a que una célula somática cambie su programa genético para producir un embrión que es capaz de germinar y producir una planta sana y vigorosa. El primer paso es el establecer un cultivo viable, que crezca bien, y sus resultados de crecimiento sean reproducibles. Este fue el objetivo de esta parte de la investigación. Es el primer paso, fundamental, para el desarrollo de un modelo al que se le puedan hacer las preguntas deseadas.

4.2. Resultados

4.2.1. Generación de callos a partir de tubérculos.

Los callos salientes de los tubérculos fueron examinados a los 7, 14, 21 y 28 días respectivamente. En el día 28, los callos fueron separados del explante original (tubérculo) y fueron depositados en medio fresco para su propagación (Figuras 4.1 y 4.2).

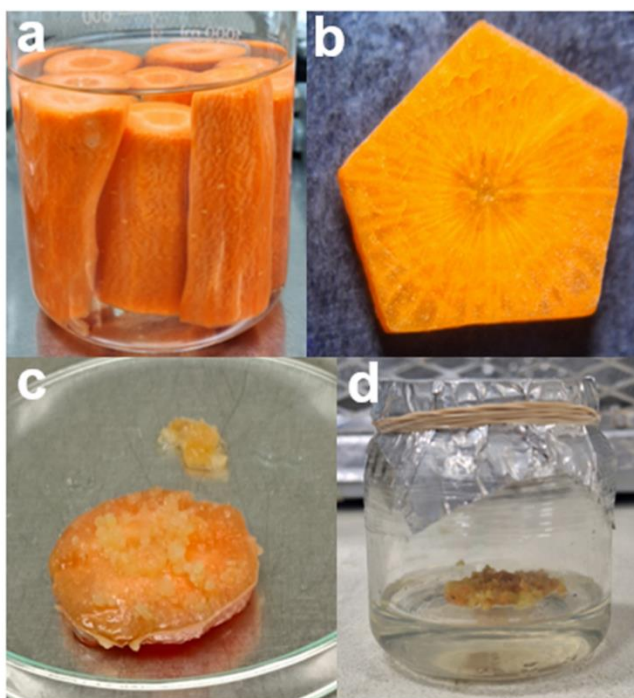


Figura 4.1 | Inducción de callos de *D. carota* a partir de tubérculos. a) Asepsia de los tubérculos. b) Recorte transversal del tubérculo que contiene el cambium vascular. c) Crecimiento de callos alrededor del cambium vascular. d) Resiembra de los callos en medio MS (ver materiales y métodos).



Figura 4.2 | Obtención de los callos de *D. carota* después de 4 semanas de inducción en medio MS. a) Día 0. b) Día. 14 c) Día 28.

4.2.2. Inducción de las suspensiones celulares.

Una vez que se estableció el cultivo de callos, se procedió a generar las suspensiones celulares. En matraces con 50 mL de medio de cultivo (ver materiales y métodos) se inoculó alrededor de un g de callo. Las suspensiones fueron propagadas cada 15 días por un periodo de 2 meses.

Se realizó un seguimiento de la obtención de las suspensiones celulares desde la inoculación a partir del día 0 hasta el día 60 después de la inducción. En el primer subcultivo, existe un desprendimiento y una multiplicación celular marcada, la adaptación celular al medio de cultivo se manifiesta con un crecimiento homogéneo y organizado después de 30 días (Figura 4.3).

Durante el segundo subcultivo, el crecimiento células fue mucho mayor, por lo que el callo inicial fue filtrado con un colador de maya metálica para retirar los grumos y propagarlos por 1 mes más. Lo anterior fue con la finalidad de generar una línea con un crecimiento constante y evitar la acumulación de agregados celulares muertos y moléculas que se secretan en el medio que pudieran ser perjudiciales para las células que continúan con su división (Figura 4.3).

Después de los 60 días, se pudo obtener la línea celular la cual se encontraba finamente tamizada y a partir de ese entonces, se realizaron nuevos subcultivos con la finalidad de obtener una densidad adecuada para realizar los experimentos del ciclo de crecimiento. También se determinó que el día óptimo para el subcultivo es el día 14, debido a que, en este día, se observan una mayor cantidad de células vivas.

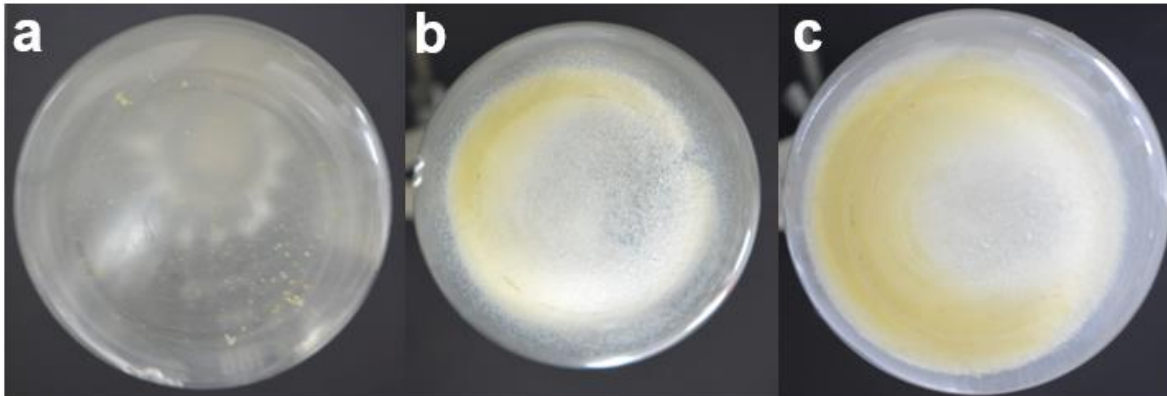


Figura 4.3 | Inducción de suspensiones celulares de *D. carota*. a) callo inoculado en un medio líquido. b) Día 30 de inducción. c) Día 60 de inducción.

4.2.3. Caracterización de una línea de suspensiones celulares de *D. carota*

Después de obtener la densidad necesaria formada por agregados celulares y una coloración beige adecuada, se procedió a caracterizar la línea generada para la cual se tomaron en cuenta diferentes parámetros para evaluar su comportamiento, los cuales se describen a continuación.

4.2.3.1. Pesos fresco y seco

Dentro de los parámetros específicos para la evaluación del crecimiento y comportamiento de las suspensiones celulares durante un ciclo de cultivo se encuentran el peso fresco. Este parámetro determina el crecimiento de la biomasa de las suspensiones celulares que se generan por la división celular, sin embargo, también cuenta con variaciones debido a factores como la facultad de eliminar el agua que se encuentra fuera de las células.

Como se mencionó con anterioridad, partiendo de un inoculo inicial de 1 mL, el peso fresco presentó una dinámica particular durante los días de muestra del ciclo de crecimiento. Desde el día 0, teniendo un peso inicial promedio de 170 mg, la división celular fue mayor en los días posteriores, teniendo su mayor tasa de crecimiento y desarrollo en el día 12, alcanzando un promedio de 1.05 g. Posterior a este día, se observó un decrecimiento constante, presentando un cambio de coloración lo que indica que las células dejaron de dividirse (Figura 4.4).

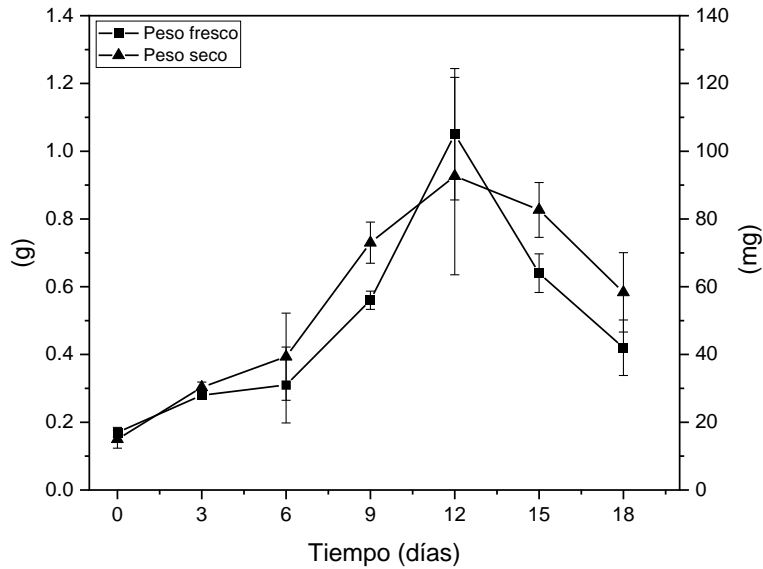


Figura 4.4 | Crecimiento de las suspensiones celulares de *D. carota* basados en un ciclo de cultivo de 18 días bajo los parámetros de peso fresco (■) y peso seco (▲).

