Ciencia y Tecnología
Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación
CICY

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO PROTEÓMICO DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PRESENCIA DE DIFERENTES FUENTES DE NITRÓGENO EN *Coffea canephora*

Tesis que presenta

Pedro Alejandro Teodoro Quiam Hernández

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Biología Inetgrativa)

Mérida, Yucatán, México

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 Pedro Alejandro Teodoro Quiam Hernández titulado **Estudio proteómico durante la inducción de la embriogénesis somática en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno en *Coffea canephora*** , fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, en la línea de investigación de Biología Celular y del Desarrollo, en el laboratorio número 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

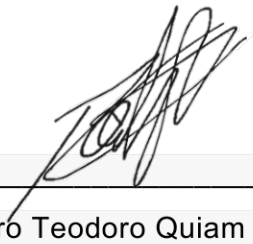
_____

Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 20 de mayo 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: _____

Pedro Alejandro Teodoro Quiam Hernández

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de **Bioquímica y Biología Molecular de Plantas,** del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., y forma parte del proyecto titulado **Estudio de las proteínas secretadas al medio de cultivo durante la inducción de la embriogénesis somática en presencia de diferentes fuentes de nitrógeno en *Coffea canephora*,** bajo la dirección del **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.**

AGRADECIMIENTOS

Al **Centro de Investigación Científica de Yucatán** por darme la oportunidad de seguir estudiando, a la **Secretaría de Ciencias, Humanidades, Tecnología e Innovación** por el poyo en la beca otorgada.

Al **Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas**, por abrirme las puertas de su laboratorio, brindarme la invaluable oportunidad de seguir aprendiendo de la ciencia. Gracias por ser un ejemplo constante de pasión y en busqueda de la curiosidad en la ciencia. Por mantener siempre una postura firme y coherente incluso frente a la crítica y por confiar que el bien común es una meta posible. Su guía y visión fueron fundamentales en este camino.

A la **Dra. Rosa María Galaz Ávalos**, por su generosidad al compartir su conosimiento, por ser buena enseñadora de los procesos del laboratorio, mostrando siempre esa motivación para trabajar y su capacidad de encontrar siemore un camino cuando las circunstancias se complicaban. Gracias por su calidez, por cuidarnos como equipi y por ver por nuestro bienestar. Siempre agradecido a usted.

A mi comité tutoral por sus comentarios y consejos en la realización de esta tesis, al comite de revisión de tesis, por sus contribuciones al revisar el documento.

A mi padre, **Claudiano Quiam Dzib**, fuiste quien más me apoyo en mi sin si quiera dudar ni cuestionar una vez, aun en mis locuras de estudio fuiste un gran sustento en mi. Siempre estas en mis recuerdos y en cada logro que alcance.

A la **Dra, Ana Odetth Quinatan Escobar**, y la **Dra. Evelyn Arlette Carrillo Bermejo**, con quien forme una gran amistad que nació entre los laboratrios y pasillos de trabajo, decidimos escucharnos y apoyarnos siempre. Fueron de gran apoyo en momentos más bajos de mi vida. Gracias por compartir café, platicas, conejos, postres, reuniones, consejos y muy buena amistad. No pierdan su muchosidad. Son una gran inspiración para mí en la ciencia. Gracias.

A mis amigos del laboratorio 24, **Dr. Hugo A. Méndez Hernández, Ing. Monserrat Hernández Solis, M.C. Laura Fuentes Vázquez, Ing. Valeria Vargas Morales, Ing. Marina Hernández Chacón**, gracias por las risas y cada dulce compartido, en momentos de locura y complicidad. Aun en medio del caos tratamos de ayudarnos entre nostros y ser nosotros.

DEDICATORIAS

A los corazones rotos,

que aun con todo el dolor decidieron dar un paso más.

Índice

Contenido

Abreviaturas i

Resumen 1

Abstract 1

Introducción 1

CAPÍTULO I 4

Antecedentes 4

1. Café: Generalidades 4

1.1 Embriogénesis somática 7

1.2. Embriogénesis somática en café 9

1.3. Nitrógeno 13

1.4. Nitrógeno en el cultivo de las plantas 14

1.5. Metabolismo nitrogenado 15

1.6. Secreción de moléculas en medios de cultivos y su posible efecto en la ES 17

Justificación 19

Objetivos 26

Objetivo general 26

Objetivos específicos 26

Estrategia experimental 27

CAPÍTULO II 29

Materiales y Métodos 29

2.1. Introducción 29

2.1. Material vegetal 30

2.2.1. Inducción de la embriogénesis somática 30

2.2.2. Cosecha y liofilización del medio de cultivo 31

2.2.3. Resuspensión del medio liofilizado 32
2.2.4. Precipitación de proteínas por el método del fenol 32
2.2.5. Cuantificación de proteínas 32
2.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) 33
2.2.7. Tinción de los geles con azul de Coomassie 33
2.2.8. Digitalización de los geles 34
2.2.9. Reducción de las proteínas, alquilación y digestión 34
2.2.10 Corrida y análisis de las muestras de los tejidos 35
CAPÍTULO III 37
Resultados 37
3.1. Efecto de la fuente de nitrógeno en la inducción de la embriogénesis somática 37
3.2. Cuantificación de embriones en los diferentes tratamientos 37
3.3. Cuantificación de proteína por el método de Peterson 39
3.4. Determinación de proteínas después de la alquilación de las proteínas 41
3.5. Geles de primera dimensión 43
3.6. Proteómica de los tejidos. 44
CAPÍTULO IV 53
Discusión 53
CAPÍTULO V 57
5.1. Conclusiones 57
5.2. Perspectivas 57
BIBLIOGRAFÍA 59

Índice de figuras

Figura 1.1. Figura 1. Ilustración que muestra una planta de café, su flor, la hoja, y la baya de la planta, así como las etapas de su desarrollo en la producción del café. Ilustración estilo por Gottlieb von Koch, Heinrich Jung y Friedrich Quentell, 1964 en Dusseldorf, Alemania. Producido por la marca Oskar H. Hagemann. 5

Figura 1.2. Proceso de embriogénesis somática *in vitro*. Imagen tomada de Alchimia Grow Shop. 8

Figura 1.3. La embriogénesis somática en *Coffea canephora* implica el preacondicionamiento de las plántulas durante catorce días en un medio MS suplementado con ácido naftalén acético y kinetina (A). Se emplearon explantes foliares circulares para la inducción de la embriogénesis somática (B). Explantes en el medio de inducción (C). Seguimiento del proceso de inducción de la embriogénesis somática (D). Figura tomada de Hernández-Castellanos et al. (2022). 10

Figura 1.4. El ciclo del nitrógeno en la naturaleza. 13

Figura 1.6. Modelo de secreción de moléculas al medio de cultivo en la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*. 19

Figura 1.7. Efecto de las proteínas secretadas purificadas a partir de un medio de cultivo de embriones de tipo silvestre en el desarrollo de embriones *ts11* a la temperatura no permisiva de 32 °C. (A) Embrión globular aberrante en un cultivo de embriones *ts11* de 4 semanas de edad; barra = 180 µm. (B) Embriones globulares y en estadio de corazón en un cultivo de embriones de 4 semanas de edad al que se habían añadido 0.1 ng mL^{-1} medio de cultivo de cada una de las glucoproteínas de 32 y 35 kD; barra = 200 µm. (C) Embrión globular en un cultivo de embriones de 14 días de edad al que se añadieron 0.1 ng de glucoproteína pura de 35 kD por mililitro de medio de cultivo; barra = 180 µm. (D) Embrión globular en un cultivo de embriones de 14 días al que se añadieron 0.1 ng mL^{-1} de medio de cultivo de glucoproteína pura de 32 kD; barra = 180 µm. Figura tomada de De Jong et al (1992). . 21

Figura 1.8. Izquierda. Patrones electroforéticos de las proteínas presentes en el medio de cultivo de *C. canephora* después de 14 días en condiciones no embriogénicas. Derecha. Patrones electroforéticos de las proteínas presentes en el medio de cultivo de *C. arabica* después de 14 días en condiciones no embriogénicas. Fotografías tomadas de Mukul-López et al. (2012). 25

Figura 1.9. Diagrama general de estrategia experimental primera parte. 27

Figura 1.10. Diagrama general de estrategia experimental segunda parte. 27

Figura 3.1. Efecto del cambio en la relación de nitrógeno oxidado/nitrógeno reducido en la inducción de la embriogénesis somática. 38

Figura 3.2. Conteo de embriones de los cinco tratamientos al día 56 después de la inducción de la embriogénesis somática. 39

Figura 3.4. Promedios de la cuantificación por el método de Peterson para el día 56 40
Figura 3.5. Promedios de la primera cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 28 después del tratamiento de alquilación de las muestras. 41
Figura 3.6. Promedios de la primera cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 56 después del tratamiento de alquilación de las muestras. 42
Figura 3.7. Promedios de la segunda cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 28 después de la resuspensión de las muestras en bicarbonato de amonio. 42
Figura 3.8. Promedios de la segunda cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 56 después de la resuspensión de las muestras en bicarbonato de amonio. 43
Figura 3.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas alquiladas y reducidas de los cinco tratamientos (A-E) del día 28 después de la inducción de la embriogénesis somática. MM = marcadores moleculares. Este gel se realizó en el INECOL en el grupo del Dr. Eliel Ruíz-May de las muestras listas para ser inyectadas en el espectrómetro de masas. 44
Figura 3.10. Proteínas de las rutas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en las plantas. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 45
Figura 3.11. Enzimas involucradas en la asimilación primaria del amonio. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 46
Figura 3.12. Enzimas involucradas en la asimilación primaria del nitrato. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 47
Figura 3.13. Enzimas involucradas en el ciclo de la urea. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 47
Figura 3.14. Enzimas involucradas en la degradación de los aminoácidos. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 48
Figura 3.15. Biosíntesis de carbohidratos. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 49
Figura 3.16. Biosíntesis de la estructura celular. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 49
Figura 3.17. Biosíntesis de reguladores metabólicos. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC. 50
Figura 3.18. Mapa de calor de las enzimas del metabolismo nitrogenado primario. 51

Índice de tablas

Tabla 2.1. Relaciones de nitrato y amonio para los diferentes tratamientos. 30

Tabla 2.2. Stocks para la preparación del medio Yasuda modificado.....31

Abreviaturas

CLC	Canales de cloro
EP1	Proteínas extracelulares tipo 1
EP2	Proteínas extracelulares tipo 2
EP3	Proteínas extracelulares tipo 3
ES	Embriogénesis somática
ESD	Embriogénesis somática directa
ESI	Embriogénesis somática indirecta
GDH	Glutamato deshidrogenasa
GlcNac	Acetil-D-glucosamina
Gln	Glutamina
Glu	Glutamato
GLP	Proteínas germinales
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamina sintetasa
N	Nitrógeno
NH_3^-	Amoníaco
NH_4^+	Amonio
NO	Óxido nítrico
NO_3^-	Nitrato
N_2O	Óxido nitroso
NO_2	Dióxido de nitrógeno
NiR	Nitrito reductasa
NR	Nitrato reductasa
NRT2	Transportadores de nitrato
OH	Hidroxilo

PIB	Producto interno bruto
RE	Retículo endoplásmico

Resumen

El cafeto es una planta que pertenece al género de la familia de las Rubiácea, de la cual se obtienen los granos de café para su consumo, por lo general en bebidas. Las especies de interés económico son *Coffea arabica* y *C. canephora*. Estas plantas, de vida perenne, requieren de 30 años para su mejoramiento genético, por lo que se está en búsqueda de métodos que permitan aplicar las técnicas tradicionales del mejoramiento genético, pero con un tiempo de respuesta mucho menor. La embriogénesis somática (ES) es una herramienta que reduce el tiempo en el cual se puede obtener una planta. Sin embargo, aún se desconocen una gran cantidad de factores que afectan este proceso, como la fuente de nitrógeno del medio de cultivo y el de las proteínas que son secretadas al medio de cultivo. En este estudio abordamos ambas preguntas desde el punto de vista proteómico. Determinamos que una relación 2:1 de las fuentes de nitrato/amonio es la más adecuada para que se lleve a cabo el proceso de ES en *C. canephora*. También determinamos que se producen grandes cambios en las cantidades de proteínas involucradas en las rutas que manejan el nitrógeno durante la inducción del proceso de ES en *C. canephora*. Nuestros datos sugieren un mecanismo para la asimilación del nitrógeno durante el proceso acondicionamiento e inducción de la ES.

Abstract

The coffee plant belongs to the Rubiaceae family, from which coffee beans are obtained for consumption, usually in beverages. The species of economic interest are *Coffea arabica* and *C. canephora*. These perennial plants require 30 years for their genetic improvement, so methods are being sought that allow the application of traditional genetic improvement techniques but with a much shorter response time. Somatic embryogenesis (SE) is a tool that reduces the time in which a plant can be obtained. However, many factors that affect this process are still unknown, such as the nitrogen source of the culture medium and that of the proteins secreted into the culture medium. In this study, we address both questions from a proteomic point of view. We determined that a 2:1 ratio of nitrate/ammonium sources is the most suitable for the SE process in *C. canephora*. We also determined that significant changes in the amounts of proteins involved in nitrogen-handling pathways occur during ES induction in *C. canephora*. Our data suggests a mechanism for nitrogen assimilation during ES conditioning and induction.

.

Introducción

El café es una de las bebidas más consumidas en el mundo. Esta bebida se ha disfrutado durante siglos, y su popularidad sigue creciendo. Una de las innovaciones más recientes en el café ha sido el desarrollo de un nuevo método de producción de la planta del cafeto conocido como embriogénesis somática (ES), este método permite a los científicos regenerar plantas a partir de células y tejidos aislados en un entorno controlado de laboratorio. Esta técnica tiene gran potencial para ayudar a combatir la inseguridad alimentaria en todo el mundo mediante el aumento de la producción de granos de café y otros cultivos a través de la fertilización *in vitro* de material vegetal intacto, en lugar de la reproducción asexual (por ejemplo: la polinización y la germinación). Así bien, los métodos utilizados en la ES no son nuevos, la eficiencia mejorada y la reproducibilidad del proceso han permitido a los investigadores acelerar y expandir la aplicación de esta tecnología. Hay varias ventajas al usar esta técnica para producir nuevas plantas de cafeto en comparación con los métodos tradicionales como el injerto o la germinación. En particular, la ES permite generar un gran número de plantas genéticamente idénticas en un corto período de tiempo. Además, permite a los investigadores utilizar material genético de diversas fuentes para producir plantas que exhiben características específicas, lo que no es posible cuando se utilizan métodos de mejoramiento convencionales. A pesar de estas ventajas, todavía existen algunas limitaciones asociadas con el uso de la ES para la regeneración de plantas.

El nitrógeno es un elemento importante que las plantas deben obtener para crecer. Este elemento se encuentra en forma gaseosa en el aire, y en forma combinada en el agua y el suelo. Las plantas utilizan el nitrógeno en estos elementos para crear proteínas, ADN y otros productos químicos importantes. Por lo que el nitrógeno juega un papel esencial en la salud de las plantas. Sin suficiente nitrógeno, las plantas no pueden crecer adecuadamente y, no pueden producir frutos y granos saludables. Se sabe que hay diferentes compuestos de nitrógeno que se encuentran en la naturaleza, pero son nitratos y amonio los principales derivados del nitrógeno que se encuentran en el suelo.

En el caso de los cultivos in vitro, en particular durante la morfogénesis y la diferenciación celular la fuente de nitrógeno juega un importante papel. Las relaciones entre las fuentes de nitrógeno es determinante en el proceso morfológico de las células cultivadas *in vitro* (Duarte-Aké et al., 2022).

Además, cuando la ES se lleva a cabo a partir de suspensiones celulares, las células secretan proteínas al medio de cultivo, y es posible que estas proteínas tengan funciones en el proceso morfogénico (Cordewener et al., 1991; De Vries et al., 1988; Lo Schiavo et al., 1990).

Las proteínas vegetales cumplen una amplia variedad de funciones y desempeñan un papel importante en los procesos biológicos. En el caso de la ES de zanahoria se ha visto que las proteínas secretadas al medio de cultivo participan en la inducción de la ES. Si bien este hecho se ha conocido por bastante tiempo, se desconoce la señal que se genera y desencadena el cambio en el programa genético que lleva a que una célula somática se convierta en una célula embriogénica. Con el estado actual de conocimiento sobre la fisiología de las plantas es posible especular que la concentración endógena de auxinas y citocininas cambia en respuesta a las diferentes fuentes de nitrógeno y este cambio desata la señal que cambia el programa genético, en el que podrían estar involucradas las proteínas que son secretadas al medio de cultivo.

CAPÍTULO I

Antecedentes

1. Café: Generalidades

El café es la segunda mercancía que más se comercializa en el mundo. Es un producto agrícola que es exportado por más de 50 países de África, Asia, América Latina y Oceanía. La Organización internacional del Café ha publicado que en el año 2024 se produjeron más de 178 millones de sacos de 60 kg de cafeto alrededor del mundo (ICO, 2025).

La bebida de café es el resultado de las semillas tostadas de plantas pertenecientes al género Coffea perteneciente a la familia Rubiaceae. Las plantas de café fueron descubiertas en África desde donde se le ha dispersado a todo el mundo (Ferreira et al., 2019).

Todas las especies de café son árboles o arbustos leñosos perennes (Figura 1.1). Las plantas de café difieren entre sí en diferentes aspectos como morfología, tamaño y adaptación ecológica. De las más de 124 especies que conforman el género Coffea (Davis et al., 2006; Davis et al., 2011), solo dos se utilizan para producir café comercialmente, *Coffea arabica* y *C. canephora*, que representan el 57.4% y el 42.6% de la producción mundial de café, respectivamente (ICO, 2025).

C. canephora (2n = 2x = 22) es una planta diploide, alógama, que forma poblaciones polimórficas de individuos fuertemente heterocigotos y con un elevado contenido de cafeína. *C. arabica* es una planta alotetraploide (2n = 4x = 44) derivada de una hibridación natural entre *C. canephora* (masculino) y *C. eugenioides* (femenino) (Anthony et al., 2002; Charrier & Berthaud, 1985; Lashermes et al., 1999). Arabica es una planta autógama y tiene un bajo contenido de cafeína, también es más susceptible a patógenos, en tanto que *C. canephora* tiene un mayor grado de resistencia a enfermedades y a diferentes tipos de estrés.

Figura 1.1. Figura 1. Ilustración que muestra una planta de café, su flor, la hoja, y la baya de la planta, así como las etapas de su desarrollo en la producción del café. Ilustración estilo por Gottlieb von Koch, Heinrich Jung y Friedrich Quentell, 1964 en Dusseldorf, Alemania. Producido por la marca Oskar H. Hagemann[1].

El crecimiento de la población mundial, la menor disponibilidad de tierra y agua para el cultivo de cosechas y la creciente deforestación son sólo algunos de los principales desafíos que enfrenta la agricultura moderna. La búsqueda de nuevas variedades resistentes a plagas y/o patógenos, las condiciones extremas del medio ambiente, así como el aumento de la productividad, son los desafíos que enfrenta el agrónomo de hoy.

La generación de una nueva variedad de café con características estables y mejoradas, mediante el mejoramiento convencional, demora alrededor de 30 años. Este es el tiempo que requiere de seis a siete ciclos de autopolinización, de semilla a semilla, mediante el mejoramiento convencional. La alternativa más viable para producir una nueva variedad de plantas con ciclos muy largos para su mejoramiento genético es la biotecnología. La biotecnología es una técnica más confiable para los cultivos perennes. Entre todas las herramientas biotecnológicas, la embriogénesis somática (ES) es la alternativa más prometedora.

C. canephora es un caso muy interesante en la agricultura moderna. Desde que se le empezó a cultivar para obtener sus granos para la bebida se le consideró de una calidad muy inferior a *C. arabica*, en particular por su alto contenido de cafeína y la calidad en

[1] https://www.etsy.com/mx/listing/1297192902/grafico-escolar-botanico-vintage-de-cafe

taza que produce la planta una vez que se encuentra frente al consumidor, esto había propiciado que su producción rondara el 20% de la producción total de café. Sin embargo, en los últimos cinco años ha experimentado un crecimiento que ha hecho que su producción se haya más que duplicado y su precio alcanzó el año pasado niveles récord en diciembre de 2024; la libra de *C. canephora* alcanzó el precio récord de 2.25 dólares por libra de café, un aumento de más del 125% comparado con su precio de enero de 2023. Este precio es el 75% cuando se le compara con el precio promedio de *C. arabica*. Esta diferencia en enero de 2023 era de más del 50% (ICO, 2025). Este cambio se debe a las grandes compañías que procesan café y lo venden encapsulado como café gourmet. *C. canephora* ahora ya no sólo se usa para la producción de café soluble, sino que se le mezcla con *C. arabica* cultivado alrededor del mundo.

C. canephora, también conocido como café robusta, es una planta originaria de África central y occidental que actualmente se cultiva en varios países. Es una planta de crecimiento rápido y resistente a diversas enfermedades y tipos de estrés. Crece a altitudes más bajas y en suelos más pobres que *C. arabica*. Contiene más cafeína que el café arabica, con un promedio del 2.7% en peso comparado con el 1.5% del café arabica (Gibson & Newsham, 2018).

La resiliencia del café Robusta también lo convierte en una mejor opción para los productores en regiones con climas más extremos o condiciones de crecimiento menos favorables. Sin embargo, vale la pena señalar que, si bien Robusta puede ser más fácil de cultivar en general, aún requiere condiciones específicas para producir granos de alta calidad. Al igual que con cualquier cultivo, factores como la calidad del suelo, la altitud, las fluctuaciones en la temperatura y los patrones de lluvia pueden afectar el producto final. Sin embargo, en general, "las plantas de café robusta son más resistentes y fáciles de cultivar que las plantas de café arábica (Anagbogu et al., 2021)”, lo que las convierte en una opción atractiva para aquellos productores que buscan una fuente confiable de granos de alta calidad que puedan soportar diferentes desafíos ambientales mientras producen sabores fuertes. Para su crecimiento, las plantas de Robusta requieren de una altitud de alrededor de los 800 m.s.n.m. (si bien puede crecer bien a nivel del mar), necesita un suelo rico y húmedo que absorba bien el agua y drene rápidamente el exceso de precipitaciones. Los mejores suelos son aquellos que están cubiertos por una pequeña capa de hojas, alguna otra materia orgánica y piedras de origen volcánico. Se le puede cultivar en regiones de climas fríos con temperaturas de que oscilan entre los 13 y 26 °C.

Las plantas de café Robusta muestran una importante variabilidad genética, debido a su forma de reproducción.

C. canephora ha estado ganando atención en la comunidad científica debido a sus beneficios potenciales para la salud (Santiago et al., 2025). Estudios recientes han sugerido que el consumo de *C. canephora* podría reducir el riesgo de varias enfermedades crónicas y mejorar la función cognitiva. Estos hallazgos están respaldados por una investigación realizada por Barrea et al. (2023), quienes informaron que "*Coffea canephora* tiene beneficios potenciales para la salud, como reducir el riesgo de ciertas enfermedades crónicas y mejorar la función cognitiva". Un posible mecanismo detrás de estos efectos es la cafeína, que está presente en grandes cantidades en las semillas de *C. canephora* y se ha demostrado que mejora el estado de alerta, el estado de ánimo y el rendimiento cognitivo (Higdon & Frei, 2006). Además, otros compuestos que se encuentran en *C. canephora* también pueden contribuir a sus efectos beneficiosos sobre la salud. Por ejemplo, el ácido clorogénico, un polifenol abundante en el café, exhibe propiedades antioxidantes y se ha relacionado con una reducción en los niveles de inflamación (Ludwig et al., 2014).

A pesar de su popularidad entre los entusiastas del café, la producción de Robusta en México ha enfrentado diferentes desafíos como los bajos precios y la competencia de otros cultivos. Sin embargo, los esfuerzos para mejorar la calidad a través de prácticas agrícolas sostenibles y el aumento de la demanda del mercado han llevado a un resurgimiento del interés en esta variedad. En general, *C. canephora* ha encontrado un hogar en el diverso paisaje agrícola de México y sigue siendo un importante contribuyente a la economía y el patrimonio cultural del país.

1.1 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática (ES) es un proceso fascinante que ha revolucionado la propagación de las plantas (Figura 1.2). Implica la regeneración de embriones de origen somático, capaces de producir plantas sanas y vigorosas, a partir de células somáticas, que luego se pueden utilizar para propagar plantas genéticamente idénticas. Esta técnica ha demostrado ser una forma eficiente y rápida de producir un gran número de plantas con fines comerciales. La ES se ha utilizado con éxito en más de 200 especies que abarcan prácticamente todo el rango de especies vegetales (Kalaipandian et al., 2021; Loyola-

Vargas et al., 2016; Loyola-Vargas & Ochoa-Alejo, 2016a, 2016b; Zdravkovic-Korac et al., 2023; Zhu et al., 2022). Sin embargo, todavía existen desafíos importantes para producir embriones somáticos en plantas como *Phaseolus vulgaris* y *Capsicum chinensis* (Pijeira-Fernández & Santana-Buzzy, 2024).

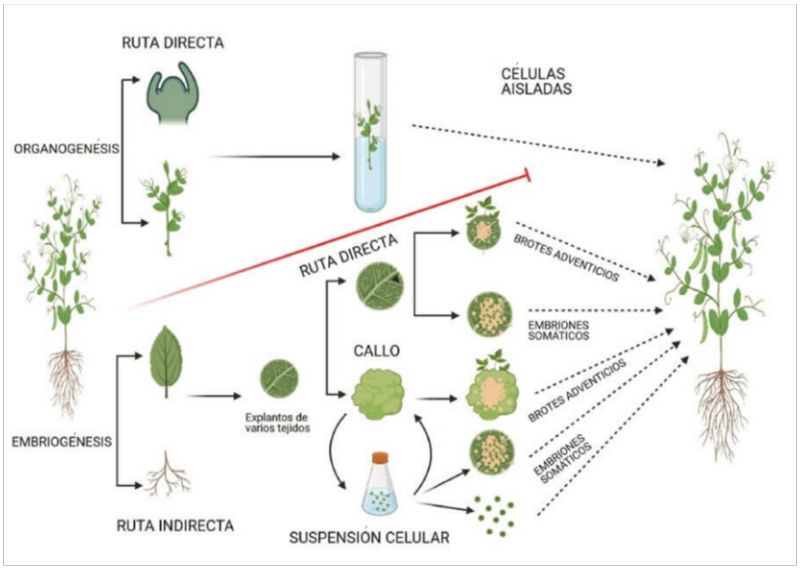


Figura 1.2. Proceso de embriogénesis somática *in vitro*. [2]Imagen tomada de Alchimia Grow Shop.

Al utilizar la ES se evita el método tradicional de reproducción sexual, eliminando la variabilidad genética y produciendo consistentemente plantas con rasgos deseables. La uniformidad genética garantiza la consistencia en las medidas de control de calidad, como la resistencia contra plagas y/o enfermedades (Mohanty & Ghosh, 1988). Además, esta técnica ofrece un enfoque más sostenible de la agricultura, ya que requiere menos espacio y recursos en comparación con los métodos convencionales. En conclusión, la ES proporciona una poderosa herramienta para la propagación de plantas que permite una rápida producción de plantas genéticamente homogéneas a gran escala al mismo tiempo que reduce los costos asociados con los métodos tradicionales. Su aplicación en la agricultura ha permitido aumentar la productividad a través de la producción constante de cultivos de alta calidad con los rasgos deseados y que diseñan para que las plantas se puedan desarrollar en diferentes entornos. El futuro parece prometedor a medida que más investigadores exploran su uso potencial en diferentes especies de cultivos a nivel mundial.

La ES es la vía de desarrollo celular en la que las células somáticas dan lugar a

[2]https://www.alchimiaweb.com/blog/micropropagacion-cannabis/

organizaciones que se asemejan a embriones cigóticos sin la mediación de la fusión de gametos, es decir, una estructura bipolar que no tiene conexión vascular con el tejido original (von Arnold et al., 2001). La ES es posible porque implícitamente cada célula del cuerpo vegetal tiene la capacidad de convertirse en un embrión (con capacidad totipotencial) a través de la manipulación de las condiciones del medio de cultivo y el uso de reguladores del crecimiento vegetal.

La ES se puede producir de dos maneras: de forma directa y de forma indirecta. Durante la embriogénesis somática directa (ESD), el embrión se forma directamente a partir de la célula madre, en tanto que en la embriogénesis somática indirecta (ESI) primero se forma un callo, a partir del cual se pueden formar embriones somáticos o el callo se convierte en suspensiones celulares en las cuales se producen los embriones somáticos (Quiroz-Figueroa, Rojas-Herrera, et al., 2006; Ramírez-Mosqueda, 2022)

1.2. Embriogénesis somática en café

Al estudiar la ES del café se han identificado diversos factores que afectan el desarrollo del proceso. Estos factores incluyen el tipo de explante utilizado, la composición del medio de cultivo, la presencia de reguladores del crecimiento de las plantas y la duración del período de cultivo (Awada et al., 2023). El cultivo *in vitro* del café se puede realizar de dos formas: micropropagación por microesquejes y la producción de embriones somáticos.

La propagación asexual del café por medio de cultivo de tejidos ha sido una técnica importante para su mejoramiento genético, esto debido a las diversas herramientas disponibles en la bioquímica y biotecnología de plantas para el desarrollo de nuevos métodos de selección, y propagación (De los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006; Loyola-Vargas et al., 2016). La ES se puede realizar a partir de explantes de la planta, o a partir de callos o suspensiones celulares. En el cafeto se han empleado todas las posibilidades para la obtención de embriones somáticos (Loyola-Vargas et al., 2016).

Los primeros informes de ES de *Coffea* spp. aparecieron a principios de los años 70 del siglo pasado. Los laboratorios de Staritsky (1970), Söndahl y Sharp (1977) publicaron los primeros trabajos sobre ES de *C. canephora* y *C. arabica*, respectivamente. Desde entonces, se han publicado numerosos trabajos sobre el tema (Loyola-Vargas et al.,

2016). La fuente de los explantes puede ser casi cualquier parte de la planta. Algunos de ellos poseen un potencial embriogénico superior. Las fuentes de explantes que se han utilizado son perisperma (Sreenath et al., 1995), brotes ortotrópicos y plagiotrópicos (Nassuth et al., 1980:Raghuramulu, 1987 #2114; Raghuramulu et al., 1987; Staritsky, 1970), tejido foliar (Avila-Victor et al., 2023; Candeira da Silva & Alves dos Santos, 2022a, 2022b; Cid et al., 2004; de Almeida et al., 2024; de Morais Oliveira et al., 2023; Dublin, 1981; Etienne et al., 2013; Ibrahim et al., 2024; Lokkamlue & Hongwiangchanand, 2023; Quiroz-Figueroa et al., 2002; Quiroz-Figueroa et al., 2001; Quiroz-Figueroa, Monforte-González, et al., 2006; Ramakrishna et al., 2012; Söndahl & Sharp, 1977; Tajedini et al., 2023; Yoas & Johannes, 2021) (Figura 1.3), y la cubierta externa de los óvulos (tegumento) (Lanaud, 1981). Hasta el momento, las hojas son la fuente de explantes más utilizada. Son abundantes y accesibles durante todo el año.

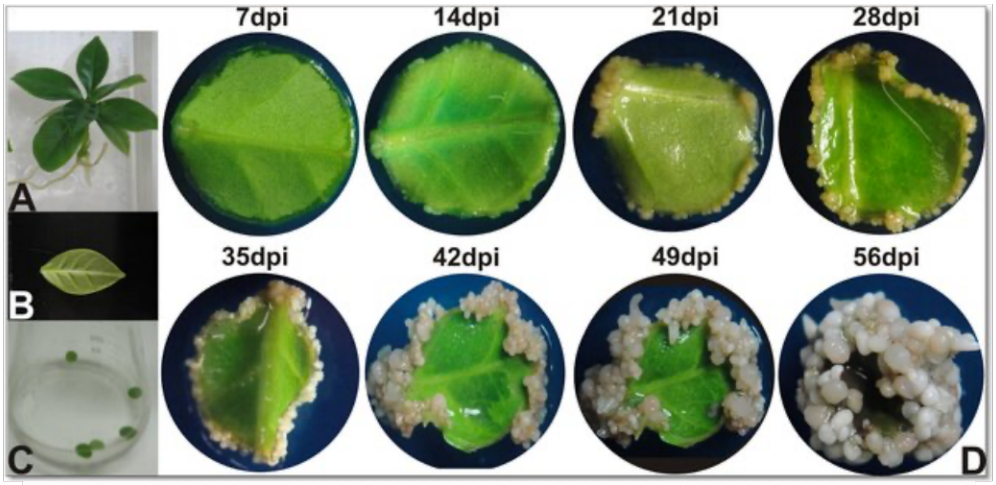


Figura 1.3. La embriogénesis somática en *Coffea canephora* implica el preacondicionamiento de las plántulas durante catorce días en un medio MS suplementado con ácido naftalén acético y kinetina (A). Se emplearon explantes foliares circulares para la inducción de la embriogénesis somática (B). Explantes en el medio de inducción (C). Seguimiento del proceso de inducción de la embriogénesis somática (D). Figura tomada de Hernández-Castellanos et al. (2022).