Por otra parte, el peso seco representa la cantidad real de la biomasa obtenida sin el contenido de agua. Normalmente, el contenido de agua de las células de *D. carota* es del 90% (peso fresco), por lo que el peso seco es el parámetro más confiable para la determinación del crecimiento celular. En el día 0, el promedio de peso seco en el ciclo de crecimiento fue de 17 mg, manteniendo un aumento exponencial similar al peso fresco. De la misma manera, el crecimiento máximo de la biomasa se observó en el día 12, donde alcanzó un promedio de 92 mg aproximadamente, manteniendo una tendencia similar de decrecimiento en los últimos dos días de muestreo (Figura 4.4).

Basado en los datos obtenidos, se pueden observar algunas fases que reflejan que el crecimiento celular es el adecuado. En primera instancia, existe una fase de crecimiento exponencial, que abarca entre los días 0 y 6, luego se observa el crecimiento lineal, abarcando entre los días 6 y 12 donde, además se representa la mayor cantidad de biomasa celular. Por otra parte, entre los días 15 y 18, se muestra un decrecimiento sustancial de la biomasa, por lo que se indica que las células se dejaron de dividir. Finalmente, estos resultados se pueden observar en los dos parámetros evaluados; el peso fresco y el peso seco (Figura 4.4).

4.2.3.2. Conductividad y pH

La conductividad eléctrica es medida en el medio de cultivo filtrado de las suspensiones celulares, siendo este parámetro importante para poder determinar la toma de nutrientes presentes en el medio, lo anterior implicado en el crecimiento de la biomasa celular. En el presente trabajo, la conductividad se midió a lo largo del ciclo de crecimiento de 18 días, en ese sentido, este parámetro se manifestó de manera inversamente proporcional al crecimiento de la biomasa celular medida en el peso fresco y el peso seco mencionados anteriormente.

Con base en los datos obtenidos, el promedio inicial de la conductividad en el día 0 fue de 7.82 mS y continuó disminuyendo hasta el día 12. Así mismo, entre los días 15 y 18 se presentó un aumento sustancial en la conductividad.

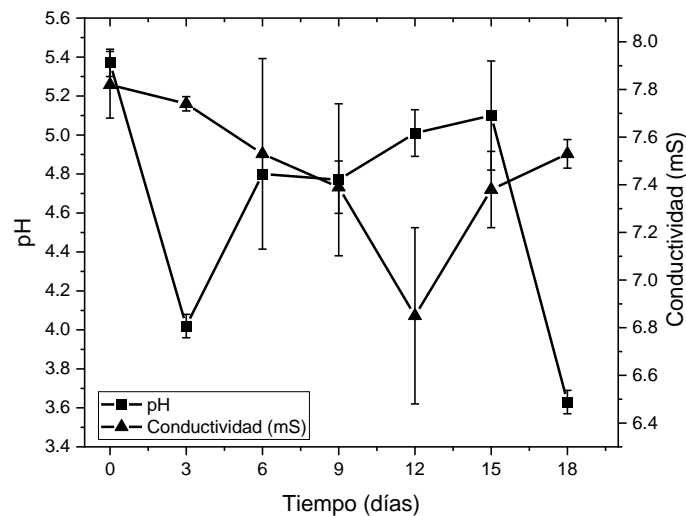


Figura 4.5 | Crecimiento de las suspensiones celulares de *D. carota* basados en un ciclo de cultivo de 18 días bajo los parámetros de conductividad (▲) y pH (■).

El pH disminuyó en los primeros días del cultivo hasta valores alrededor de 4. A partir de ese día el pH subió hasta el día 15. En día 18, coincidiendo con el aumento en la conductividad y la disminución del peso del cultivo el pH disminuyó sustancialmente (Figura 4.5).

En la figura 4.6 se ilustra la dinámica en el crecimiento y el aspecto de las suspensiones celulares de *D. carota*. Como puede apreciarse los cultivos crecen de manera sustancial en un periodo de dos semanas. En experimentos preliminares se pudo constatar que las

suspensiones celulares obtenidas producen una gran cantidad de embriones somáticos cuando se las células se colocan en las condiciones de inducción de la embriogénesis somática adecuadas.

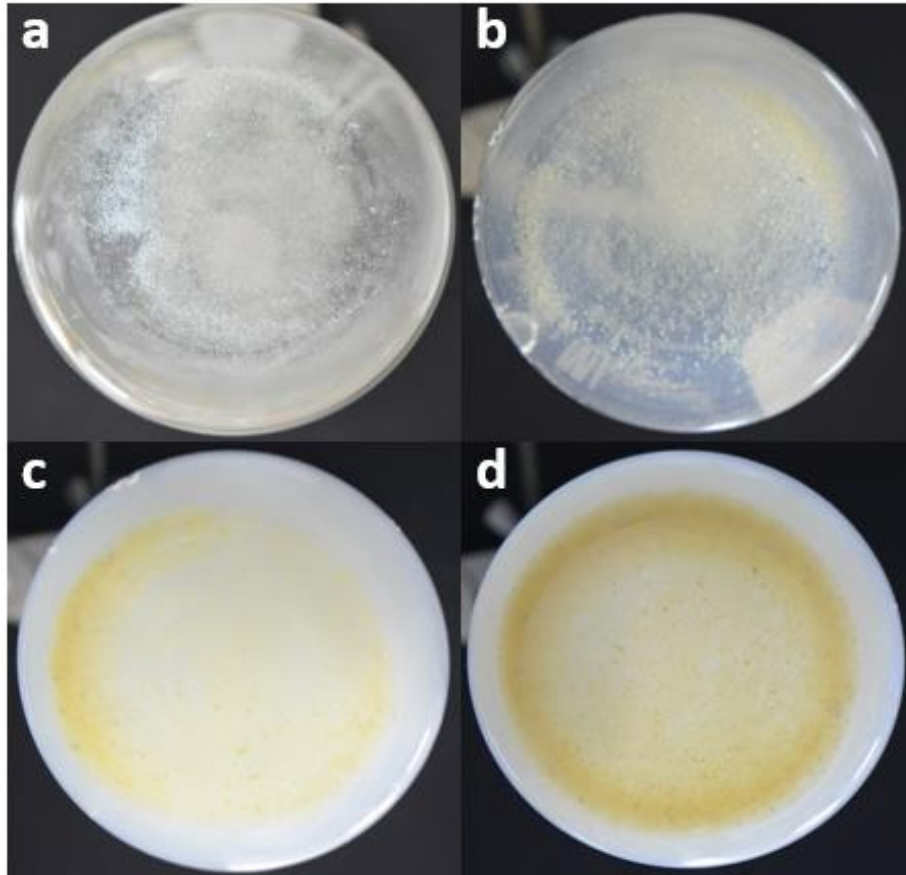


Figura 4.6 | Dinámica de crecimiento de las suspensiones celulares de *D. carota* basado en un ciclo de cultivo de 18 días. a) Día 0. b) Día 6. c) Día 12. d) Día 18.

CAPÍTULO V

Discusión

Desde hace varios años, el CTV es considerado como una importante herramienta para el desarrollo de diferentes investigaciones en los campos de la biotecnología, bioquímica, y ciencias omicas, entre otras (Thorpe, 2012). Dentro del CTV, la inducción y obtención de callos han sido ampliamente estudiados con el objetivo de utilizarlos en mejoramiento de diversos modelos vegetales de importancias para la agricultura (Efferth, 2019; Ikeuchi *et al.*, 2019; Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2018).

Si bien el estudio de los callos ha crecido sustancialmente en los últimos años (Fehér, 2019; Guo *et al.*, 2018; Kruglova *et al.*, 2023; Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2024; Neumann *et al.*, 2020), todavía existen preguntas sin contestar referentes a su patrón de comportamiento fisiológico y molecular.