Algunas especies de café y otras que están muy relacionadas entre sí, pueden llegar a presentar algunas dificultades para la regeneración de tejido embriogénico de acuerdo con un protocolo de producción estándar. La dificultad en la regeneración puede tener más causas: adquisición de competencias, inducción y diferenciación, que a su vez pueden medirse de diferentes maneras y determinarse empíricamente. La generación de plántulas tanto por ESD como por la ESI es una oportunidad para lograr altos niveles de fidelidad genética, ya que permite seleccionar plantas deseables a menor tiempo en caso

de que estos presenten una replicación con buena uniformidad (Michaux-Ferrière et al., 1987a, 1987b; Nassuth et al., 1980; Söndahl, Salisbury, et al., 1979; Söndahl, Spahlinger, et al., 1979).

El medio de cultivo utilizado para la inducción de la ES en el café contiene una mezcla de auxinas y citocininas. Se ha demostrado que el uso de inhibidores de la síntesis y acción del etileno (Co^{2+} y Ag^{+}) afecta la ES del café, lo que sugiere un posible papel regulador del etileno en la ES de esta especie. La acción del $AgNO_3$ a su vez mejora la generación de embriones de cinco genotipos de *C. canephora*, mientras que las dosis elevadas tienen un efecto negativo. Además, la presencia de ácido salicílico añadido en suspensiones celulares de *C. arábica* tiene un efecto positivo en bajas concentraciones, ya que esto mejora la calidad y el número de embriones obtenidos. Por otro lado, el pretratamiento de las plantas de *C. canephora* con ácido naftalén acético y kinetina durante dos semanas hace que los explantes respondan a la ES, genera una respuesta embriogénica después de tres semanas de cultivo, acortando así satisfactoriamente el tiempo de cultivo (Quiroz-Figueroa, Monforte-González, et al., 2006). Se ha reportado que el uso de triacontanol (un alcohol primario de 30 carbonos) mejora la respuesta embriogénica en *C. canephora* y *C. arábica* en un rango de dos a cuatro meses. Además, los cultivos en los medios líquidos han demostrado ser altamente eficientes, porque estos mejoran la respuesta embriogénica, ya que pueden escalarse a sistemas de biorreactores y producir plantas con fines comerciales basadas en la micropropagación por ES. La formación de los embriones somáticos está influenciada por la densidad del inóculo en los sistemas de suspensiones celulares. De igual forma, se ha reportado la producción de 600,000 embriones por litro de medio de cultivo Ducos et al. (1993). Más tarde, mediante el uso de nuevas tecnologías, surgieron los sistemas de inmersión temporal, que resultaron benéficos para la multiplicación y germinación de embriones somáticos de diferentes especies. También se han generado protocolos para la germinación sincrónica de embriones de *C. arabica*, en los que la producción de embriones somáticos de alta calidad depende del genotipo, así como de la cantidad de inóculo utilizados y la frecuencia y tiempo de inmersión (Berthouly et al., 1995; Etienne et al., 1997; Santana-Buzzy et al., 2007).

En general, estos protocolos han permitido lograr una importante producción de cultivos en un tiempo menor y en un solo ciclo de cultivo, en comparación con otros métodos de micropropagación que requieren múltiples subcultivos, mucha manipulación y una mayor

cantidad de medio de cultivo, así como lugares de almacenamiento superiores en comparación con el número de plantas obtenidas en un litro de medio de cultivo (Méndez-Hernández & Loyola-Vargas, 2024).

Durante la inducción de ES en diferentes especies, se ha evidenciado que el genotipo juega un papel significativo. El género Coffea no es la excepción. *C. arabica* tiene cultivares embriogénicos y no embriogénicos (Michaux-Ferrière et al., 1989). Existe una relación entre la respuesta embriogénica de las progenies y sus progenitores ya que se ha determinado que el carácter de la capacidad embriogénica se fija en las primeras generaciones (F3 o F4) (Molina et al., 2002). La capacidad embriogénica entre genotipos de Coffea puede variar entre 4.8 y 72.7% (Molina et al., 2002).

Un aspecto importante para inducir la embriogénesis somática en diferentes variedades de una misma especie, es primordial utilizar diferentes medios y condiciones de cultivo. Puede ser que todas las variedades tengan capacidad embriogénica, pero que se requieran condiciones de cultivo diferentes. Por ejemplo, Bieysse et al. (1993) determinaron que el medio de Yasuda (1985) gelificado con gelrite fue el mejor para obtener ES de diferentes variedades de *C. arabica* en comparación con otros medios de cultivo.

Aponte (1993) también produjo con éxito tejidos proembriogénicos a partir de cinco genotipos de café utilizando dos medios diferentes. Uno de los medios fue el de las sales basales de Murashige y Skoog (1962) a la mitad de su concentración junto con los componentes orgánicos del medio B_5 (Gamborg et al., 1968), 30 g L^{-1} de sacarosa y 13,31 µM de BA, mientras que el otro medio fueron las sales basales del medio MS a un cuarto de su concentración, los componentes orgánicos del medio B_5, 30 g L^{-1} de sacarosa y 4.92 µM de 2 isopentenil adenina.

En ocasiones, utilizando el mismo protocolo se obtienen embriones somáticos en diferentes especies de Coffea. Por ejemplo, se puede inducir el crecimiento de callos a partir de explantes de hojas de *C. canephora*, *C. arabica* y los híbridos Congusta (*C. congensis* × *C. canephora*) y Arabusta (*C. arabica* × *C. canephora*) en un medio líquido que contiene las sales del medio MS con 4.5 µM de 2,4-D y una densidad de inóculo de 10 g L^{-1} y subcultivado cada 7 días (Van Boxtel & Berthouly, 1996); la eliminación del 2,4-D y la reducción de la densidad de inóculo a 1 g L^{-1} produjeron callos embriogénicos.

1.3. Nitrógeno

El nitrógeno (N) es un elemento químico con número atómico 7, lo que quiere decir que cada átomo de nitrógeno tiene en su núcleo 7 protones. Es representado con el símbolo de la letra N y este se encuentra en el grupo 15, período 2 de la Tabla Periódica, por lo que pertenece al grupo de los no metales. En la Tierra, a temperatura y presión estándar, dos átomos del elemento se unen para formar nitrógeno molecular, un gas incoloro, inodoro e insípido con la fórmula N_2 y que compone aproximadamente el 80% de la atmósfera de la Tierra.

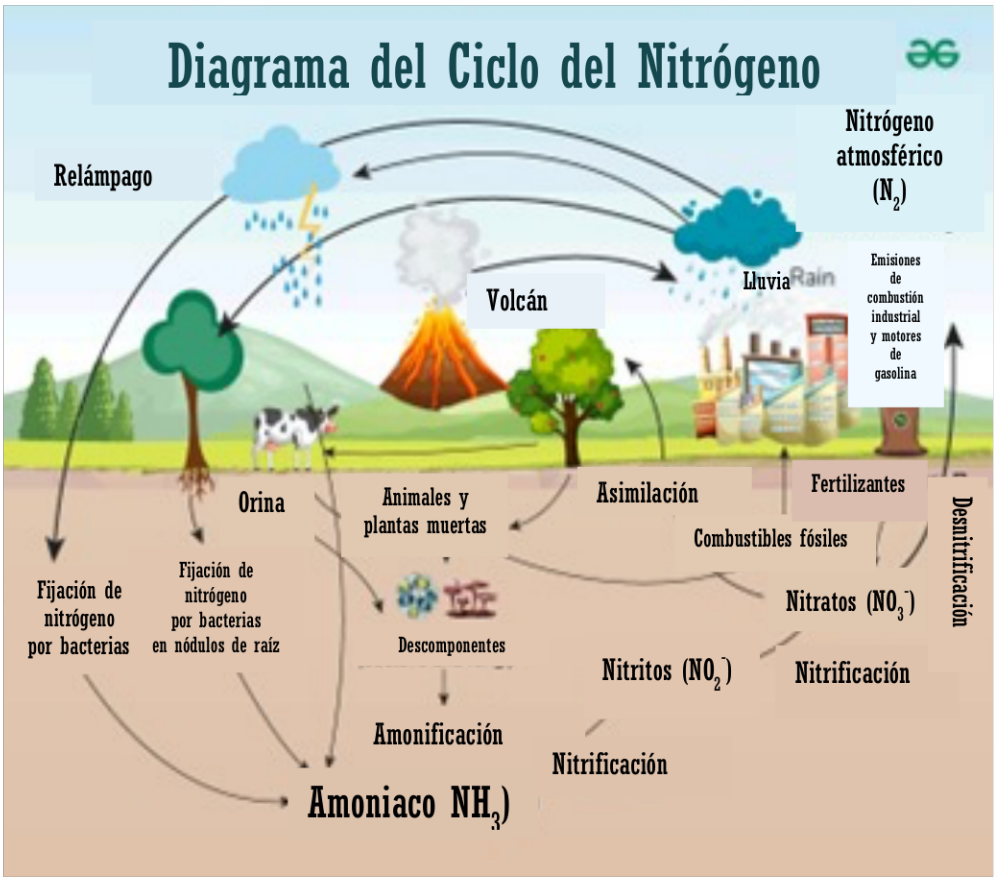


Figura 1.4. El ciclo del nitrógeno en la naturaleza[3].

El nitrógeno, en su estado elemental y en condiciones normales, está presente en la naturaleza como gas inerte que apenas reacciona con otros compuestos químicos. El nitrógeno es el mineral que más efecto tiene en el crecimiento de las plantas y, por lo

[3] https://www.geeksforgeeks.org/nitrogen-cycle-definition-and-stages/

tanto, la productividad primaria en el mayor de los casos de los ecosistemas. Su efecto en el aumento de las cosechas quedó ampliamente demostrado en el siglo XIX cuando se utilizaron fertilizantes nitrogenados en la agricultura. Por ello, actualmente es componente de un gran número de fertilizantes y productos agroquímicos (Johnson, 2022) . También es importante señalar que el N, al igual que los otros elementos presentes en los seres vivos en forma mayoritaria forma ciclos en la naturaleza (Figura 1.4).

1.4. Nitrógeno en el cultivo de las plantas

El nitrógeno es un elemento esencial que se requiere sustancialmente para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Debido a la importancia del nitrógeno, la fertilización de los suelos con él se ha utilizado ampliamente para lograr mejores rendimientos de los cultivos (Kumar et al., 2022). Así mismo, proteínas, ácidos nucleicos, clorofila y diversos metabolitos secundarios que son necesarios para el funcionamiento de las células requieren nitrógeno para su biosíntesis. Si bien el N está disponible como N_2 en la atmósfera, solo un pequeño grupo de organismos son capaces de utilizar el nitrógeno atmosférico como fuente de nitrógeno (Soumare et al., 2020). Estos organismos se pueden dividir en tres grupos, Bacteria, Archea y Cianobacteria. Algunos de ellos fijan nitrógeno como organismos de vida libre, en tanto que otros lo hacen formando simbiosis. En este último grupo tenemos a las bacterias del género *Rhizobium* cuyos miembros forman simbiosis con las leguminosas. Estos tres grupos de organismos son responsables para la fijación de más del 60% del nitrógeno que se fija anualmente (Soumare et al., 2020).

En la mayoría de las plantas la absorción del N ocurre principalmente a través de las raíces. Las principales fuentes de nitrógeno en el suelo para las plantas son el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+) (Kim & Sung, 2023). En suelos aireados, la principal fuente de N disponible es el NO_3^-. Sin embargo, el NH_4^+ puede ser más común en los suelos ácidos y en cultivos hidropónicos. Además, las plantas pueden absorber compuestos de N orgánicos de baja masa molecular del suelo, incluidos urea, aminoácidos y posiblemente dipéptidos y tripéptidos (Aloni, 2021; Carlsson et al., 2017; Duarte-Aké et al., 2022; Niedz & Evens, 2008). Antes de que el nitrógeno orgánico sea utilizado por las plantas es convertido en nitrógeno inorgánico en el suelo. Esta conversión está mediada por un grupo de bacterias durante el proceso de descomposición, que se conoce como

amonificación (Taria et al., 2022).

Además de la amonificación, la nitrificación y la desnitrificación son otros procesos de transformación del nitrógeno. La nitrificación es un proceso aeróbico en el que el amoníaco se convierte en nitritos (NO_2^-) y luego en nitratos; este proceso ocurre solo en presencia de oxígeno. Sin embargo, la desnitrificación es un proceso anaeróbico en el que los nitratos se convierten en nitrógeno gaseoso. La desnitrificación ocurre solo cuando no hay oxígeno disponible o cuando hay concentraciones extremadamente bajas de oxígeno y se sabe que es perjudicial para el sistema agrícola (Taria et al., 2022).

1.5. Metabolismo nitrogenado

El nitrato es a menudo la fuente de nutrientes preferida para los cultivos, pero depende en gran medida de las especies de cultivos y otras condiciones ambientales (Lasa et al., 2002). Sin embargo, hay otra plantas como el té (*Camellia sinensis*) que prefieren amonio como fuente de nitrógeno (Zhang et al., 2023). El metabolismo del nitrógeno involucra la captación, asimilación, translocación y almacenamiento de N (Figura 1.5) (Zhang et al., 2023). Los iones nitrato o amonio son absorbidos por las raíces y transportados a través de la planta a los tejidos que los necesitan (Wani et al., 2022).

Una vez dentro de la planta, el nitrógeno es utilizado para la síntesis de aminoácidos, que son los bloques para la construcción de las proteínas. Los aminoácidos también pueden ser utilizados para la síntesis de otros compuestos importantes, como la clorofila. Cuando la planta no necesita más nitrógeno, este se almacena en forma de compuestos nitrogenados como la asparagina y la glutamina. Estos compuestos pueden ser transportados a otras partes de la planta cuando sea necesario (Crawford, 1995; King et al., 1993).

La asimilación del nitrato consta de tres etapas: 1) absorción; 2) reducción del nitrato a amonio; 3) la incorporación del amonio en esqueletos carbonatos para la síntesis de aminoácidos, un proceso que recibe el nombre de asimilación del amonio (Figura 1.5).

El nitrato puede ser transportado dentro de la célula por los transportadores de nitrato 1 y 2 (Léran et al., 2014; Orsel et al., 2002). En caso de que haya un exceso del nitrato dentro de la célula, este puede ser almacenado en las vacuolas por medio de los transportadores de nitrato 2 (NRT2), y la transportadores de la familia de canales de cloro (De Angeli et

al., 2006) para así poder tener una homeostasis en el citosol. Ya en el citosol el NO_3^- es reducido a nitrito por la nitrato reductasa (NR) usando NAD(P)H (Lal et al., 2024) este nitrito es transportado al cloroplasto para luego ser reducido a NH_4^+ por la enzima nitrito reductasa que usa ferredoxina como donador de los electrones (Lal et al., 2024).

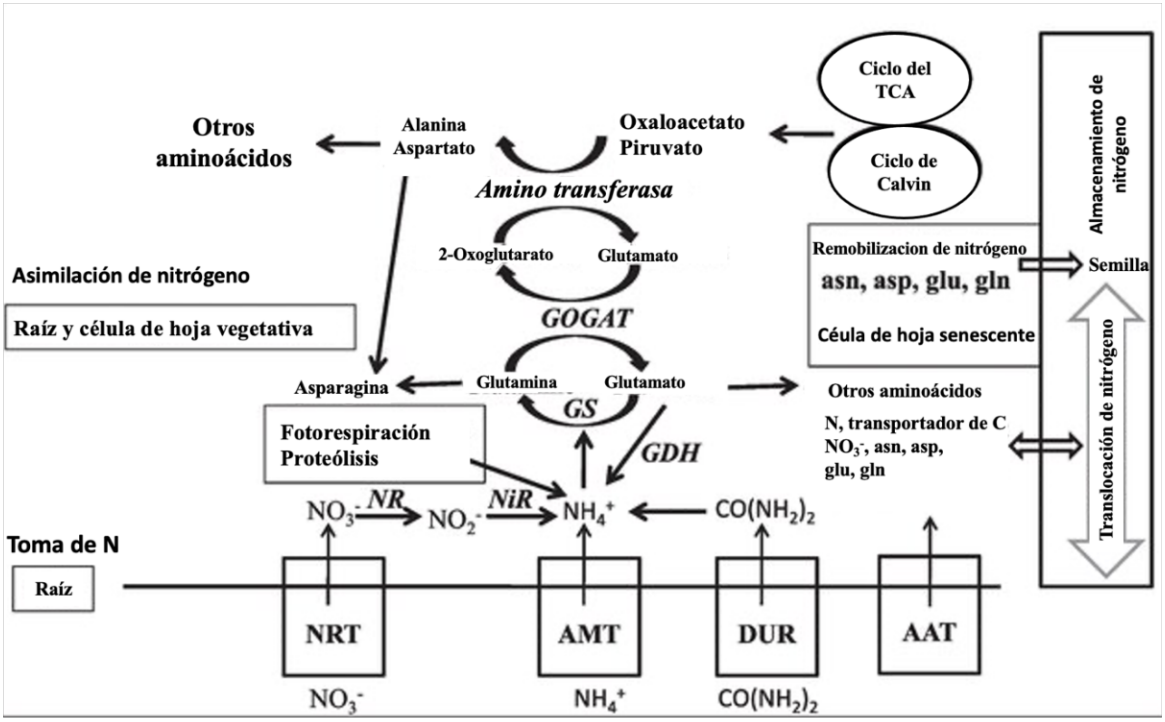


Figura 1.5. Ruta esquemática que representa la absorción, asimilación y translocación del nitrógeno. Diagrama tomado de Lal et al. (2024).

El NH_4^+ es asimilado por la glutamina sintetasa (GS2) (Balotf et al., 2016) para producir glutamina (gln) mediante la hidrólisis de ATP. Este aumento en la cantidad de gln estimula la actividad de la glumato sintasa (GOGAT) la cual cataliza la transferencia reductiva del nitrógeno amido de la gln al α-oxoglutarato para formar dos moléculas de glu (Miflin & Lea, 1982). Alternativamente, la glutamato deshidrogenasa (GDH) cataliza la aminación reductiva del α-oxoglutarato a glutamato (Kwinta & Bielawski, 1998). Estas dos moléculas, la gln y el glu, son las primeros aminoácidos formados después de que el amonio es asimilado. Por medio de transaminación el nitrógeno presente en el glu es transferido a los α-cetoácidos correspondientes para formar los demás aminoácidos (de la Torre et al., 2014).

Por otra parte, el amonio también puede ser transportado dentro de la célula por medio de

los transportadores de amonio (McDonald & Ward, 2016). En el citosol, la isoenzima de la glutamina sintetasa 1 (GS1), sintetiza gln a partir de este amonio y evita sus efectos tóxicos. Este proceso también se suele llevar a cabo dentro de la mitocondria (Kwinta & Bielawski, 1998).

1.6. Secreción de moléculas en medios de cultivos y su posible efecto en la ES

En una gran cantidad de protocolos se utilizan medios de cultivo líquidos. Ya sea explantes o células provenientes de callos, secretan sustancias en el medio de cultivo (Figura 1. 6). Estos compuestos secretados al medio de cultivo pueden ser desde moléculas pequeñas como fenoles, polisacáridos, aminoácidos, reguladores del crecimiento, y vitaminas (Nic-Can et al., 2015) o proteínas (Bhuyan & Bordoloi, 2019). En ambos casos tienen una fuerte influencia en el proceso embriogénico, lo pueden inhibir o activar (Nic-Can et al., 2015). Las proteínas secretadas se pueden aislar fácilmente del medio de cultivo, evitando la contaminación por proteínas citosólicas de células rotas (Cho et al., 2009); Gupta et al. (2011).

Dentro de las proteínas que tienen un rol en la embriogénesis somática podemos mencionar a las EP2 y EP3; las primeras ayudan en la formación de las capas de las cuticulas para mantener así el tamaño pequeño de las células embriogénicas, mientras que las EP3, tienen participación en la formación de la protodermis en el estadio globular del desarrollo de los embriones (De Jong et al., 1992; Sterk et al., 1991) . Por otro lado las quitinasas actuan rompiendo los enlaces β-1, 4-glucosidicos entre los residuos N-acetil glucosamina de la quitina, y ha sido reportado también que actuan como molécula señal liberando pequeños peptidos de las arabiogalactoproteínas que así ayudan a estimular la embriogénesis somática (Cairney & Pullman, 2007; Dyachok et al., 2002; Egertsdotter & Von Arnold, 1995). Las arabinogalactoproteínas (AGPs), son moléculas que consisten en 10% de proteína y de 90% de carbohidratos. Están localizadas en la membrana plasmática, o en el espacio intercelular como secreciones y son pertenecientes a la familia que de proteínas que son ricas en hidroxiprolina. Estas AGPs pueden ser procesados enzimaticamente por las quitinasas para generar oligopeptidos con la capacidad de inducir señales a receptores de membrana para estimular la ES (Nic-Can, 2010) Las GLP's (proteínas similares a la germinación), se encuentran la pared celular en embriones progenitores globulares, y se sugieres que estan involucrados en el inicio y terminación de

la expansión de la pared celular durante la ES (Bhuyan & Bordoloi, 2019) . Las proteínas transferidoras de lípidos ayudan facilitando el movimiento de los lípidos a traves de las membranas, y se ha observado que tienen presencia en las etapas tempranas de diferenciación durante el desarrollo de los embriones (Arondel & Kader, 1990; Kurczynska et al., 2007; Zimmerman, 1993) y una alta expresión de genes en el estadio cotiledonar en *Daucus carota* (Sterk et al., 1991) Las esterasas, son un grupo de hidrolasas que ayudan a catalizar el rompimiento y la formación de enlaces carboxil ester, para la modificación de la pared celular, al igual que la división y elongación celular durante etapas temparanas de la ES (Chibbar et al., 1989; Tchorbadjieva & Odjakova, 2001; Willats et al., 2001).

Entre algunas de las proteínas que inhiben el proceso embriogénico se encuentran la quinona reductasa, oscurece los tejidos de explantes y medios de cultivo, se asume que sea debido a la oxidación de polifenoles y formacion de quinonas (Gomez-Garay et al., 2013). Peroxidasas extracelulares, ciertos tipos de estas enzimas pueden estar asociados con una mayor rigidez y engrosamiento de la pared celular (Lorenzo, M. et al., 2018). Se ha llegado a reportar que algunas arabinogalactoproteínas (AGPs) puedan tener efecto inhibitorio en la ES, un trabajo reportado por (Kreuger & Van Holst, 1995), mostraron que fracciones de AGPs aislado por medio de anticuerpos monoclonasles (ZUM15 AGPs), provenientes te medio de cultivo de *D. carota* llegaron a inhibir la ES ya que hubo vacuolización de las células embriogénicas y a su vez perdieron la capacidad de formar embriones. En otro trabajo reportado poro (Toonen et al., 1997), los AGPs con el epítopo JIM8 AGPs mostraton efectos inhibitorios al reduicir la concentración hasta el 50% en la formación de embriones desde células individuales. La chalcona isomerasa y la flavonona 3-hidroxilasa, se sugiere que inhibe el transporte de auxinas en el estadio de cotiledonar y en embriones maduros (Gomez-Garay et al., 2013).

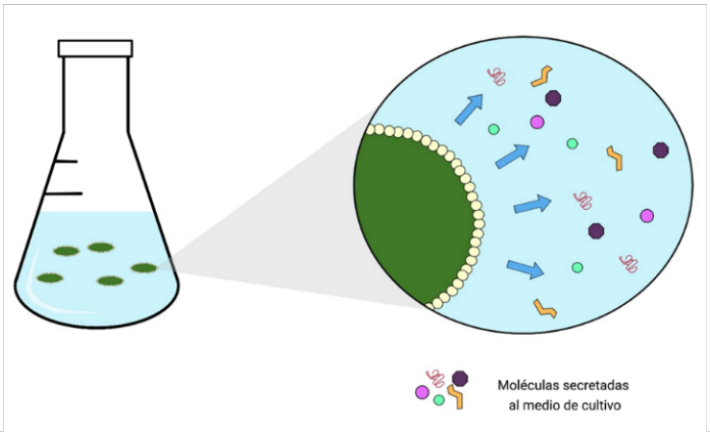


Figura 1.6. Modelo de secreción de moléculas al medio de cultivo en la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*.

Las proteínas extracelulares desempeñan un papel importante en la embriologénesis de las angiospermas (Kreuger & Van Holst, 1993; Van Engelen & De Vries, 1992). Estas proteínas y su expresión se han asociado con la inducción e iniciación de la ES (Boyer et al., 1993). Los cultivos de células de zanahoria secretan una amplia gama de proteínas. En diversos estudios se ha informado que las proteínas extracelulares desempeñan un papel inductivo (Coutos-Thévenot et al., 1992; Filipecki & Przybecki, 1994; Hilbert et al., 1992; Nielsen & Hansen, 1992; Van Engelen & De Vries, 1992) o inhibidor (Gavish et al., 1992) de la ES.

Las proteínas extracelulares no son secretadas por células embriogénicas sino por células no embriogénicas, por ejemplo, la proteína extracelular EP1 (Van Engelen & De Vries, 1992). Otra proteína que puede estar involucrada en la generación de moléculas señalizadoras que estimulan la ES en zanahoria es la quitinasa (De Jong et al., 1992). La proteína extracelular β-1, 3-glucanasa puede estar involucrada en la degradación de calosa de la pared que rodea las células embrionarias y los embriones pequeños (Helleboid et al., 1998). Esta misma enzima, además de la quitinasa se expresan durante la ES de *Picea glauca* (Dong & Dunstan, 1997).

En diversos trabajos se ha podido observar que los medios de cultivos embriogénicos secretan unas proteínas que modifican la diferenciación de los embriones y que podrían utilizarse para caracterizar su potencial embriogénico. Se ha observado la presencia de proteínas extracelulares específicas del proceso de ES en suspensiones celulares de *D. carota*, *Cucumis sativus*, *Vitis vinifera* y *Hordeum vulgare*. En otro estudio realizado en *Cichorium* sp., se pudo determinar la presencia de proteínas extracelulares de 9 kDa que son secretadas al medio de cultivo y que podían inducir la ES. Se desconoce cuál es la función de las proteínas secretadas al medio de cultivo (Blanckaert et al., 2002), sin

embargo, se especula que participan en la modificación de los polisacáridos de la pared celular.

Sobre la posible función de las proteínas secretadas al medio de cultivo se ha determinado que la tunicamicina (un inhibidor en el proceso de la glucosilación) inhibe la ES de zanahoria. Sin embargo, el proceso de ES se puede restaurar agregando peroxidasas al medio de cultivo (Cordewener et al., 1991), lo que sugiere que la presencia de peroxidasas en el medio de cultivo es muy importante para que se lleve a cabo el proceso de ES. La tunicamicina es un antibiótico el cual inhibe la formación de la glucosilación ligada a N de la proteína, se ha reportado que actúa como un inductor del estrés del reticulo endoplasmico (RE). En *A. thaliana* al añadir la tunicamicina se produce un estrés en el RE lo que provoca una producción de H_2O_2 al igual que la peroxidación de lípidos y proteínas, resultando por consecuente a un estrés oxidativo (Ozgur et al., 2014). En ese mismo sentido, las peroxidasas metabolizan las especies reactivas de oxigeno, catalizan las reacciones de oxido-reducción entre un peróxido y un agente reductor, transfieren un átomo de oxígeno al sustrato y otro al agua, así para poder restairar y continuar con el proceso embriogénico (Hiraga et al., 2001).

En otro estudio sobre proteínas extracelulares que inhiben la ES en *Citrus aurantium*, (Gavish et al., 1991, 1992) se determinó que el desarrollo normal de la ES depende necesariamente de la ausencia de proteínas glucosiladas con una masa molecular de entre 53 y 57 kDa.

También se ha demostrado la presencia de proteasas en los medios de cultivos embriogénicos y no embriogénicos en zanahorias durante el crecimiento del callo y la formación de los embriones (Carlberg et al., 1984). Se ha determinado que estas proteínas secretadas al medio aumentan durante el curso del desarrollo del cultivo; entre estas proteínas, EP1 (proteínas extracelulares tipo 1) es secretada por células no embriogénicas (Van Engelen et al., 1991) en tanto que EP2 (proteínas extracelulares tipo 2) es secretada solo por las células embriogénicas (De Jong et al., 1992). Otra proteína que se ha detectado, la proteína EP3 (proteínas extracelulares tipo 3), se ha identificado como una quitinasa. Se ha demostrado que las quitinasas tienen actividad en la generación de moléculas esenciales para la señalización en la ES. El mecanismo por el cual los productos de la acción de la quitinasa intervienen en la ES se desconocen. Es interesante que la EP3 también está presente durante el desarrollo de la semilla de zanahoria, lo que sugiere que esta proteína también desempeñe una importante función

durante el desarrollo de los embriones cigóticos. La EP3 puede llevar a la formación de moléculas que contienen GlcNAc (acetil-D-glucosamina) la que estimula el desarrollo de los embriones somáticos. Este efecto es comparable al de las quitinasas sobre los factores Nod (Staehelin et al., 1994).

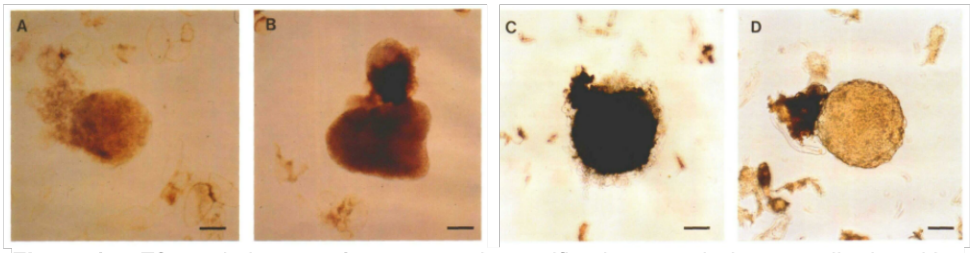


Figura 1.7. Efecto de las proteínas secretadas purificadas a partir de un medio de cultivo de embriones de tipo silvestre en el desarrollo de embriones *ts11* a la temperatura no permisiva de 32 °C. (A) Embrión globular aberrante en un cultivo de embriones *ts11* de 4 semanas de edad; barra = 180 µm. (B) Embriones globulares y en estadio de corazón en un cultivo de embriones de 4 semanas de edad al que se habían añadido 0.1 ng mL^{-1} medio de cultivo de cada una de las glucoproteínas de 32 y 35 kD; barra = 200 µm. (C) Embrión globular en un cultivo de embriones de 14 días de edad al que se añadieron 0.1 ng de glucoproteína pura de 35 kD por mililitro de medio de cultivo; barra = 180 µm. (D) Embrión globular en un cultivo de embriones de 14 días al que se añadieron 0.1 ng mL^{-1} de medio de cultivo de glucoproteína pura de 32 kD; barra = 180 µm. Figura tomada de De Jong et al (1992).

Un descubrimiento muy importante sobre la participación de la proteína EP3, cuya masa molecular es de 32 kDa, se llevó a cabo en la única mutante sensible a temperatura de zanahoria *ts11*. En esta línea celular el proceso embriogénico se puede llevar a cabo de manera normal a 24 °C, sin embargo, cuando la línea se cultiva a 32 °C, el proceso no se lleva a cabo y no avanza más allá del estadio globular (Lo Schiavo et al., 1990). El análisis del medio de cultivo mostró que cuando las células se cultivan a 24 °C secretan un grupo de proteínas, que cuando fueron caracterizadas se determinó que contaban con actividad de quitinasa. El mismo análisis del medio de cultivo de las células cultivadas a 32 °C mostró que no estaban presentes varias de las proteínas que si lo estaban en el medio de las células cultivadas a 24 °C. Cuando cada una de las proteínas ausentes en el medio de cultivo de las células cultivadas a 32 °C y provenientes del medio de las células cultivadas a 24 °C se agregaron individualmente al cultivo a 32 °C, una de ellas, una proteína de 32 kDa de masa molecular, era capaz de restaurar el proceso embriogénico (Figura 1.7) (De Jong et al., 1992; De Jong et al., 1995). Lo que se descubrió es que la mutante es incapaz de realizar correctamente la glucosilación de algunas proteínas a temperaturas no permisibles (32 °C) (Kragh et al., 1996).

Otra línea de evidencia de la importancia de la glucosilación de proteínas en la inducción

de la ES provino de una vía independiente de las suspensiones celulares embriogénicas de zanahoria. En un híbrido de *Cichorium* clone '474' (*C. intybus* L. var. *sativum* × *C. endivia* L. var. *latifolia*) la adquisición y expresión de la competencia embriogénica se caracterizó por la aparición de 15 polipéptidos (Boyer et al., 1993). Se determinó que las proteínas de 38 kDa se encontraban abundantemente presentes en el medio embriogénico acondicionado después de la primera división de las células inducidas. Estas proteínas están glucosiladas. Las secuencias de aminoácidos tenían homologías del 36 al 57% con las β-1,3-endoglucanasas vegetales. Además, las proteínas de 38 kDa fueron reconocidas por anticuerpos generados contra la glucanasa del tabaco PR2a y se probó su actividad β-1,3-glucanasa. Estos resultados sugieren que una glucanasa de 38 kDa está relacionada con la inducción de la ES. Además, el nivel de actividad de la glucanasa fue casi tres veces mayor en el medio de la línea embriogénica '474' que en el medio de una línea no embriogénica (Helleboid et al., 1998).

Actualmente, se han encontrado que por lo menos 50 polipéptidos de entre 10 y 50 kDa son secretados por las suspensiones de células embriogénicas durante la fase de crecimiento indiferenciado. Estos péptidos han sido agrupados en 5 categorías: 1) proteínas expresadas constitutivamente, 2) proteínas cuya concentración aumenta durante la ES, 3) proteínas cuya concentración disminuye durante la ES, 4) proteínas asociadas con el medio de cultivo utilizado durante la ES y 5) proteínas que aumentan durante el crecimiento indiferenciado sin que las células hayan sido subcultivadas (Nielsen & Hansen, 1992).