Dentro de las herramientas utilizadas para el estudio de los callos se encuentran las dinámicas de crecimiento a partir de ciclos de cultivo por periodos de tiempo determinados (Galaz-Ávalos *et al.*, 2012). Además, se han desarrollado diversos parámetros para medir el crecimiento de los callos tanto de manera cuantitativa, como de forma cualitativa. Las principales formas para medir el crecimiento de un cultivo están basadas en el cambio del peso y el contenido endógeno de compuestos específicos, lo que lleva a determinar los cambios por los que atraviesan los tejidos (Aitchison *et al.*, 1977; Galaz-Ávalos *et al.*, 2012; Yeoman and Aitchison, 1973).

En este trabajo se muestran los resultados obtenidos de la dinámica de crecimiento de los callos de *C. arabica* en un ciclo de cultivo de 42 días. En general se pudieron observar algunas de las fases que caracterizan al ciclo de cultivo (Aitchison *et al.*, 1977; Galaz-Ávalos *et al.*, 2012). El total del peso fresco obtenido después de 42 días fue de aproximadamente de 5.49 g más de tres veces que el peso inicial, mientras que, para el peso seco la cantidad total aproximada fue de 299 mg, más de cuatro veces su peso inicial. Los datos obtenidos muestran un crecimiento continuo durante todo el ciclo de cultivo. Estos resultados muestran claramente la necesidad de caracterizar cuidadosamente el comportamiento de cada línea celular que se obtenga en el laboratorio. En este caso, posiblemente debido a la cantidad de inóculo inicial, o debido a características particulares del cultivo no se observaron las fases de retardamiento inicial, ni estacionaria al final. Esta información es de gran importancia independientemente cual será el uso que se de a los callos.

Además del crecimiento se observan cambios importantes en su morfología y fisiología. Estas observaciones son vitales para predecir, en cierta medida, si los callos podrán ser utilizados con el fin para el que se han generado. Por ejemplo, se han reportado cambios respecto a la coloración y compactación en modelos vegetales como *A. sativum*, *B. striata*, *O. sativa*, *S. lycopersicum* (Jin *et al.*, 2020; Mostafa *et al.*, 2020; Pan *et al.*, 2020; Setiaji *et al.*, 2020) los cuales se han ligado a las respuestas de los callos a factores de la diferenciación celular como la ES.

Debido a que las auxinas juegan un papel central en la diferenciación celular su estudio en los diferentes tipos de CTV ha sido muy importante a lo largo de los años (Jiménez and Bangerth, 2001a; Jin *et al.*, 2020; Magnus *et al.*, 1992; Matsuda *et al.*, 2005; Pence and Caruso, 1984; Ribnicky *et al.*, 1996). También, determinar el contenido endógeno de las auxinas y sus conjugados ayuda a conocer cuál es el estado fisiológico que guardan las células lo que permite determinar en qué momento se pueden transferir los cultivos a las condiciones de inducción del proceso en estudio (Ashraf *et al.*, 2006; Blakesley *et al.*, 1991; Huang *et al.*, 2012).

En este trabajo, empleando la técnica de HPLC se determinó la cantidad del AIA y de tres de sus conjugados con aminoácidos, AIA-Ala, AIA-Asp, AIA-Leu. El contenido del AIA y sus conjugados mostraron una importante dinámica. Este dinamismo sugiere una participación muy activa del AIA durante el crecimiento de los callos. Por ejemplo, el contenido de AIA es elevado en los 10 primeros días de iniciado el cultivo, en tanto que el AIA-Asp, el cual es uno de los sustratos para la ruta de degradación no está presente. El conjugado con leucina se encuentra presente al mismo tiempo que el AIA, se ha sugerido que este conjugado puede ser hidrolizado de regreso a AIA (Bartel and Fink, 1995; Davies *et al.*, 1999; LeClere *et al.*, 2002). Comportamientos similares del contenido de AIA se han reportado para *P. purpureum* y *N. tabacum* (Hangarter *et al.*, 1980; Rajasekaran *et al.*, 1987), mientras que en *O. sativa* los niveles de AIA, después de dos semanas, se mantuvieron por debajo de 5 pmol g⁻¹ PF (Huang *et al.*, 2012; Matsuda *et al.*, 2005).

Un caso aparte es el del conjugado de AIA-Ala. Este conjugado sólo se encuentra de manera apenas detectable en los últimos días del ciclo de cultivo. Este conjugado también puede ser hidrolizado de regreso a AIA (LeClere *et al.*, 2002). La determinación de este conjugado, y la determinación de su función en los tejidos vegetales ha sido controversial, particularmente por lo difícil que ha sido su determinación. Por ejemplo, en *O. sativa* no hubo detección por dos semanas de cultivo de callos (Matsuda *et al.*, 2005), en tanto que

en *S. lycopersicum* hubo un incremento del nivel endógeno registrados hasta la tercera semana (Magnus *et al.*, 1992).

El conjugado AIA-Asp también se ha visto envuelto en la controversia sobre su función. Como ya se mencionó se ha indicado que es el primer paso en la ruta de oxidación que lleva a la degradación del AIA, por lo que los niveles que se han reportado varían ampliamente de un cultivo a otro. Por ejemplo, en *M. truncatula* se determinó que sus niveles endógenos se redujeron significativamente después de la tercera semana de cultivo (Kepczynska and Orlowska, 2021), en tanto que en *O. sativa* la cantidad cuantificada de AIA-Asp aumentó después de dos semanas (Matsuda *et al.*, 2005). Aún más Tang *et al.*, (2019) reportaron que el conjugado AIA-Asp se hidroliza para liberar al AIA. Si bien este reporte sigue siendo único, la investigación está bien realizada. Cabe la posibilidad, como se ha dado el caso para otros fenómenos biológicos, que esta hidrólisis sea única a la fresa, o a plantas estrechamente relacionadas con ella.

En el caso del AIA-Leu y hasta donde pudimos investigar no hay determinaciones de este conjugado en CTV. Sin embargo, si ha sido determinado en diferentes tejidos de la planta; por ejemplo, su determinación en cotiledones de 10 días, hojas de 10 y 17 días y raíces de 10 días de *A. thaliana*, mostró niveles muy similares a los obtenidos en este trabajo (Kowalczyk and Sandberg, 2001), mientras que en un sistema embriogénico de *C. canephora* AIA-Leu presento niveles de menos de 5 pmol g⁻¹ PF durante el pretratamiento de las plantas antes de usar sus hojas para la inducción de la ES y también estuvo presente durante las tres semanas posteriores a la inducción de la ES (Méndez-Hernández *et al.*, 2021).

En este sentido será necesario profundizar en la determinación de los diferentes conjugados del AIA a lo largo del ciclo de cultivo e incluir a los conjugados con glucosa y mio-inositol.

Las citocininas endógenas también juegan un papel clave en el crecimiento y desarrollo de los tejidos vegetales. Normalmente existen diferencias notables respecto a los tipos de citocininas presentes en las diferentes especies vegetales y al igual que en el caso de las auxinas, conocer el contenido dentro de los tejidos proporciona información respecto al estado en el que se encuentra, además de ser una forma de caracterización bioquímica y molecular (Márquez-López *et al.*, 2019; Sakakibara, 2010).

De la misma manera que con las auxinas, en el presente trabajo se cuantificaron, mediante

la técnica de HPLC, tres tipos diferentes de citocininas, *tZ*, *iP* y *BA*. La *tZ* alcanzó valores que van desde los 1,000 hasta más de 5,200 pmol g⁻¹ PS. Este contenido de *tZ* es notablemente superior al determinado en callo embriogénico de *Cocos nucifera*, en los cuales el contenido de *tZ* no superó los 10 pmol g⁻¹ PS (Sáenz *et al.*, 2010); también son superiores al contenido reportado en *M. arborea* en los que los niveles determinados se encontraron en el rango de los 30 y 235 pmol g⁻¹ PS dentro de los primeros dos meses de crecimiento de callos embriogénico (Pintos *et al.*, 2002). En tanto que los valores del contenido de *tZ* de esta tesis son muy similares a los determinados en callos caulogénicos de kiwi (*Actidinia deliciosa*). En este último reporte también se indica que el contenido de zeatina es mucho menor si los callos no tienen capacidad organogénica (Centeno *et al.*, 2003).

En *T. aestivum* la cuantificación de citocininas, después de cuatro meses de cultivo, mostró que sus niveles van desde los 20 hasta los 140 ng g⁻¹ PS (Jiménez and Bangerth, 2001b), Sin embargo, en estos reportes se incluyeron tanto el contenido de ribósido de zeatina como el de zeatina en la misma cantidad y sin indicar cual zeatina se estaba midiendo. También fue desafortunado este hecho porque no se puede convertir la cantidad a molaridad y poder comparar los datos con otros de la literatura. En el caso de *A. sativum* a las seis semanas después de la inducción de los callos los niveles endógenos de *tZ* llegaron a niveles de 160 pg PS⁻¹ (Mostafa *et al.*, 2020). Claramente, el contenido de *tZ* depende de la especie y de las condiciones de cultivo y su contenido varía desde los 10 hasta los 5,000 pmol⁻¹ PS.