Una tercera línea de evidencia sobre la participación de proteínas glucosiladas es el hecho de la inhibición de la glucosilación por tunicamicina inhibe el desarrollo embrionario (Borderies et al., 2004).

Otro grupo de proteínas que se ha determinado que están involucradas en diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, incluida la embriogénesis y la proliferación celular, son las AGPs, son moléculas que consisten en 10% de proteína y de 90% de carbohidratos. Están localizadas en la membrana plasmática, o en el espacio intercelular como secreciones. Y son pertenecientes a la familia que de proteínas que son ricas en hidroxiprolina. (Nic-Can, 2010). Si bien aun se desconoce el mecanismo mediante el cual estas proteínas participan en la ES es posible que las AGPs puedan ser procesadas enzimáticamente por las quitinasas, de esta forma se liberan oligosacáridos los cuales funcionan como señal que estimulan la diferenciación celular (Mita et al., 1997).

Esta hipótesis se ha visto reforzada por estudios de las AGPs en líneas de callos embriogénicos y no embriogénicos de *Euphorbia pulcherrima* Willd. ex. Klotzsch se analizaron durante un período de cultivo de 9 semanas utilizando el reactivo β-glucosil Yariv y un anticuerpo anti-AGP (LM2). La cantidad de AGP detectada con el reactivo Yariv aumentó en cultivos embriogénicos durante el desarrollo de embriones somáticos. Los callos embriogénicos y no embriogénicos contenían diferentes conjuntos de AGP caracterizados con el reactivo Yariv y el anticuerpo monoclonal LM2. Las AGPs reconocidas por LM2 se localizan principalmente en las células protodérmicas de embriones somáticos globulares. El desarrollo de los embriones somáticos de *E. pulcherrima* parece estar asociado con la presencia de AGPs particulares (Saare-Surminski et al., 2000).

Recientemente se ha identificado una familia de proteoglicanos vegetales extracelulares en *Persea americana*. Estas AGPs se extrajeron de cultivos embriogénicos de aguacate. Cuando el medio de inducción/proliferación de callos embriogénicos de aguacate se complementó con 1–2 mg L^{-1} de AGPs, la tasa de inducción de callos embriogénicos aumentó significativamente y el efecto persistió durante al menos cinco subcultivos después del tratamiento inicial con AGPs. La adición de AGPs también modificó la textura y la calidad del callo (Encina et al., 2024).

Las germinas son proteínas reguladas por el desarrollo que se descubrieron por primera vez en el trigo durante la germinación. Son resistentes a la desnaturalización y a las proteasas y se unen iónicamente a la pared celular. Su actividad de oxalato oxidasa les confiere un papel en el desarrollo de las plantas y en las respuestas de defensa. Las germinas y las proteínas similares a las germinas (GLP) se han clasificado en una gran familia de genes denominada cupina, por la presencia de una estructura característica de núcleo en β-barril. Se ha propuesto que las germinas y las GLP desempeñan un papel importante durante las embriogénesis somática y cigótica (Domon et al., 1995; Neutelings et al., 1998; Patnaik & Khurana, 2001). Las primeras GLP se identificaron durante la ES comparando los perfiles proteicos extracelulares de líneas celulares no embrionarias y embrionarias en *Pinus carribea* (Domon et al., 2000). Se ha sugerido que las GLP pueden estar involucradas en el inicio y terminación de la expansión de la pared celular durante la ES (Chugh & Khurana, 2002).

El seguimiento de la expresión de *LmGER1* durante la maduración de embriones somáticos y en diferentes órganos de plántulas jóvenes mediante transformación

homóloga con un constructo promotor-*gus* muestra que el gen se transcribe en el meristemo radicular de embriones jóvenes y, posteriormente, en los cotiledones y en el procambium vascular y el xilema (Mathieu et al., 2006).

Lippert et al. (2005) utilizaron un enfoque proteómico para determinar cuantitativamente los niveles de expresión de proteínas en cuatro estadios del desarrollo embrionario. Sus resultados muestran cambios significativos en la abundancia de GLP ya en el día 7 del desarrollo embrionario. Se ha descrito que varios genes germinales y GLP, como *AtGER2* en *Arabidopsis*, (Neutelings et al., 1998) pseudogermina en trigo (Lane et al., 1993) y *GP111*, *GP103* y *GP94* en pino (Domon et al., 1995) participan en el proceso de embriogénesis. Sin embargo, sus funciones específicas aún no están claramente descritas (Bhuyan & Bordoloi, 2019).

En el caso de *Coffea* spp. En nuestro laboratorio se ha determinado que los tejidos que se utilizan para la inducción de la ES secretan proteínas al medio de cultivo en el que se induce la ES en condiciones en las que no se ha modificado la fuente de nitrógeno (Figura 1.8) (Mukul-López et al., 2012). En este trabajo se utilizaron cultivos en suspensión de *C. canephora* y *C. arabica* para estudiar la población de proteínas secretadas al medio. Se utilizaron dos tipos de cultivos; uno para la propagación de cultivos en suspensión (no embriogénico) y otro para la inducción de ES (embriogénico). Se analizaron las proteínas secretadas al medio de cultivo, tanto en condiciones no embriogénicas como de inducción de ES. En el medio de *C. canephora* se encontraron 173 proteínas a los 14 días de cultivo en condiciones no embriogénicas. En *C. arabica* se encontraron 523 proteínas a los 14 días en condiciones no embriogénicas. En condiciones embriogénicas se determinaron 379, 409 y 175 proteínas a los 21, 42 y 98 días respectivamente. También se determinó que algunas proteínas se secretan exclusivamente en condiciones embriogénicas y otras en condiciones no embriogénicas (Mukul-López et al., 2012).

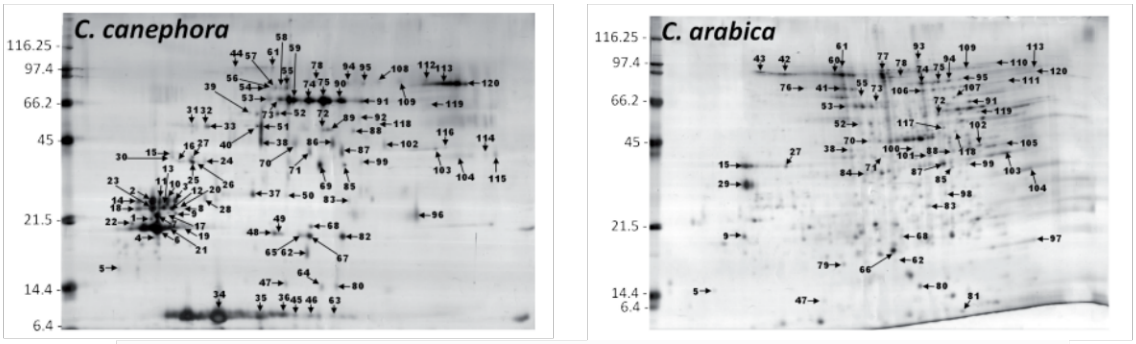


Figura 1.8. Izquierda. Patrones electroforéticos de las proteínas presentes en el medio de cultivo de *C. canephora* después de 14 días en condiciones no embriogénicas. Derecha. Patrones electroforéticos de las proteínas presentes en el medio de cultivo de *C. arabica* después de 14 días en condiciones no embriogénicas. Fotografías tomadas de Mukul-López et al. (2012).

En resumen, durante el estudio de la ES en cultivos celulares en suspensión, se ha determinado que las proteínas secretadas al medio de cultivo podrían actuar como factores estimulantes para la formación de una masa proembriogénica (Ben-Amar, 2021), potenciando así la diferenciación. Por ejemplo, en los primeros estadios de la ES de *Pinus nigra*, las proteínas que se acumulan de manera diferencial fueron las relacionadas con la remodelación de la pared celular y las que interactúan con carbohidratos, mientras que las menos abundantes fueron las que participan en el aflojamiento de la pared celular. (Pernis et al., 2023). Mientras que es claro que, durante la inducción de la ES, tanto en medio semi-sólido como en medio líquido se secretan una gran cantidad de proteínas aún se desconocen las funciones que pueden tener estas proteínas durante la inducción de la ES y el desarrollo de los embriones somáticos.

Justificación

Las especies de cafeto de interés comercial, económico y social son de atractivo mundial ya que es la fuente de una de las principales bebidas que se consumen. Se han realizado avances importantes en lo que respecta a su propagación mediante ES. Sin embargo, la mayor parte de estos avances se han logrado de manera empírica, por lo que es necesario tener un acercamiento más científico que permita aumentar los rendimientos en la producción de embriones somáticos y disminuir los tiempos de respuesta en la inducción de dicho proceso. De entre todos los factores que sabemos que afectan al proceso de la ES la fuente de nitrógeno y la secreción de proteínas al medio de cultivo es uno de los que puede modificar de manera más drástica al proceso de la ES. Por ello es importante dar un primer paso en el conocimiento de como la fuente de nitrógeno modifica la respuesta embriogénica y la secreción de proteínas durante la inducción de la ES en el cafeto.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el cambio en el patrón de proteínas provocado por el cambio de la fuente de nitrógeno, durante la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*.

Objetivos específicos

- Inducir la embriogénesis somática bajo diferentes fuentes de nitrógeno.
- Cuantificar las proteínas secretadas al medio de cultivo durante la inducción de la embriogénesis somática de *Coffea canephora* en diferentes fuentes de nitrógeno.
- Analizar por medio de geles de poliacrilamida las proteínas secretadas al medio de cultivo los días 28 y 56 de cultivo incubadas en diferentes fuentes de nitrógeno.
- Analizar desde el punto de vista proteómico el cambio en las proteínas durante la inducción de la embriogénesis somática.

Figura 1.9. Diagrama general de estrategia experimental primera parte.

Estrategia experimental

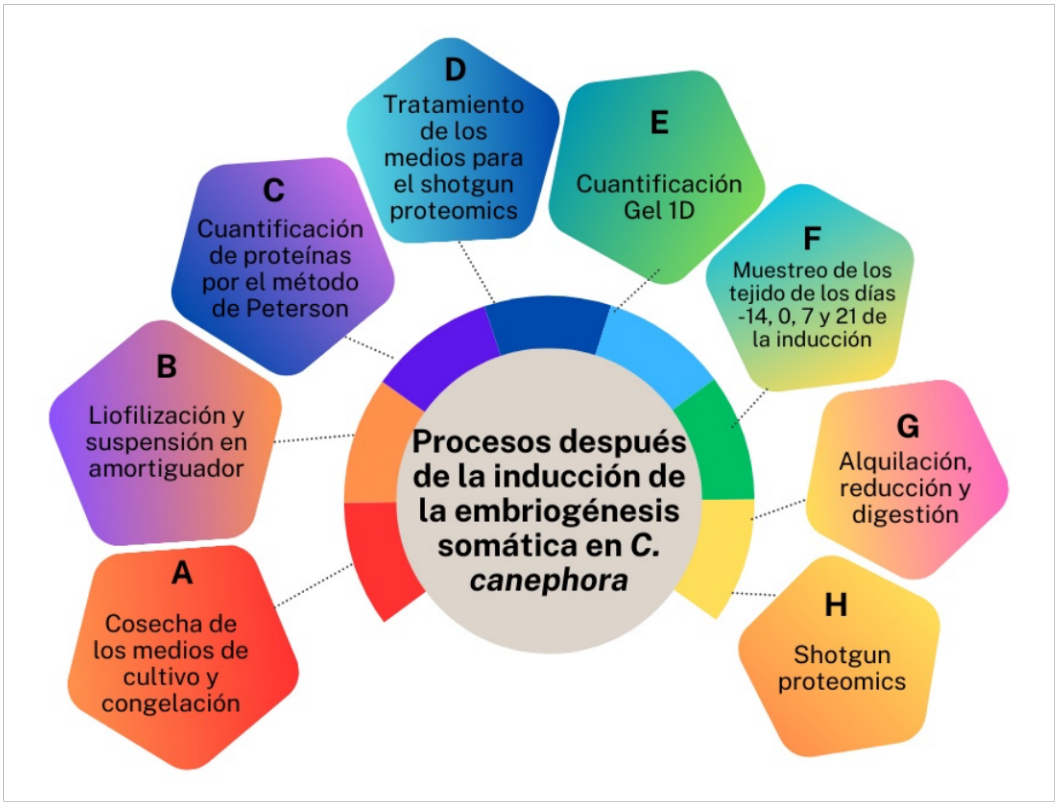


Figura 1.10. Diagrama general de estrategia experimental segunda parte.

CAPÍTULO II

Materiales y Métodos

2.1. Introducción

El café es uno de los cultivos más importantes del mundo, generando oportunidades de empleo para millones de personas y sirviendo como una importante fuente de ingresos para varios países. Sin embargo, la producción de café también está vinculada a importantes preocupaciones ambientales. La ES se ha convertido en una tecnología prometedora para abordar estas preocupaciones y mejorar la producción de café. La ES es una técnica de cultivo de tejidos vegetales que se ha aplicado con éxito a *C. canephora*, lo que resulta en la producción de un gran número de embriones a partir de células somáticas. El método fue reportado por primera vez por Staritsky (1970), quien logró la ES de café a partir de secciones de ramas ortotrópicas de *C. canephora*. Los estudios de investigación han revelado que los embriones somáticos en *C. canephora* se originan a partir de células del mesófilo esponjoso y las características histológicas de este proceso han sido discutidas por Michaux-Ferrière et al. (1992) y Söndahl et al. (1979). Desde entonces, se ha realizado una cantidad considerable de investigación sobre la inducción de la ES del café, principalmente de secciones de hojas (Loyola-Vargas et al., 2016).

La investigación ha llegado a demostrar que cambiar los recursos en la fuente de nitrógeno puede mejorar la ES en el cafeto (Arimarsetiowati, 2017; Bartos et al., 2018; Fuentes-Cerda et al., 2001; Mwaniki et al., 2019).

La presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno en el medio de cultivo permite la ES en menor medida. La adición de compuestos nitrogenados reducidos, como el amonio, junto con nitrato estimula fuertemente la inducción de la ES. Algunos de los compuestos nitrogenados reducidos que se han utilizado para promover la ES incluyen a la glutamina, la alanina, la prolina, el ácido glutámico, la asparagina, el ácido aspártico, así como el hidrolizado de caseína (Das, 2011). Por lo tanto, la optimización en la cantidad que de estos compuestos se agregue a los medios de cultivo puede mejorar significativamente la cantidad de embriones somáticos producidos y la posterior regeneración de la planta (Repalli et al., 2019). Así, el nitrógeno en forma de compuestos nitrogenados reducidos

juega un papel esencial en la promoción de la ES.

2.1. Material vegetal

Se utilizaron plántulas de *C. canephora* provenientes de la germinación de embriones somáticos cultivadas *in vitro* en medio MS sin reguladores del crecimiento, pH de 5.8 mantenidas bajo fotoperiodo 16/8 h luz/oscuridad, a una temperatura de 25 ºC.

2.2. Incubación en medio de pre-acondicionamiento

Para la inducción de la ES, las plántulas de *C. canephora* se colocan durante 14 días en un medio de pre-acondicionamiento por 14 días. El medio de pre-acondicionamiento es el medio MS adicionado de ácido naftalén acético (0.44 µM) y kinetina (2.32 µM) e incubadas en las condiciones ya mencionadas.

Para el experimento con las diferentes fuentes de nitrógeno, la concentración total de nitrógeno se mantuvo constante en 15 mM y la relación original NO_3^-/NH_4^+ de 2:1 (testigo) se modificó a 1/0, 0/1, 1/1 y 1/2.

Tabla 2.1. Relaciones de nitrato y amonio para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	NO_3^-	NH_4	KNO_3	NH_4NO_3	KCl	NH_4Cl
A	15	0	15 mM	-----	-----	-----
B	0	15	-----	-----	5 mM	15 mM
C*	10	5	5 mM	5 mM	-----	
D	5	10	-----	5 mM	5 mM	5 mM
E	7.5	7.5	-----	7.5 mM	5 mM	-----

*El tratamiento C fue usado como el testigo.

2.2.1. Inducción de la embriogénesis somática

Para la inducción de la ES se preparó el medio de Yasuda modificado (Yasuda et al., 1985) (Tabla 2.2) adicionado de benciladenina 5 µM. A este medio se le modificó la fuente de nitrógeno de acuerdo con las relaciones mencionadas en tabla 2.1. Se colocaron 50 mL de medio en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los matraces con el medio se esterilizaron a una presión de 1 kg cm^{-2} (121 ºC).

En una campana de flujo laminar se tomaron el segundo y tercer par de hojas de las plantas pre-acondicionadas por 14 días. Con un sacabocados se tomaron explantes de 0.8 cm de diámetro. Se colocaron cinco explantes por matraz para cada uno de los tratamientos. Para cada tratamiento se utilizaron cinco matraces. Los matraces con los explantes se incubaron en la oscuridad a una temperatura de 25 ºC con una agitación de

60 rpm.