El contenido de *iP* y *BA* en los tejidos ha sido menos estudiado. En los pocos que hay también se ve una gran variación en el contenido de estas dos citocininas. En el caso que reportamos en esta tesis los niveles de la *iP* presentaron un patrón respecto a sus cantidades durante todos los puntos de muestreo del ciclo de crecimiento, abarcando entre los rangos de 250 y 350 pmol g⁻¹ PS. En el caso de los niveles endógenos de *BA*, con la excepción de los días 3 y 39 en el que el contenido de *BA* determinado es muy bajo, en todos los demás días, si bien se ve una variación, ésta no es estadísticamente significativa. Los contenidos reportados para este RCV son muy variables, por ejemplo, en *V. vinífera* los niveles de *iP* llegaron los 35 ng g⁻¹ PS en cultivos resembrados que se mantuvieron hasta dos años (Jiménez and Bangerth, 2000).

La gran variación en el contenido de RCV reportada en la literatura puede tener diferentes orígenes. Desde luego la especie estudiada es uno muy importante, el origen del explante del que se obtiene el callo, si el callo tiene capacidad caulogénica o no, el momento del

muestreo, o el subcultivo en el que se lleva a cabo, De ahí la importancia del cuidado que debe darse al diseño experimental y a la pregunta que se desea contestar.

Otro aspecto importante de la determinación de RCV en los callos es el uso que tendrán los callos. En nuestro caso, los callos servirán para generar suspensiones celulares en las cuales se desea inducir la ES. Conocer cuál es el comportamiento de las células y sus contenidos endógenos de RCV son vitales para el resultado final. Por ejemplo, recientemente se ha determinado en *Cinnamomum camphora* que la relación AIA/Z es máxima en callos embriogénicos y en la inducción de la ES (Guo *et al.*, 2024) en tanto que los valores absolutos fueron más elevados en los callos no embriogénicos.

Otro aspecto que apenas se acaba de iniciar su exploración, es el hecho de que, si bien las auxinas son vitales para la inducción del proceso embriogénico, es su relación con otros RCV, como el ácido abscísico, las estringolactonas y el ácido giberélico lo que determina la acción fisiológica. Este hecho se conoce desde el descubrimiento de las citocininas hace 70 años cuando el grupo de Miller reportó que la relación auxina citocinina controla la formación de raíces o de brotes, dependiendo si es mayor o menor a uno, respectivamente (Skoog and Miller, 1957). Recientemente, Otiende *et al.*, (2021) han mostrado que al aumentar la relación auxina/citocinina en la base del tallo de *Rosa hybrida* contribuye a formar un gradiente acropetal positivo y con ello a un aumento en la capacidad de enraizamiento de esquejes de tallo.

Daucus carota

Como se mencionó, la zanahoria ha sido un modelo muy importante en el desarrollo de la técnica del cultivo de tejidos vegetales (Thorpe, 2012). Ha servido como modelo de estudio para la inducción de callos, embriones somáticos, efecto del medio de cultivo, y estudios bioquímicos y moleculares.

Los cultivos de *D. carota* a partir de tubérculos establecidos en este estudio, junto con los desarrollados a partir de diferentes tipos de explante en nuestro laboratorio, serán la base de diversos estudios bioquímicos y moleculares que se llevarán a cabo en el curso del año 2025. Como puede apreciarse en la figura 4.2 los callos se forman a partir de las células del cambium vascular. El callo crece de forma vigorosa y puede ser utilizado para la obtención de las suspensiones celulares.

En la figura 4.4 se puede apreciar con claridad que las suspensiones celulares crecen muy bien. Por ello también agotan los nutrientes del medio de cultivo con rapidez y para el día

15 ya llegaron a fase estacionaria. Como los nutrientes del medio de cultivo ya se agotaron, las células empiezan a morir y por ello el peso fresco decae, la conductividad aumenta drásticamente al lisarse las células y verter su contenido en el medio de cultivo y el pH disminuye de manera importante. Por ello, es importante que para el mantenimiento de estos cultivos no se les deje llegar a estas condiciones de falta de nutrientes, ya que el cultivo se perderá. Los datos obtenidos en este estudio indican que las suspensiones celulares deberán sembrarse en el día 12 del ciclo de cultivo con el fin de mantener un cultivo saludable.

En el caso de los cambios observados en el pH son los esperados hasta el día 15. Se sabe que el pH disminuye inicialmente, porque las células toman el amonio del medio de cultivo por medio de un antiport con iones hidrógeno, lo que provoca una disminución en el pH del medio de cultivo. Una vez que las células han tomado el amonio, inician la toma del nitrógeno, también por un antiport con iones hidroxilo, lo que provoca que el pH del medio ahora se alcalinice (Martin *et al.*, 1977; Moreno-Valenzuela *et al.*, 1999).

La disminución en la conductividad hasta el día 15 también está dentro de lo esperado, ya que, al ir disminuyendo los componentes del medio de cultivo, particularmente el nitrato, la conductividad disminuye (Hahlbrock *et al.*, 1974; Kwok *et al.*, 1992).

CAPÍTULO VI

Conclusiones

- ✓ Las auxinas y citocininas forman parte de un amplio catálogo de procesos pertenecientes al desarrollo vegetal. El papel que tienen estos compuestos ha sido ampliamente estudiado teniendo como variación principal el modelo vegetal empleado y en el género *Coffea*, específicamente en la especie *C. arabica* no es la excepción.
- ✓ La cinética de crecimiento en tejidos vegetales ha sido una herramienta clave para el estudio del comportamiento de los cultivos en un determinado periodo de tiempo. Si bien existen muchos estudios respecto al crecimiento y desarrollo en tejidos vegetales, la variación que existe entre cada especie es un punto importante para considerar. En este caso, en la cinética de crecimiento hubo 4 fases detectadas más una fase en desarrollo dentro de los 42 días determinados para este trabajo.
- ✓ Como estudios complementarios, se determinaron parámetros específicos de crecimiento que determinaron el tiempo exacto en el que el cultivo se desarrolla. Se encontró que los tiempos de duplicación y velocidad de crecimiento basados en peso fresco de *C. arabica* fueron de 22.399 y 0.0309 respectivamente.
- ✓ En el análisis de las auxinas con HPLC, el AIA y su conjugado AIA-Leu presentaron los más altos niveles endógenos durante los primeros 10 días del muestreo del ciclo de crecimiento, mientras que el conjugados AIA-Asp se manifestó de manera más constante entre los días intermedios y finales del muestreo. El AIA-Ala mantuvo poca presencia en los puntos evaluados.
- ✓ En el caso de las citocininas evaluadas, el contenido endógeno se manifestó en tres valores de magnitud diferente. Para tZ los niveles cuantificados fueron los más elevados (arriba de los 1000 pmol g⁻¹ ps), mientras que en iP los valores se manifestaron de manera intermedia a la tZ (entre los 250 y 350 pmol g⁻¹ ps) y finalmente, el BA fue el compuesto con menores niveles endógenos registrados (entre los 10 y 65 pmol g⁻¹ ps).

- ✓ Se establecieron cultivos sanos y con un crecimiento vigoroso tanto de callos como de suspensiones celulares a partir de tubérculos de zanahoria.

Perspectivas

- ✓ Realizar un análisis mediante microscopia para determinar el estado celular de los cultivos a lo largo del ciclo de crecimiento. Esto será muy importante como antecedente para la inducción de la embriogénesis somática en ambas especies.
- ✓ Completar el análisis del contenido endógeno de reguladores del crecimiento y sus conjugados. Esto es particularmente importante para auxinas y citocininas.