Tabla 2.2. Stocks para la preparación del medio Yasuda modificado

Stock	Reactivo	mg/L	mL/ de medio
A	$CaCl_2$ $2H_2O$	110	10
B	KNO_3	475	10
	NH_4NO_3	412	10
C	KH_2PO_4	85	10
	H_3BO_3	3.1	10
	Na_2MoO_4 . $2H_2O$	0.125	10
D	$MgSO_4$. $7H_2O$	92.5	10
	$MnSO_4$. 7 H_2O	11.2	10
	$CuSO_4$ .5 H_2O	0.05	10
	$ZnSO_4$. 7 H_2O	4.3	10
E	$FeSO_4$. 7 H_2O	21	10
	NaEDTA	27.9	10
F	Ácido nicotínico	1	10
	Piridoxina	1	10
	Tiamina	10	10
	Mio-inositol	100	10

Sacarosa	30 g/L
pH	5.8
BA	5 µM (1.12 mg/L)

2.2.2. Cosecha y liofilización del medio de cultivo

El medio de cultivo de cada uno de los matraces se colectó a los 28 y 56 días después de la inducción de la ES. El medio se filtró a través de un papel filtro de poro mediano (8 µm). Los medios fueron congelados a -80 °C. Los medios congelados se liofilizaron para eliminar el agua. Este proceso tomó alrededor de dos días.

2.2.3. Resuspensión del medio liofilizado

Los medios liofilizados se resuspendieron en 5 mL del amortiguador de extracción de proteínas por el método del fenol, [KCl (Sigma) 0.1 M, Trizma base (Sigma, T1503) 0.5 M adicionado con EDTA (Sigma) 50 mM y el pH ajustado a 7.5]. El material resuspendido se transfirió a tubos Falcon de 50 mL, se etiquetaron cada uno con el día de cosecha y el tipo de tratamiento, así como la cantidad disuelta del medio de cultivo cosechado y, se guardaron en el ultracongelador a una temperatura de -80 ºC.

2.2.4. Precipitación de proteínas por el método del fenol

Se tomó un mililitro del contenido de cada uno de los tratamientos y se colocó en un tubo Falcón de 15 mL, se añadieron dos inhibidores de proteasas, 10 µL de PMSF 1 mM, y 10 µL de un coctel de inhibidores de proteasa 1x, más cinco volúmenes de acetato de amonio 0.1 M con DTT 0.3 M. La mezcla se agitó con la ayuda de un vortex Thermolyme, y se dejó reposar toda la noche a una temperatura de -20 ºC. A continuación, se centrifugó a 6,000 rpm, a una temperatura de 4 ºC, por 30 min. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se secó a temperatura ambiente por 5 a 10 min. A continuación, se disolvió la pastilla con 200 µL de un amortiguador de rehidratación [urea 8 M, tiourea 1.5 M, CHAPS 1.5% (p/v), DTT 5 mM].

2.2.5. Cuantificación de proteínas

Se utilizó el método de Peterson (1977) para cuantificar las proteínas presentes en cada una de las muestras. Se utilizó albumina sérica bovina como estándar en un rango de concentraciones de 10 a 100 mg. Se tomaron 20 µL de las muestras resuspendidas en amortiguador de rehidratación y se llevaron a un volumen final de un mL con agua destilada. Se agregaron 100 µL de la solución DOC [deoxicolato de sodio 0.15% (p/v)], agitándolo con un vórtex y dejándolo en reposo a temperatura ambiente por 10 min. Después, se agregaron 100 µL de TCA [ácido tricloroacético al 72% (p/v)] incubándolo por 20 minutos en un baño de hielo. A continuación, los tubos se centrifugaron a 3,000 rpm, a una temperatura de 4 ºC por 15 min. Se descartó cuidadosamente el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. A continuación, se les agregó un mL de agua destilada y se agitaron en un vórtex. Se añadió un mL del reactivo A [una mezcla de partes iguales de CTC (cobre 0.1%, tartrato 0.2%, carbonato 10%), SDS, NaOH a 0.8 N y, agua destilada]. Se agita en un vórtex y se deja reposar por 10 min. A continuación, se le agregaron 500 µL del reactivo B [una parte del reactivo Folin-Ciocalteu, y cinco partes de agua destilada]. Se deja reposar por 30 min para que desarrolle la coloración. Finalmente, se lee la

absorbancia de las muestras a 750 nm es un espectrofotómetro Spectronic Genesys 10UV (Thermo Scientific).

2.2.6. Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras, después de liofilizadas y una vez que se determinó la cantidad de proteína, fueron analizadas mediante electroforesis de una dimensión para determinar la integridad de la mezcla de proteínas obtenida.

Para realizar la electroforesis se utilizó un equipo Protean plus Doedecell de la marca Bio-Rad. Los cristales se limpiaron con una solución de etanol al 70%. Una vez armado el equipo, se preparó la solución del gel separador al 12% a 1 mm de espesor (3 mL de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%, 1.875 mL de Tris 1.5 M a un pH de 8.8 con SDS 0.4%, 2.625 mL de agua destilada, 25 µL de APS al 10% y 8 µl de TEMED). La solución se vertió entre los cristales y se agregó 1 mL de isopropanol y se dejó polimerizar por 30 minutos. Pasado ese tiempo, se preparó el gel concentrador a 4% de 1 mm de espesor (0.325 mL de acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%, 625 µL de Tris 0.5 M a un pH de 8.8 con SDS al 0.4%, 1.525 ml de agua destilada, 25 µL de persulfato de amonio (APS) al 10% y 8 µL de TEMED). La solución se vertió sobre el gel espaciador y se colocó el peine sobre el gel sin polimerizar. Se dejó polimerizar por 20 minutos. A continuación, los cristales con el gel se colocaron en el estuche de carga asegurando que no se muevan de su lugar, y colocándolo todo dentro del tanque de corrida. Una vez que se completa el montaje del equipo con los cristales conteniendo el gel, se vierte el amortiguador de corrida a 1X, y se cargan las muestras previamente preparadas (20 µL de muestra con 6 µL de la solución de Laemmli), al igual que la mezcla de marcadores de masa molecular (Thermo Fisher Scientific; 6 µL de la mezcla marcador con 20 µL de agua destilada) en cada uno de los pocillos. Una vez llenos los pocillos, el equipo se conectó a la fuente de alimentación. El gel se corrió a 90 V por 30 minutos. A continuación, se aumentó el voltaje a 120 V por 120 minutos. Al término de la corrida, el gel se saca de entre los cristales y se tiñe.

2.2.7. Tinción de los geles con azul de Coomassie

Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie brillante. Para ello, el gel se dejó dentro de la solución de tinción en agitación constante de 12 rpm toda la noche. A la mañana siguiente se hicieron tres lavados por un tiempo de 20 minutos cada uno con una solución de distinción (50% agua destilada, 40% metanol y 10% ácido acético). Las proteínas separadas en el gel se observaron como bandas en los carriles del gel de

separación.

2.2.8. Digitalización de los geles

Para digitalizar los geles se elimina el exceso de colorante. Una vez eliminado este exceso de colorante, los geles se colocaron en un equipo ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) para su digitalización y de esta forma poder analizar el patrón de bandas de las proteínas.

2.2.9. Reducción de las proteínas, alquilación y digestión

Por cada 100 µL de muestra se añadieron 11 µL de una solución de (tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) 10 mM y se incubó por 45 minutos a una temperatura de 60 ºC en un termobloque, seguido de la alquilación para lo cual se incubaron en una solución de yodo acetamida (IAM) 30 mM (12 µL de IAM por cada 100 µL de muestra) por 60 minutos en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 13 µL de DTT 30 mM por cada 100 µL de muestra y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. En el siguiente paso se agregó un mL de acetona fría y se incubó toda la noche a una temperatura de -20 ºC para precipitar las proteínas. Una vez que se precipitaron las proteínas los tubos se centrifugaron a 10,000 × g por 15 min a 4 ºC. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se secó al vacío. Una vez seca la pastilla, ésta se resuspendió en un amortiguador de bicarbonato de amonio. Las muestras se almacenaron a una temperatura de -80 ºC para su uso posterior.

De los tubos congelados se realizó nuevamente una cuantificación por medio del método de Peterson. Una vez cuantificadas las muestras se corrió un gel de 1D aplicando 20 µg de proteína por carril y se volvió a comprobar la calidad de las proteínas que se utilizarán para el análisis proteómico.

Para la digestión de las proteínas se tomaron 100 µg de las muestras y se disolvieron en 100 µL de bicarbonato de amonio disuelto en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía SDS al 1%. A cada tubo se le añadió un µg de tripsina. La mezcla se incubó toda la noche a una temperatura de 37 ºC. Al día siguiente a cada tubo se les añadió 1.5 µg μL^{-1} de tripsina y se incubaron 4 horas a una temperatura de 37 ºC. Al finalizar la incubación los tubos se secaron en un Centrivap, Así las muestras quedaron listas para ser inyectadas en el espectrómetro de masas.

2.2.10 Corrida y análisis de las muestras de los tejidos

Se realizó un análisis nanoLC-MS/MS en un Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo-Fisher Scientific, San Jose, CA). Cada muestra se reconstituyó con 0.1% de ácido fórmico en agua grado LC-MS (solvente A) y se inyectaron 5 µL en una columna C_{18} a un flujo de 3 µL min^{-1} para posteriormente ser separada en una columna EASY spray C_{18} RSLC con un gradiente de 100 min con flujo de 300 nL min^{-1} utilizando el solvente A y 0.1% ácido fórmico en 90% acetonitrilo (solvente B). Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: 10 min de solvente A, 25 min de 7-20% solvente B, 20% solvente B por 15 min, 20-25% solvente B por 15 min, 25-95% solvente B por 20 min, y ocho min solvente A. El Orbitrap fue operado en modo positivo con un voltaje de 3.5 kV y 280 °C.

CAPÍTULO III

Resultados

3.1. Efecto de la fuente de nitrógeno en la inducción de la embriogénesis somática

Para la inducción de la ES se utilizaron plántulas como se describió en Materiales y Métodos. El efecto de los diferentes tratamientos en la relación de nitrógeno oxidado/nitrógeno reducido se evaluó a los 56 días después de la inducción. La concentración total de nitrógeno se mantuvo constante en 15 mM y la relación original NO_3^-/NH_4^+ de 2:1 (C; testigo) se modificó a 1/0 (A), 0/1 (B), 1/2 (D) y 1/1 (E).

En las primeras cuatro semanas de haber iniciado la inducción, en el borde del explante de las muestras de los tratamientos A, C y D se observa el inicio de la formación de estructuras embriogénicas. Al final del tiempo de observación (ocho semanas después de la inducción de la ES) se observa producción de embriones en diferentes estadios de desarrollo. Es importante señalar que si bien en los tres tratamientos hay una respuesta positiva (aparición de embriones somáticos), esta no es homogénea. La respuesta es mucho más abundante en el tratamiento testigo (C) que en los otros dos tratamientos (Figura 3.1), en tanto que en el tratamiento A prácticamente todos los embriones observados se encuentran en el estadio globular.

En los tratamientos B y E no se observó ninguna respuesta después de cuatro semanas del inicio de la inducción de la ES. Por el contrario, en el tratamiento B se empezó a observar una fenolización de los explantes. Este deterioro de los explantes incubados con amonio como única fuente de nitrógeno aumentó con el tiempo. Al final del experimento estos explantes se encontraban completamente deteriorados. En tanto que la muestra E también mostraba un cierto deterioro sin llegar a estar completamente oxidada. De hecho, se formó un callo de herida y algunas estructuras embrionarias en el estadio globular.

3.2. Cuantificación de embriones en los diferentes tratamientos

Además de la observación visual ya descrita (Figura 3.1) se realizó un análisis cuantitativo de los cinco tratamientos en los días 28 y 56. En la figura 3.2 se puede observar que a los 56 días tratamiento se pueden cuantificar estructuras embrionarias en tres de los tratamientos.

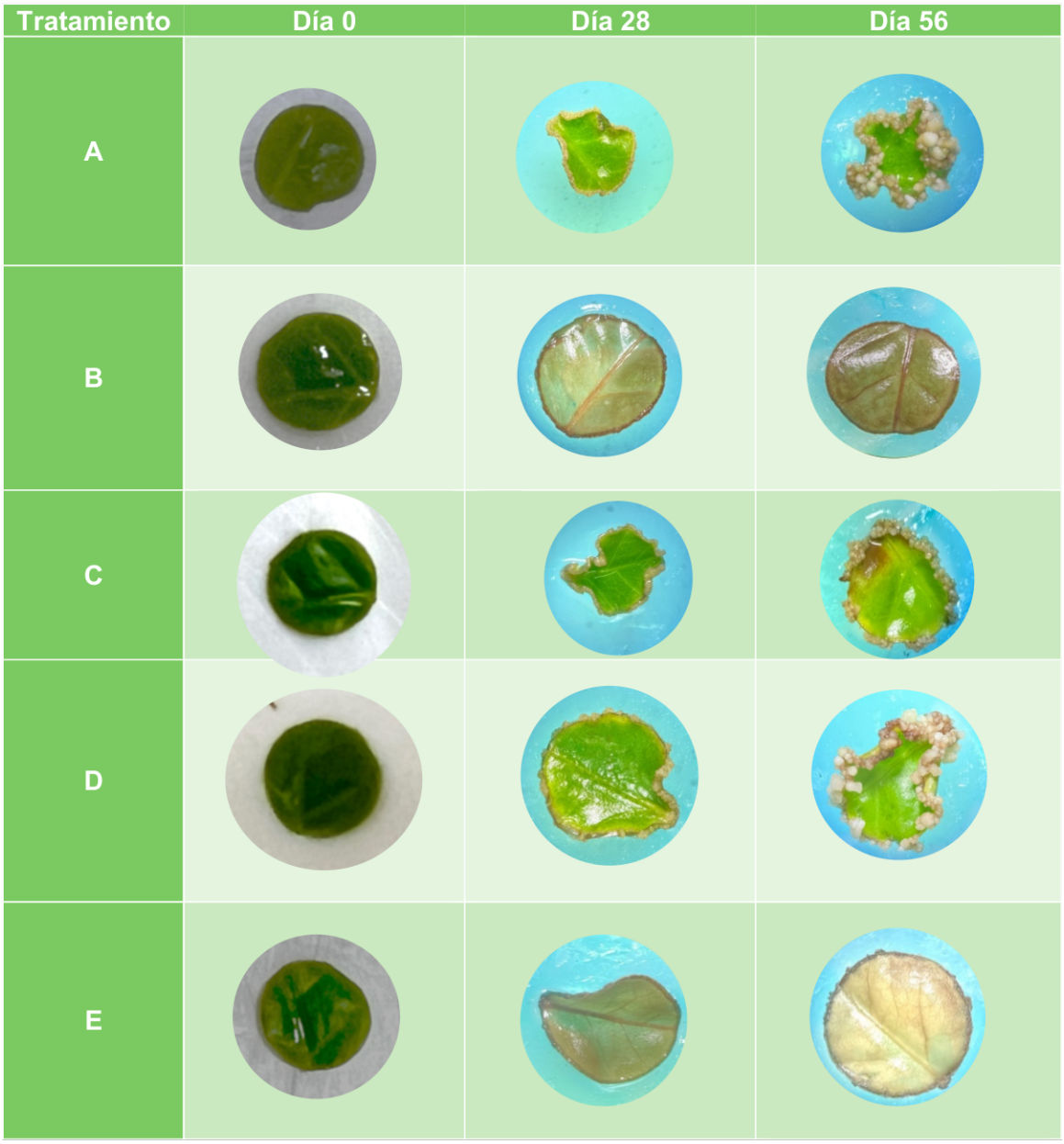


Figura 3.1. Efecto del cambio en la relación de nitrógeno oxidado/nitrógeno reducido en la inducción de la embriogénesis somática.

En el tratamiento A se obtuvo un total de 581 embriones, todos ellos en el estadio globular. En el tratamiento B no se obtuvieron embriones. En el tratamiento C, se contabilizó un total de 314 embriones, de los cuales 52 fueron globulares, 146 se encontraban en el estadio de corazón, 93 embriones en el estadio de torpedo y 23 embriones en el estadio cotiledonar. En el tratamiento D se contabilizaron 114 embriones todos en el estadio globular. El tratamiento E las estructuras embrionarias que se

observaron no llegaron a formar embriones desarrollados, por lo que no se contabilizó como tales.