BIBLIOGRAFÍA

- Acuña JR y de Pena M. 1991. Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. caturra. *Plant Cell Reports* 10, 345-348.
- Aga E y Khillare Y. 2017. *In vitro* multiplication of *Coffea arabica* L. from leaf explants through indirect somatic embryogenesis. *International Journal of Botany Studies* 2, 17-22.
- Aguilar ME, Ortiz JL, Mesén F, Jiménez LD y Altmann F. 2018. Cafe arabica *Coffea arabica* L. In: Jain SM, Gupta P, eds. *Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants: Volume II*. Cham, Switzerland: Springer, 39-62.
- Aitchison PA, Macleod AJ y Yeoman MM. 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: Street HE, ed. *Plant Tissue and Cell Culture*. Berkeley and Los Angeles: University of California Press, 267-306.
- Aloni R. 1980. Role of auxin and sucrose in the differentiation of sieve and tracheary elements in plant tissue cultures. *Planta* 150, 255-263.
- Archambault J, Lavoie L, Williams RD y Chavarie C. 1995. Nutritional aspects of *Daucus carota* somatic embryo cultures performed in bioreactors. In: Terzi M, Cella R, Falavigna A, eds. *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, vol 22. Dordrecht: Springer, 681-687.
- Ashraf MY, Azhar N y Hussain M. 2006. Indole acetic acid (IAA) induced changes in growth, relative water contents and gas exchange attributes of barley (*Hordeum vulgare* L.) grown under water stress conditions. *Plant Growth Regulation* 50, 85.
- Avila-Victor CM, Ordaz-Chaparro VM, Arjona-Suárez ED, Iracheta-Donjuan L, Gómez-Merino FC y Robledo-Paz A. 2023. *In vitro* mass propagation of coffee plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through indirect somatic embryogenesis. *Plants* 12, 1237.
- Bartel B y Fink GR. 1995. ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-

acetic acid from conjugates. *Science* 268, 1745-1748.

- Bartos PMC, Gomes HT, Gomes SM, Vasconcelos Filho SC, Teixeira JB y Scherwinski-Pereira JE. 2018. Histology of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *Biologia* 73, 1255-1265.
- Bayliss MW. 1977. The effects of 2,4-D on growth and mitosis in suspension cultures of *Daucus carota*. *Plant Science Letters* 8, 99-103.
- Bidabadi SS y Jain SM. 2020. Cellular, molecular, and physiological aspects of *in vitro* plant regeneration. *Plants* 9, 702.
- Binte-Mostafiz S y Wagiran A. 2018. Efficient callus induction and regeneration in selected indica rice. *Agronomy* 8, 77.
- Blakeslee JJ, Spatola Rossi T y Kriechbaumer V. 2019. Auxin biosynthesis: spatial regulation and adaptation to stress. *Journal of Experimental Botany* 70, 5041-5049.
- Blakesley D, Weston GD y Hall JF. 1991. The role of endogenous auxin in root initiation. Part I: Evidence from studies on auxin application, and analysis of endogenous levels. *Plant Growth Regulation* 10, 341-353.
- Bradley PM, El-Fiki F y Giles KL. 1984. Polyamines and arginine affect somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Science Letters* 34, 397-401.
- Cai T, Daly B y Butler L. 1987. Callus induction and plant regeneration from shoot portions of mature embryos of high tannin sorghums. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 9, 245-252.
- Caplin SM y Steward FC. 1948. Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science* 108, 655-657.
- Carvalho CHS, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W y Paiva E. 1997. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Reports* 17, 73-76.
- Centeno ML, Rodríguez A, Feito I, Sánchez-Tamés R y Fernández B. 2003. Uptake and metabolism of *N*⁶-benzyladenine and 1-naphthaleneacetic acid and dynamics of

indole-3-acetic acid and cytokinins in two callus lines of *Actinidia deliciosa* differing in growth and shoot organogenesis. *Physiologia Plantarum* 118, 579-588.

- Chaiwanon J, Wang W, Zhu JY, Oh E y Wang ZY. 2016. Information integration and communication in plant growth regulation. *Cell* 164, 1257-1268.
- Chung W, Pedersen H y Chin C-K. 1992. Enhanced somatic embryo production by conditioned media in cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Biotechnology Letters* 14, 837-840.
- Davies RT, Goetz DH, Lasswell J, Anderson MN y Bartel B. 1999. IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *The Plant Cell* 11, 365-376.
- Davis AP, Gole TW, Baena S y Moat J. 2012. The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. *PLoS ONE* 7, e47981.
- De Vries SC, Booij H, Janssens R, Vogels R, Saris L, LoSchiavo F, Terzi M y Van Kammen A. 1988. Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes & Development* 2, 462-476.
- Downie SR, Katz-Downie DS y Spalik K. 2000a. A phylogeny of Apiaceae tribe Scandiceae: evidence from nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacer sequences. *American Journal of Botany* 87, 76-95.
- Downie SR, Katz-Downie DS y Watson MF. 2000b. A phylogeny of the flowering plant family Apiaceae based on chloroplast DNA rpl16 and rpoC1 intron sequences: towards a suprageneric classification of subfamily Apioideae. *American Journal of Botany* 87, 273-292.
- Downie SR, Watson MF, Spalik K y Katz-Downie DS. 2000c. Molecular systematics of Old World Apioideae (Apiaceae): relationships among some members of tribe Peucedaneae sensu lato, the placement of several island-endemic species, and resolution within the apioid superclade. *Canadian Journal of Botany* 78, 506-528.
- Efferth T. 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering* 5,

50-59.

- EL Sabagh A, Islam MS, Hossain A, Iqbal MA, Mubeen M, Waleed M, Reginato M, Battaglia M, Ahmed S y Rehman A. 2022. Phytohormones as growth regulators during abiotic stress tolerance in plants. *Frontiers in Agronomy* 4, 1-16.
- Etienne H, Breton D, Breitler JC, Bertrand B, Déchamp E, Awada R, Marraccini P, Lérans S, Alpizar E, Campa C, Courtel P, Georget F y Ducos J-P. 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.
- Fehér A. 2019. Callus, dedifferentiation, totipotency, somatic embryogenesis: What these terms mean in the era of molecular plant biology? *Frontiers in Plant Science* 10, 536.
- Feirer RP, Mignon G y Litvay JD. 1984. Arginine decarboxylase and polyamines required for embryogenesis in the wild carrot *Daucus carota*. *Science* 223, 1433-1435.
- Ferreira T, Shuler J, Guimardes R y Farah A. 2019. Introduction to coffee plant and genetics. In: Farah A, ed. *Coffee: Production, Quality and Chemistry*. Croydon, UK: The Royal Society of Chemistry, 3-25.
- Fujimura T. 2014. Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? *Plant Biotechnology Reports* 8, 23-28.
- Galaz-Ávalos RM, Aguilar-Díaz S, Xool-González PA, Huchín-May SMM y Loyola-Vargas VM. 2012. Callus, suspension culture, and hairy roots. Induction, maintenance and characterization. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 877. Heidelberg: Humana Press, 29-40.
- Gaspar T, Kevers C, Penel C, Greppin H, Reid DM y Thorpe TA. 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In vitro cellular & developmental biology-plant* 32, 272-289.

- Gautheret RJ. 1939. Sur la possibilité de réaliser la culture infinie des tissus de tubercules de carotte. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* 208, 118-120.
- Gibbs JL y Dougall DK. 1965. The growth of single cells from *Nicotiana tobacum* callus tissue in nutrient medium containing agar. *Experimental cell research* 40, 85-95.
- Gomes GLB y Scortecci KC. 2021. Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology* 23, 894-904.
- Greco B, Tanzarella OA, Carrozzo G y Blanco A. 1984. Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science Letters* 36, 73-77.
- Grzebelus D, Baranski R, Spalik K, Allender C y Simon PW. 2011. *Daucus*. In: Kole C, ed. *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Vegetables*. Berlin, Heidelberg: Springer, 91-113.
- Guo F, Zhang H, Liu W, Hu X, Han N, Qian Q, Xu L y Bian H. 2018. Callus initiation from root explants employs different strategies in rice and *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* 59, 1782-1789.
- Guo G y Jeong BR. 2021. Explant, medium, and plant growth regulator (PGR) affect induction and proliferation of callus in *Abies koreana*. *Forests* 12, 1388.
- Guo H, Kang X, Yuan M, Wu R y Du L. 2024. Relationship between somatic embryogenesis and endogenous hormones of *Cinnamomum camphora* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 156, 53.
- Guzzo F, Baldan B, Mariani P, LoSchiavo F y Terzi M. 1994. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. *Journal of Experimental Botany* 45, 1427-1432.
- Haberlandt G. 1902. Kulturversuche mit isolierten pflanzenzellen. *Sber. Akad. Wiss. Wein* 111, 69-92.
- Hahlbrock K, Ebel J y Oaks A. 1974. Determination of specific growth stages of plant

cell suspension cultures by monitoring conductivity changes in the medium. *Planta* 118, 75-84.

- Halperin W. 1964. Morphogenetic studies with partially synchronized cultures of carrot embryos. *Science* 146, 408-409.
- Hammes UZ, Murphy AS y Schwechheimer C. 2022. Auxin transporters - A biochemical view. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 14, a039875.
- Hangarter RP, Peterson MD y Good NE. 1980. Biological activities of indoleacetyl amino acids and their use as auxins in tissue culture. *Plant Physiology* 65, 761-767.
- Herman EB y Haas GJ. 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience* 10, 588-589.
- Holme IB y Petersen KK. 1996. Callus induction and plant regeneration from different explant types of *Miscanthus x ogiformis* Honda 'Giganteus'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 45, 43-52.
- Huang WL, Lee CH y Chen YR. 2012. Levels of endogenous abscisic acid and indole-3-acetic acid influence shoot organogenesis in callus cultures of rice subjected to osmotic stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108, 257-263.
- Ikeuchi M, Favero DS, Sakamoto Y, Iwase A, Coleman D, Rymen B y Sugimoto K. 2019. Molecular mechanisms of plant regeneration. *Annual Review of Plant Biology* 70, 377-406.
- Ikeuchi M, Sugimoto K y Iwase A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25, 3159-3173.
- Iorizzo M, Ellison S, Senalik D, Zeng P, Satapoomin P, Huang J, Bowman M, Iovene M, Sanseverino W, Cavagnaro P, Yildiz M, Macko-Podgorni A, Moranska E, Grzebelus E, Grzebelus D, Ashrafi H, Zheng Z, Cheng S, Spooner D, van Deynze A y Simon P. 2016. A high-quality carrot genome assembly provides new insights into carotenoid accumulation and asterid genome evolution. *Nature Genetics* 48, 657-666.

- Irvani N, Solouki M, Omid M, Zare AR y Shahnazi SJPC. 2010. Callus induction and plant regeneration in *Doreum ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. *Plant cell, tissue and organ culture* 100, 293-299.
- Jeffs RA y Northcote DH. 1966. Experimental induction of vascular tissue in an undifferentiated plant callus. *Biochemical Journal* 101, 146.
- Jiménez VM y Bangerth F. 2000. Relationship between endogenous hormone levels of grapevine callus cultures and their morphogenetic behaviour. *Vitis* 39, 151-157.
- Jiménez VM y Bangerth F. 2001a. Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiologia Plantarum* 111, 389-395.
- Jiménez VM y Bangerth F. 2001b. Endogenous hormone levels in initial explants and in embryogenic and nonembryogenic callus cultures of competent and non-competent wheat genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 67, 37-46.
- Jin J, Essemine J, Duan J, Xie Q, Zhu J y Cai W. 2020. Regeneration of active endogenous IAA in rice calli following acclimation to 2,4-D free medium. *Plant Growth Regulation* 93, 203-220.
- Jones LH. 1974. Long-term survival of embryoids of carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Science Letters* 2, 221-224.
- Kamada H y Harada H. 1979. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. *Z. Pflanzenphysiol* 91, 255-266.
- Kamada H y Harada H. 1984. Changes in endogenous amino acid compositions during somatic embryogenesis in *Daucus carota* L. *Plant and Cell Physiology* 25, 27-38.
- Kato H y Takeuchi M. 1963. Morphogenesis *in vitro* starting from single cells of carrot root. *Plant and Cell Physiology* 4, 243-245.
- Kawochar MA, Ahmed NU, Hossain MI y Ferdois J. 2017. Role of explants and NAA

on callus induction of potato (*Solanum tuberosum*). American journal of life sciences 5, 140-144.

- Kepczynska E y Orłowska A. 2021. Profiles of endogenous ABA, bioactive GAs, IAA and their metabolites in *Medicago truncatula* Gaertn. non-embryogenic and embryogenic tissues during induction phase in relation to somatic embryo formation. *Planta* 253, 67.
- Keutgen AJ, Tomaszewska-Sowa M, Bomberski A y Keutgen N. 2022. The Influence of phytohormones on the efficiency of callus formation, its morphologically properties and content of bioactive compounds in *in vitro* cultures of *Daucus carota* L. *Horticulturae* 8, 100.
- Khan N, Bano A, Ali S y Babar MA. 2020. Crosstalk amongst phytohormones from planta and PGPR under biotic and abiotic stresses. *Plant Growth Regulation* 90, 189-203.
- Kieber JJ y Schaller GE. 2014. Cytokinins. *The Arabidopsis Book* 12, e0168.
- Kieber JJ y Schaller GE. 2018. Cytokinin signaling in plant development. *Development* 145, dev149344.
- Kielkowska A, Adamus A y Baranski R. 2014. An improved protocol for carrot haploid and doubled haploid plant production using induced parthenogenesis and ovule excision *in vitro*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 50, 376-383.
- Klimek-Chodacka M, Oleszkiewicz T y Baranski R. 2019. Visual assay for gene editing using a CRISPR/Cas9 system in carrot cells. In: Qi Y, ed. *Plant genome editing with CRISPR systems: Methods and protocols*. New York: Springer, 203-215.
- Klimek-Chodacka M, Oleszkiewicz T, Lowder LG, Qi Y y Baranski R. 2018. Efficient CRISPR/Cas9-based genome editing in carrot cells. *Plant Cell Reports* 37, 575-586.
- Kowalczyk M y Sandberg G. 2001. Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127, 1845-1853.
- Kruglova N, Zinatullina A y Yegorova N. 2023. Histological approach to the study of

morphogenesis in callus cultures *in vitro*: A review. *International Journal of Plant Biology* 14, 533-545.

- Kumar V, Madhava Naidu M y Ravishankar GA. 2006. Developments in coffee biotechnology - *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87, 49-65.
- Kurosaki F, Kaburaki H y Nishi A. 1993. Synthesis and degradation of cyclic AMP in cultured carrot cells treated with forskolin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 177-179.
- Kurosaki F y Nishi A. 1993. Stimulation of calcium influx and calcium cascade by cyclic AMP in cultured carrot cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 302, 144-151.
- Kwok KH, Tsoulpha P y Doran PM. 1992. Limitations associated with conductivity measurement for monitoring growth in plant tissue culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 29, 93-99.
- Landey RB, Cenci A, Georget F, Bertrand B, Camayo G, Dechamp E, Herrera JC, Santoni S, Lashermes P, Simpson J y Etienne H. 2013. High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PLoS ONE* 8, e56372.
- LeClere S, Tellez R, Rampey RA, Matsuda SPT y Bartel B. 2002. Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 277, 20446-20452.
- Lee S, Park YS, Rhee JH, Chu H, Frost JM y Choi Y. 2024. Insights into plant regeneration: cellular pathways and DNA methylation dynamics. *Plant Cell Reports* 43, 120.
- Linsmaier-Bednar EM y Skoog F. 1966. Thiamine requirement in relation to cytokinin in "normal" and "mutant" strains of tobacco callus. *Planta* 72, 146-154.
- Long Y, Yang Y, Pan G y Shen Y. 2022. New insights into tissue culture plant-

regeneration mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 13, 926752.

- Loyola-Vargas VM y Ochoa-Alejo N. 2018. An introduction to plant tissue culture: Advances and perspectives. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Plant Cell Culture Protocols*. New York, NY: Springer New York, 3-13.
- Loyola-Vargas VM y Ochoa-Alejo N. 2024. An introduction to plant cell, tissue, and organ culture: Current status and perspectives. In: Loyola-Vargas V, Ochoa-Alejo N, eds. *Plant Cell Culture Protocols*. New York: Springer, 1-13.
- Ma Q, Groner P y Robert S. 2018. Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. *Journal of Experimental Botany* 69, 313-328.
- Machakova I, Zazimalová E y George EF. 2008. Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: George EF, Hall MA, Klerk GJD, eds. *Plant Propagation by Tissue Culture*. Netherlands: Springer, 175-204.
- Magnus V, Hangarter RP y Good NE. 1992. Interaction of free indole-3-acetic acid and its amino acid conjugates in tomato hypocotyl cultures. *Journal of Plant Growth Regulation* 11, 67-75.
- Manna F, Massardo DR, Wolf K, Luccarini G, Carlomagno MS, Rivelini F, Alifano P y Del Giudice L. 1995. A tRNA gene mapping within the chloroplast rDNA cluster is differentially expressed during the development of *Daucus carota*. In: Terzi M, Cella R, Falavigna A, eds. *Proceedings of the VIIth international congress on plant tissue and cell culture*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 309-314.
- Márquez-López RE, Quintana-Escobar AO y Loyola-Vargas VM. 2019. Cytokinins, the Cinderella of plant growth regulators. *Phytochemistry Reviews* 18, 1387-1408.
- Martin SM, Rose D y Hui V. 1977. Growth of plant cell suspension cultures with ammonium as the sole source of nitrogen. *Canadian Journal of Botany* 55, 2838-2843.
- Mashayekhi K y Neumann KH. 2006. Effects of boron on somatic embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 84, 279-283.