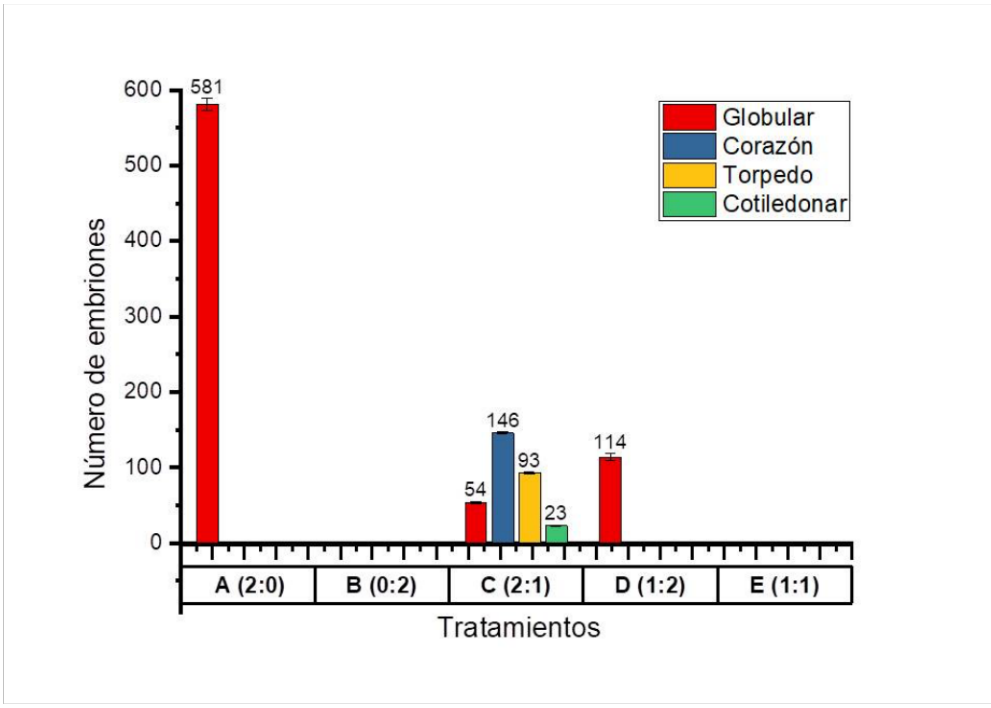


Figura 3.2. Conteo de embriones de los cinco tratamientos al día 56 después de la inducción de la embriogénesis somática.

3.3. Cuantificación de proteína por el método de Peterson

Para la cuantificación de proteínas por el método de Peterson (1977), primeramente, se realizó una curva de calibración con albumina de suero bovino como estándar.

Se colectaron muestras de los cinco tratamientos los días 28 y 56 después de la inducción de la ES. El medio se procesó como se indicó en Materiales y Métodos. De las muestras congeladas del día 28 se tomaron 10 µL por duplicado para cada uno de los tratamientos. Los resultados de cada muestra se promediaron y se graficaron. Como puede apreciarse en la figura 3.3, la cantidad de proteína varió entre 1.268 µg μL^{-1} para la muestra B y 4.628 µg μL^{-1} para la muestra D. El tratamiento A tuvo 2.498 µg μL^{-1}, para el tratamiento C se obtuvieron 3.089 µg μL^{-1}, mientras que para el tratamiento E la cantidad fue de 2.318 µg μL^{-1} (Figura 3.3).

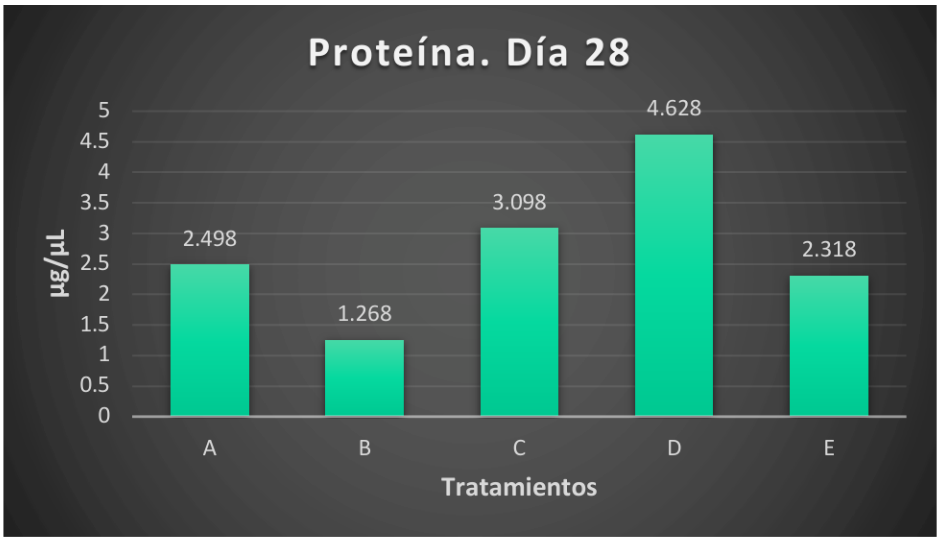


Figura 3.3. Promedios de la cuantificación de proteínas por el método de Peterson para las muestras 28 días después de la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea canephora*.

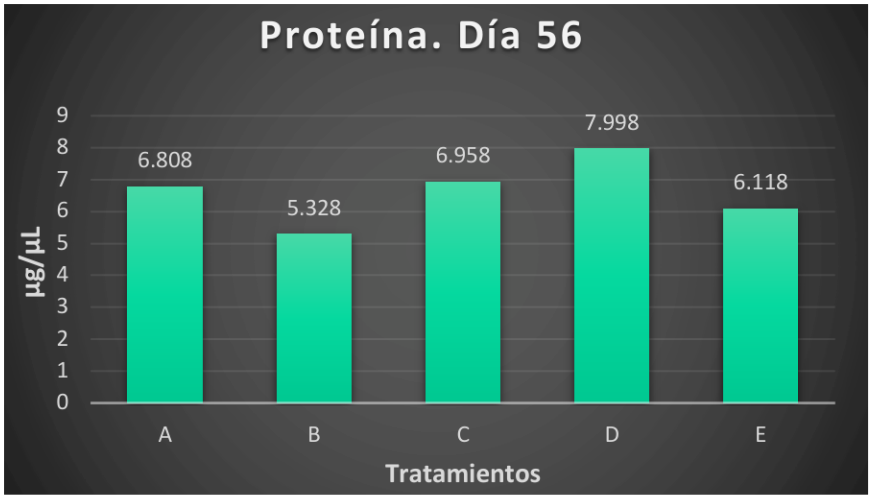


Figura 3.4. Promedios de la cuantificación por el método de Peterson para el día 56

La determinación de la cantidad de proteína en las muestras del día 56 dio como resultado que el tratamiento A tenía 6.808 µg μL^{-1}, el tratamiento B tenía 5.328 µg μL^{-1}, el tratamiento C tenía la cantidad de 6.958 µg μL^{-1}, el tratamiento D la cantidad de 7.998 µg μL^{-1}, y en el tratamiento E la cantidad de 6.118 µg μL^{-1}. Esto es alrededor del doble de proteína en el medio de cultivo comparado con la cantidad de proteína en las muestras de 28 días después de la inducción de la ES.

3.4. Determinación de proteínas después de la alquilación de las proteínas

Durante la preparación de las muestras para dejarlas en condiciones de inyectarlas en el espectrómetro de masas para su análisis se pierde material. Por esta razón es importante volver a determinar la cantidad de proteína que queda al final del tratamiento.

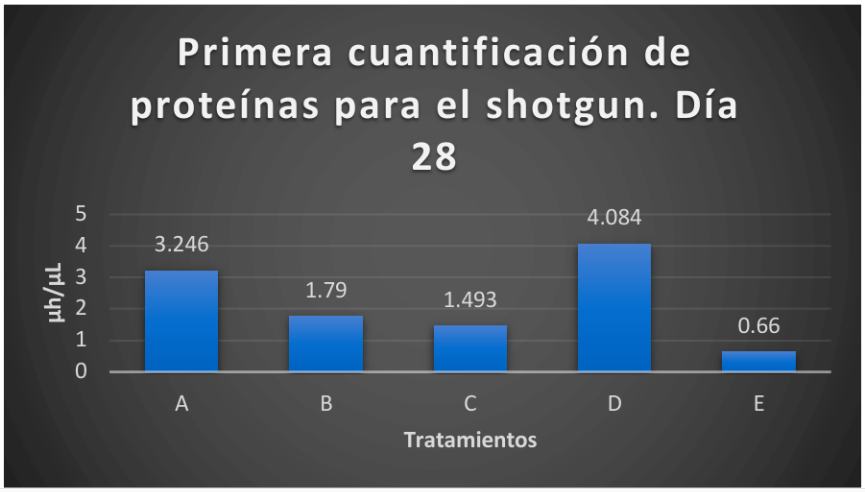


Figura 3.5. Promedios de la primera cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 28 después del tratamiento de alquilación de las muestras.

Las cantidades de proteína obtenida de cada uno de los tratamientos para el día 28 fueron, A: 3.246 µg μL^{-1}, B: 1.79 µg μL^{-1}, C: 1.493 µg μL^{-1}, D: 4.084 µg μL^{-1} y E: 0.66 µg μL^{-1} (Figura 3.5). En tanto que el volumen total de cada muestra fueron 173 µL, 200 µL, 245 µL, 60 µL y 400 µL. Con esta información se calculó la cantidad total de proteína con la que se contaba. Estas cantidades fueron 969 µg para el tratamiento A, 561.5 µg para el tratamiento B, 365.785 µg para el tratamiento C, 245.04 µg para el tratamiento D y 264 µg para el tratamiento E.

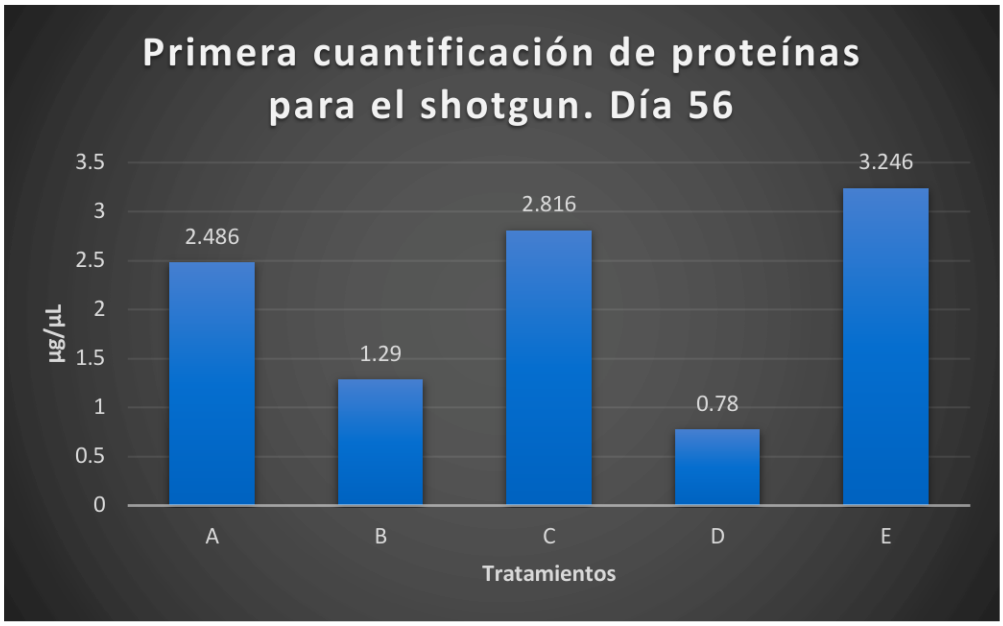


Figura 3.6. Promedios de la primera cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 56 después del tratamiento de alquilación de las muestras.

En el caso de las muestras colectadas el día 56 y después de ser alquiladas, la cantidad de proteína que se obtuvo de cada muestra fueron para la muestra A: 2.486 μg μL^{-1}, B: 1.29. μg μL^{-1}, C: 2.816 μg μL^{-1}, D: 0.78 μg μL^{-1} y E: 3.246 μg μL^{-1} (Figura 3.6). Los volúmenes de cada una de las muestras fueron 170 μL, 120 μL, 200 μL, 400 μL y 180 μL, respectivamente. De esta forma las cantidades totales de proteína fueron 329.35 μg para el tratamiento A, 422.62 μg para el tratamiento B, 563.2 μg para el tratamiento C, 312 μg para el tratamiento D y 584.28 μg para el tratamiento E.

Se realizó una segunda cuantificación de proteínas en el material resuspendido en 200 μL de amortiguador de bicarbonato de amonio adicionado con 0.1% de SDS. Los resultados se reportan en la figura 3.7. Se utilizaron 10 μL de cada una de las muestras por duplicado para su cuantificación.

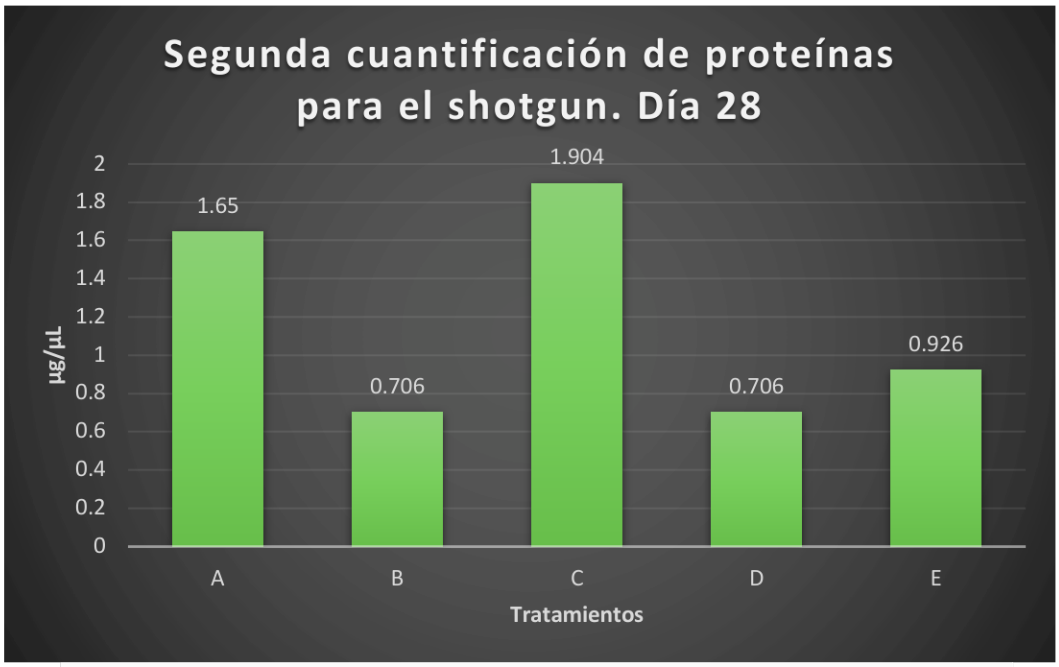


Figura 3.7. Promedios de la segunda cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 28 después de la resuspensión de las muestras en bicarbonato de amonio.

Para la segunda cuantificación de proteínas se obtuvieron los siguientes resultados para los cinco tratamientos en el día 28, A: 1.65 µg μL^{-1}, B: 0.706 µg μL^{-1}, C: 1.904 µg μL^{-1}, D: 0.706 µg μL^{-1} y E: 0.926 µg μL^{-1} (Figura 3.7). La cantidad total de proteína para cada una de las muestras fue A: 255.75 µg, B: 106.959 µg, C: 304 µg, D: 106.9 µg y E: 146.771 µg.

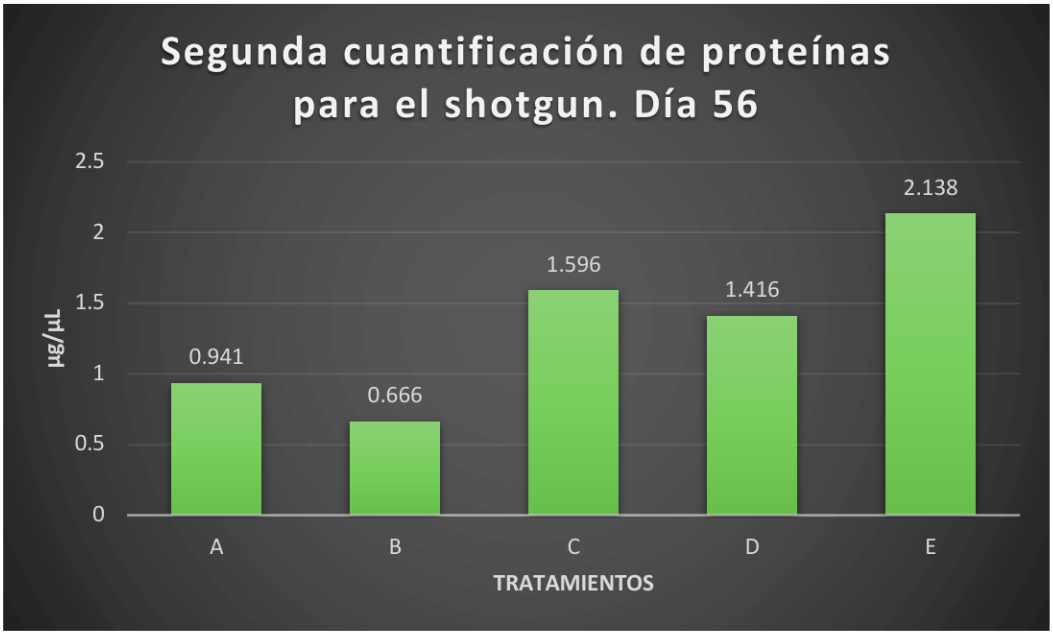


Figura 3.8. Promedios de la segunda cuantificación de proteínas en el medio de cultivo del día 56 después de la resuspensión de las muestras en bicarbonato de amonio.