- Matsuda F, Miyazawa H, Wakasa K y Miyagawa H. 2005. Quantification of indole-3-acetic acid and amino acid conjugates in rice by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. *Biosci. Bio/Technology. Biochem* 69, 778-783.
- Melese YY y Kolech SA. 2021. Coffee (*Coffea arabica* L.): Methods, objectives, and future strategies of breeding in Ethiopia. *Sustainability* 13, 10814.
- Méndez-Hernández HA, Galaz-Ávalos RM, Quintana-Escobar AO, Pech-Hoil R, Collí-Rodríguez AM, Salas-Peraza IQ y Loyola-Vargas VM. 2023. *In vitro* conversion of *Coffea* spp. somatic embryos in SETIS™ bioreactor system. *Plants* 12, 3055.
- Méndez-Hernández HA, Ledezma-Rodríguez M, Avilez-Montalvo RN, Juárez-Gómez YL, Skeete A, Avilez-Montalvo J, De-la-Peña C y Loyola-Vargas VM. 2019. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 10, 77.
- Méndez-Hernández HA, Quintana-Escobar AO, Uc-Chuc MÁ y Loyola-Vargas VM. 2021. Genome-wide analysis, modeling, and identification of amino acid binding motifs suggest the involvement of *GH3* genes during somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. *Plants* 10, 2034.
- Mengoli M, Bagni N, Luccarini G, Nuti RV y Serafini-Fracassini D. 1989. *Daucus carota* cell cultures: polyamines and effect of polyamine biosynthesis inhibitors in the preembryogenic phase and different embryo stages. *Journal of Plant Physiology* 134, 389-394.
- Moreno-Valenzuela O, Coello-Coello J, Loyola-Vargas VM y Vázquez-Flota F. 1999. Nutrient consumption and alkaloid accumulation in a hairy root line of *Catharanthus roseus*. *Biotechnology Letters* 21, 1017-1021.
- Mostafa HHA, Wang H, Song J y Li X. 2020. Effects of genotypes and explants on garlic callus production and endogenous hormones. *Scientific Reports* 10, 4867.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.

- Nag KK y Street HE. 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cell. *Nature* 245, 270-272.
- Neumann K-H, Kumar A y Imani J. 2020. Callus Cultures. In: Neumann K-H, Kumar A, Imani J, eds. *Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology: Basics and Application*. Cham: Springer, 25-59.
- Newcomb W y Wetherell DF. 1970. The effects of 2, 4, 6-trichlorophenoxyacetic acid on embryogenesis in wild carrot tissue cultures. *Botanical Gazette* 131, 242-245.
- Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, De-la-Peña C, Alcazar Magana A, Wrobel K y Loyola-Vargas VM. 2015. Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. *PLoS ONE* 10, e0126414.
- Nobécourt P. 1938. Sur les proliférations spontanées de fragments de tubercules de carotte et leur culture sur milieu synthétique. *Bulletin de la Société Botanique de France* 85, 182-187.
- Nobécourt P. 1939. Sur la pérennité et l'augmentation de volume des cultures de tissus végétaux. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 130, 1270-1271.
- Otiende MA, Fricke K, Nyabundi JO, Ngamau K, Hajirezaei MR y Druege U. 2021. Involvement of the auxin-cytokinin homeostasis in adventitious root formation of rose cuttings as affected by their nodal position in the stock plant. *Planta* 254, 65.
- Palmgren G, Mattsson O y Okkels FT. 1991. Specific levels of DNA methylation in various tissues, cell lines, and cell types of *Daucus carota*. *Plant Physiology* 95, 174-178.
- Pan Y, Li L, Xiao S, Chen Z, Sarsaiya S, Zhang S, ShangGuan Y, Liu H y Xu D. 2020. Callus growth kinetics and accumulation of secondary metabolites of *Bletilla striata* Rchb.f. using a callus suspension culture. *PLoS ONE* 15, e0220084.
- Pence VC y Caruso JL. 1984. Effects of IAA and four IAA conjugates on morphogenesis and callus growth from tomato leaf discs. *Plant Cell, Tissue and*

Organ Culture 3, 101-110.

- Phillips GC y Garda M. 2019. Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 55, 242-257.
- Phillips GC y Luteyn KJ. 1983. Effects of picloram and other auxins on onion tissue cultures. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 108, 948-953.
- Pintos B, Martín JP, Centeno ML, Villalobos N, Guerra H y Martín L. 2002. Endogenous cytokinin levels in embryogenic and non-embryogenic calli of *Medicago arborea* L. *Plant Science* 163, 955-960.
- Plunkett GM, Pimenov MG, Reduron JP, Kljuykov EV, van Wyk BE, Ostroumova TA, Henwood MJ, Tilney PM, Spalik K, Watson MF, Lee BY, Pu FD, Webb CJ, Hart JM, Mitchell AD y Muckensturm B. 2018. Apiaceae. In: Kadereit JW, Bittrich V, eds. *Flowering Plants. Eudicots: Apiales, Gentianales (except Rubiaceae)*. Cham: Springer, 9-206.
- Quintana-Escobar AO, Galaz-Ávalos RM, Elizalde-Contreras JM, Reyes-Soria FA, Aguilar-Hernández V, Ruíz-May E y Loyola-Vargas VM. 2021. Differences in the abundance of auxin homeostasis proteins suggest their central roles for *in vitro* tissue differentiation in *Coffea arabica*. *Plants* 10, 2607.
- Quiroz-Figueroa FR, Méndez-Zeel M, Larqué-Saavedra A y Loyola-Vargas VM. 2001. Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports* 20, 679-684.
- Rademacher W. 2015. Plant growth regulators: backgrounds and uses in plant production. *Journal of Plant Growth Regulation* 34, 845-872.
- Rajasekaran K, Hein MB, Davis GC y Vasil IK. 1987. Endogenous growth regulators in leaves and tissue cultures of *Pennisetum purpureum* Schum. *Journal of Plant Physiology* 130, 13-25.
- Rani G, Virk GS y Nagpal A. 2003. Callus induction and plantlet regeneration in *Withania somnifera* (L.) Dunal. *In vitro cellular & developmental biology-plant* 39,

468-474.

- Reinert J. 1959. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta* 53, 318-333.
- Reinert J, Tazawa M y Semenoff S. 1967. Nitrogen compounds as factors of the embryogenesis *in vitro*. *Nature* 216, 1215-1216.
- Remotti PC y Löffler HJM. 1995. Callus induction and plant regeneration from gladiolus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 42, 171-178.
- Ribnicky DM, Ilic N, Cohen JD y Cooke TJ. 1996. The effects of exogenous auxins on endogenous indole-3-acetic acid metabolism. The implications for carrot somatic embryogenesis. *Plant Physiology* 112, 549-558.
- Sáenz L, Azpeitia A, Oropeza C, Jones L, Fuchsova K, Spichal L y Strnad M. 2010. Endogenous cytokinins in *Cocos nucifera* L. *in vitro* cultures obtained from plumular explants. *Plant Cell Reports* 29, 1227-1234.
- Sakakibara H. 2005. Cytokinin biosynthesis and regulation. In: Litwack G, ed. *Vitamins & Hormones*
- *Plant Hormones: Academic Press, 271-287.*
- Sakakibara H. 2010. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ, ed. *Plant Hormones*. Netherlands: Springer, 95-114.
- Sakakibara H. 2021. Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. *The Plant Journal* 105, 421-430.
- Seitz U. 1980. Transcription and processing of rRNA in higher plant cells (*Daucus carota*, *Petroselinum crispum*, *Acer pseudoplatanus*). *Plant Systematics and Evolution* 134, 11-21.
- Setiaji A, Annisa RR, Rumiayati R y Semiarti E. 2020. Induction and growth kinetics callus of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Journal of Biology & Biology Education* 12, 35-41.

- Shibukawa T, Yazawa K, Kikuchi A y Kamada H. 2009. Possible involvement of DNA methylation on expression regulation of carrot LEC1 gene in its 5'-upstream region. *Gene* 437, 22-31.
- Shin J y Seo PJ. 2018. Varying auxin levels induce distinct pluripotent states in callus cells. *Frontiers in Plant Science* 9, 1653.
- Silva de Almeida JA. 2020. Observations on somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. In: Toledo Castanheira D, ed. *Coffee - Production and Research*. Rijeka, Croatia: IntechOpen, 1-20.
- Simon PW. 2019a. Classical and molecular carrot breeding. In: Simon P, Iorizzo M, Grzebelus D, Baranski R, eds. *The Carrot Genome*. Cham: Springer, 137-147.
- Simon PW. 2019b. Economic and academic importance. In: Simon P, Iorizzo M, Grzebelus D, Baranski R, eds. *The Carrot Genome*. Cham: Springer, 1-8.
- Skoog F y Miller CO. 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 11, 118-131.
- Small CC y Degenhardt D. 2018. Plant growth regulators for enhancing revegetation success in reclamation: A review. *Ecological engineering* 118, 43-51.
- Söndahl MR, Nakamura T y Sharp WR. 1985. Propagation of coffee. *Basic Life Sciences* 32, 215-232.
- Söndahl MR y Sharp WR. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol* 81, 395-408.
- Sosnowski J, Truba M y Vasileva V. 2023. The impact of auxin and cytokinin on the growth and development of selected crops. *Agriculture* 13, 724.
- Spooner DM. 2019. *Daucus*: Taxonomy, phylogeny, distribution. In: Simon P, Iorizzo M, Grzebelus D, Baranski R, eds. *The Carrot Genome*. Cham: Springer, 9-26.
- Staritsky G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Botanica Neerlandica* 19, 509-514.

- Stehsel ML y Caplin SM. 1969. Sugars: autoclaving vs sterile filtration on the growth of carrot root tissue in culture. *Life Sciences* 8, 1255-1259.
- Steward FC, Israel HW, Mott RL, Wilson HJ y Krikoriam AD. 1975. Observations on growth and morphogenesis in cultured cells of carrot (*Daucus carota* L.). *Proc. R. Soc. Lond. B* 273, 33-53.
- Steward FC, Mapes MO y Mears K. 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany* 45, 705-708.
- Sugiyama M. 2015. Historical review of research on plant cell dedifferentiation. *Journal of Plant Research* 128, 349-359.
- Sung ZR y Okimoto R. 1981. Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78, 3683-3687.
- Suzich JA, Dean JFD y Herrmann KM. 1985. 3-Deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate synthase from carrot root (*Daucus carota*) is a hysteretic enzyme. *Plant Physiology* 79, 765-770.
- Tan S, Luschnig C y Friml J. 2021. Pho-view of auxin: Reversible protein phosphorylation in auxin biosynthesis, transport and signaling. *Molecular Plant* 14, 151-165.
- Tang Q, Yu P, Tillmann M, Cohen JD y Slovin JP. 2019. Indole-3-acetylaspartate and indole-3-acetylglutamate, the IAA-amide conjugates in the diploid strawberry achene, are hydrolyzed in growing seedlings. *Planta* 249, 1073-1085.
- Tazawa M y Reinert J. 1969. Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. *Protoplasma* 68, 157-173.
- Thorpe T. 2012. History of plant tissue culture. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Plant Tissue Culture Protocols*. Heidelberg: Humana Press, 9-27.
- Tianran L y Neumann KH. 1985. Embryogenesis and endogenous hormone content

of cell cultures of some carrot varieties (*Daucus carota* L.). *Berichte der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 98, 227-235.

- Troxler RF y Hamilton RH. 1965. The metabolism of indole-3-acetic acid by geranium stem callus cultures. *Plant Physiology* 40, 400.
- Vallejos-Torres G, Arévalo LA, Ríos O, Cerna A y Marín C. 2020. Propagation of rust-tolerant *Coffea arabica* L. plants by sprout rooting in microtunnels. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*.
- Van Boxtel J y Berthouly M. 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 der Vossen H, Bertrand B y Charrier A. 2015. Next generation variety development for sustainable production of arabica coffee (*Coffea arabica* L.): a review. *Euphytica* 204, 243-256.
- White PR. 1939. Potentially unlimited growth of excised plant callus in an artificial nutrient. *American Journal of Botany* 26, 59-64.
- Wiggans SC. 1954. Growth and organ formation in callus tissues derived from *Daucus carota*. *American Journal of Botany* 41, 321-326.
- Yamada R, Nakagawa H y Sinot Y. 1967a. Studies on the differentiation in cultured cells. I. Embryogenesis in three strains of *Solanum* callus. *The Botanical Magazine, Tokio* 80, 68-74.
- Yamada Y, Tanaka K y Takahashi E. 1967b. Callus induction in rice, *Oryza sativa* L. *Proceedings of the Japan Academy* 43, 156-160.
- Yasuda T, Fujii Y y Yamaguchi T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology* 26, 595-597.
- Yeoman MM y Aitchison PA. 1973. Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: Street HE, ed. *Plant Tissue and Cell Culture*. Botanical Monographs Vol. 11. Oxford: Blackmell, 240-268.

- Yu Z, Zhang F, Friml J y Ding Z. 2022. Auxin signaling: Research advances over the past 30 years. *Journal of Integrative Plant Biology* 64, 371-392.
- Zhai N y Xu L. 2021. Pluripotency acquisition in the middle cell layer of callus is required for organ regeneration. *Nature Plants* 7, 1453-1460.
- Zhou YX, Magill JM, Magill CW y Newton RJ. 1996. DNA methylation and Dc8-GUS transgene expression in carrot (*Daucus carota* L). *Plant Cell Reports* 15, 815-818.

ANEXOS

Anexo: Tabla 1. Componentes de las sales MS (Murashige & Skoog).

Compuesto	Formula	Concentración mg/L
Cloruro de calcio	CaCl ₂ H ₂ O	440 mg
Nitrato de potasio	KNO ₃	1900 mg
Nitrato de amonio	NH ₄ NO ₃	1650 mg
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	170 mg
Ácido bórico	H ₃ BO ₃	6.25 mg
Molibdato de sodio	Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.025 mg
Sulfato de magnesio	MgSO ₄ 4H ₂ O	370 mg
Sulfato de manganeso	MnSO ₄ 4H ₂ O	15.6 mg
Sulfato cúprico	CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025 mg
Sulfato de zinc	ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6 mg
Sodio EDTA	Na ₂ EDTA	37.3 mg
Sulfato ferroso	FeSO ₄ 7H ₂ O	27.8 mg

Anexo: Tabla 2. Componentes del medio de inducción de callos (MIC) de *C. arabica*.

Componente	Cantidad	Concentración/L
Sales MS	----	4.33 g
Tiamina-HCl	29.6 µM	10 mg
Mio-inositol	550 µM	100 mg
L-cisteína	210 µM	25 mg
2,4-D	4.5 µM	1 mg
Kinetina	9.2 µM	2 mg
Sacarosa	87.7 µM	30 g
Gel-Rite	---	2.8 g

Nota: El medio de mantenimiento de callos (MMC) tiene el mismo contenido de vitaminas y reguladores, cambiando solamente el contenido de las sales MS (1/2 fuerza iónica).

Anexo: Tabla 3. Soluciones y Solventes para la extracción y purificación de auxinas y citocininas.

Soluciones	Componentes	Cantidad
Solución HTB	HTB – Metanol	30 mg – 3 ml
Solvente de extracción	Metanol – Agua – Acido fórmico	15:4:1 v/v/v
Solvente de carga SPE	Ácido fórmico – Agua	1 molar (diluir con el agua hasta 100 ml)
Solvente de elución SPE 1	Metanol (100%)	20 ml
Solvente de elución SPE 2	Hidróxido de amonio – metanol – Agua	250 µL – 7 ml – 2.75 ml (Solución final 10 ml)

Nota 1: Los solventes se preparan acorde al número de muestras que se tienen para evaluar.

Nota 2: La solución HTB y el solvente de elución SPE 2 se preparan al momento (en fresco).

Anexo: Tabla 4. Soluciones para la cuantificación de auxinas y citocininas mediante HPLC.

Fase móvil	Componentes	Cantidad
Solución Auxinas	Acetonitrilo – Agua (Ácido acético 0.5%)	6:4 v/v
Solución Citocininas		7:3 v/v