Para la segunda cuantificación de proteínas se obtuvieron los siguientes resultados para los cinco tratamientos en el día 56, A: 0.941 µg μL^{-1}, B: 0.666 μL^{-1}, C: 1.596 μL^{-1}, D: 1.416 μL^{-1} y E: 2.138 μL^{-1} (Figura 3.8). La cantidad total de proteína para cada una de las muestras fue 159 µL, 150 µL, 167.5 µL, 165.5 µL y, 170 µL, respectivamente. La cantidad total de proteína para cada una de las muestras fue A: 149.619 µg, B: 100 µg, C: 267.33 µg, D: 237.18 µg y E: 363.46 µg.

3.5. Geles de primera dimensión

Para el análisis proteómico es muy importante estar seguros de la integridad de las proteínas. Con la cantidad de manipulaciones que se realizan existen muchas posibilidades de que las proteínas se degraden. Para determinar la calidad de las proteínas se realiza un gel de una dimensión. Como puede apreciarse en la figura 3.9 la calidad de las proteínas que se emplearon para el análisis proteómico tenía muy buena

calidad. Este gel corresponde a las proteínas secretadas por las muestras el día 28.

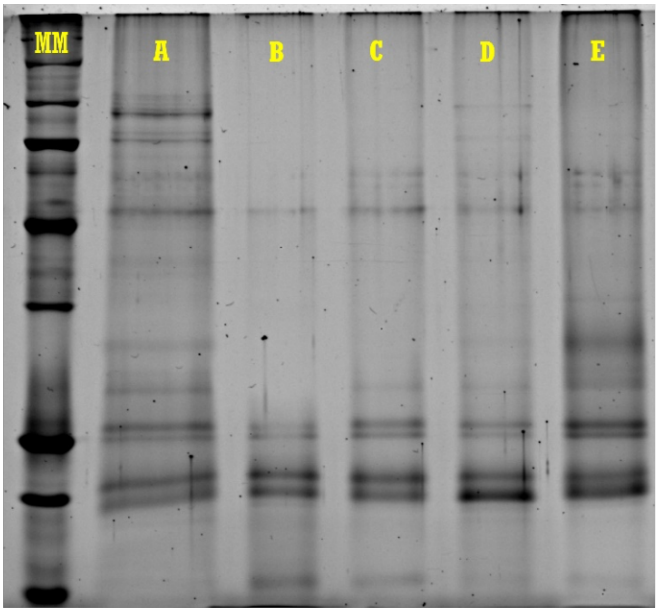


Figura 3.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida de proteínas alquiladas y reducidas de los cinco tratamientos (A-E) del día 28 después de la inducción de la embriogénesis somática. MM = marcadores moleculares. Este gel se realizó en el INECOL en el grupo del Dr. Eliel Ruíz-May de las muestras listas para ser inyectadas en el espectrómetro de masas.

Una electroforesis de una dimensión proporciona poca información sobre el material proteico de la muestra. Sin embargo, en este caso sólo se quería saber la calidad de la muestra, y si había muestra suficiente para su procesamiento. En ambos casos la respuesta es sí. También se puede apreciar que la mayor parte de las proteínas que se alcanzan a visualizar son comunes a los cinco tratamientos. Sin embargo, hay algunas bandas, particularmente en las muestras A y E que son únicas a esos tratamientos. Como era de esperarse, y dado que la muestra B se oxidó, ésta presenta un importante menor número de bandas (Figura 3.9).

3.6. Proteómica de los tejidos.

Además de determinar la cantidad de proteína del medio de cultivo, se realizó la proteómica de las muestras de tejido en hojas de las plántulas antes del pretratamiento, hojas al momento de la inducción de la ES y de los días 7 y 21 después de la inducción de la ES. Se analizaron de manera global las proteínas de rutas metabólicas en que los datos obtenidos pasaron el umbral de confianza. Las muestras analizadas, en esta primera etapa, fueron las del tratamiento testigo (C).

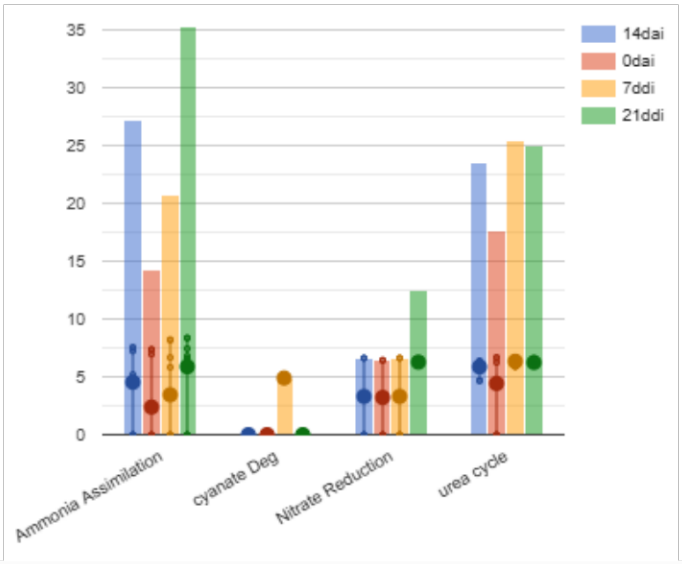


Figura 3.10. Proteínas de las rutas involucradas en el metabolismo del nitrógeno en las plantas. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

En la figura 3.10 podemos apreciar la dinámica del cambio de proteínas involucradas en el metabolismo del nitrógeno que nos proporciona el análisis proteómico. Esta es una primera visión global. Todas las proteínas involucradas en la asimilación del amonio, ya sea el amonio presente en el medio de cultivo, o el que se produce de la reducción del nitrato se encuentran presentes y en cantidades importantes. Al momento de la inducción de la ES hay una disminución de casi el 50% de las enzimas que forman la maquinaria de asimilación del amonio. Conforme transcurre el tiempo en el medio de inducción la maquinaria enzimática aumenta, hasta que 21 días después de la inducción hay un aumento de alrededor del 25%. En este primer análisis se ven todas juntas las enzimas que forman la ruta de asimilación del amonio (Figura 3.10).

El método que se empleó permite la identificación de cada una de las proteínas, a condición de que estén reportadas en alguna base de datos, aunque sea para otra especie. De esta forma se pudieron identificar dos glutamino sintetasas, la I y la II, dos glutamato sintasas (GOGAT) dependientes de ferredoxina, la 1 y la 2, así como una GOGAT dependiente de NADH y la ferredoxina (Figura 3.11). Esta proteína es una donadora de electrones para la GOGAT y otras proteínas que catalizan reacciones en la que se lleva a cabo una reducción. Las proteínas se identificaron por su homología con proteínas reportas que están presentes en *A. thaliana*.

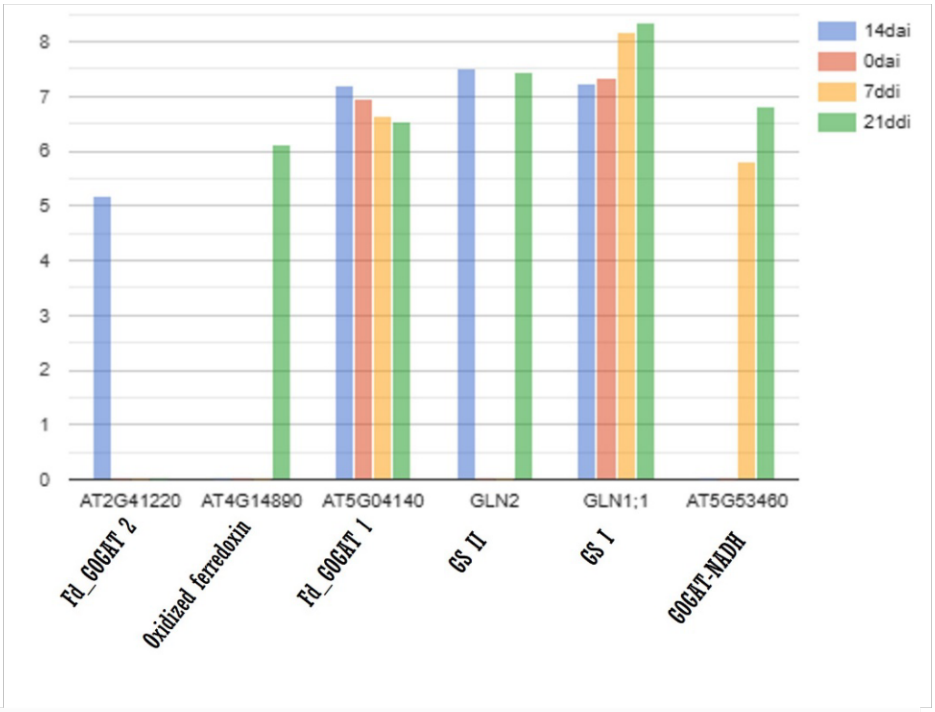


Figura 3.11. Enzimas involucradas en la asimilación primaria del amonio. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

La GOGAT 2 solo está presente en las plantas al inicio de su pretratamiento. En tanto que la GOGAT 1 está presente en las cuatro muestras estudiadas, prácticamente sin cambio. Lo mismo sucede con la GS1. Así que el mecanismo que convierte amonio en ácido glutámico está presente en forma completa. La GS2 sólo está presente al inicio del tratamiento y en el día 21, mientras que la GOGAT-NADH sólo está presente a partir del día 7 de la inducción de la ES (Figura 3.11).

Las proteínas que manejan el metabolismo del nitrato están presentes, pero no tiene cambio desde el inicio de pretratamiento hasta el día 21 cuando tiene un aumento significativo aumentando alrededor del 100% (Figura 3.10).

De las dos enzimas que participan en la conversión del nitrato en amonio se pudo identificar a la nitrito reductasa. Esta enzima convierte el nitrito en amonio. Se encuentra presente en los cuatro puntos de muestreo en una cantidad prácticamente igual (Figura 3.12). La presencia de la ferredoxina ya se mencionó en párrafos anteriores.

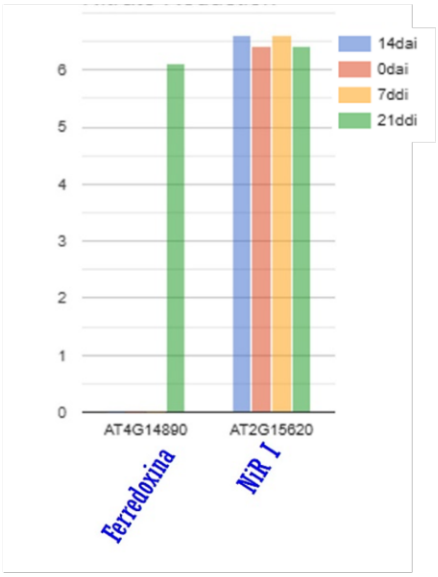


Figura 3.12. Enzimas involucradas en la asimilación primaria del nitrato. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

La maquinaria que maneja el ciclo de la urea en las plantas está presente en las muestras estudiadas prácticamente sin cambios, excepto por una pequeña disminución al inicio de la inducción de la ES (Figura 3.10).

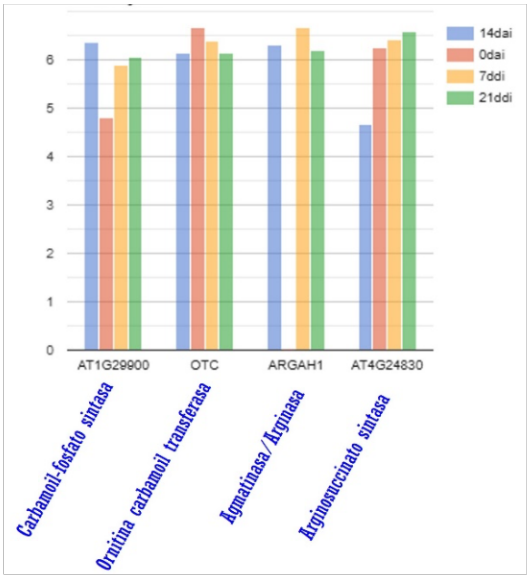


Figura 3.13. Enzimas involucradas en el ciclo de la urea. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

De las enzimas que conforman el ciclo de la urea en las plantas, se pudieron identificar

cuatro de ellas. La carbamoil-fosfato sintasa, la ornitina carbamoil transferase, la agmatinasa/arginasa y la arginosuccinato sintasa. Con la excepción de la agmatinasa/arginasa que no se encontró en el día de la inducción, todas las enzimas están presentes en los cuatro días de muestreo prácticamente sin cambio (Figura 3.13), si bien las cantidad detectada de todas ellas es baja cuando se les compara con las enzimas de las otras rutas del metabolismo del nitrógeno analizadas.

Las proteínas que participan en la degradación del cianato prácticamente no están presentes en los días estudiados, excepto por una ligera aparición, no significativa 7 días después de la inducción de la ES (Figura 3.10).

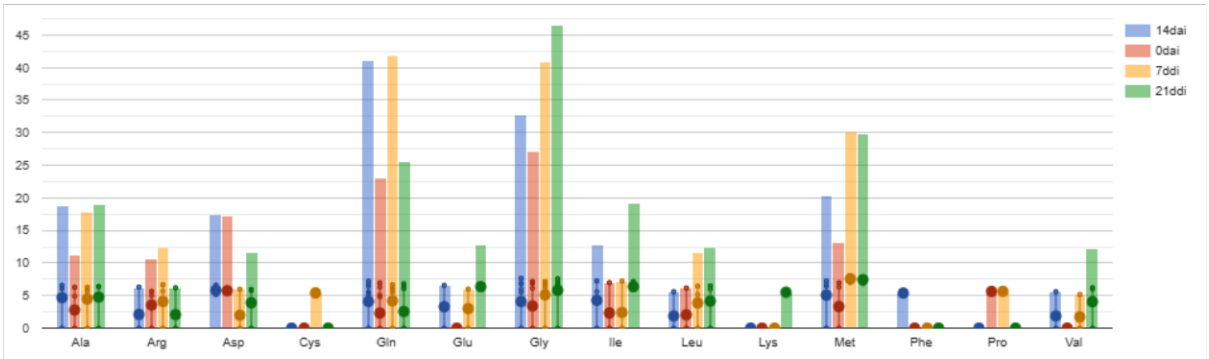


Figura 3.14. Enzimas involucradas en la degradación de los aminoácidos. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

Del mecanismo de degradación de los aminoácidos se pudo hacer el seguimiento de 14 de sus rutas de degradación (Figura 3.14). La abundancia de las proteínas varía bastante, desde muy abundantes para el manejo de la glutamina, la glicina y la metionina, hasta prácticamente no detectable como en el caso de la cisteína, la lisina, la fenilalanina y la prolina. Otras rutas se encuentran a medio camino como las proteínas involucradas en la degradación de la arginina, ácido aspártico, glutámico, isoleucina, leucina y valina.

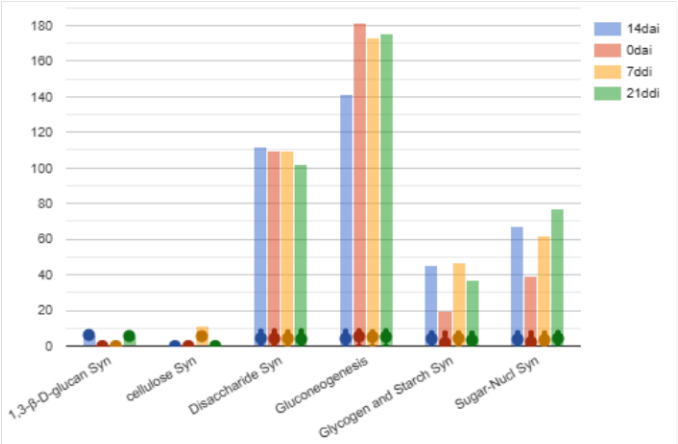


Figura 3.15. Biosíntesis de carbohidratos. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

La biosíntesis de carbohidratos es otra ruta central en el metabolismo de las células. El análisis de las rutas de este metabolismo arrojó resultados muy interesantes. Las enzimas involucradas en la biosíntesis de disacáridos y en gluconeogénesis están muy aumentadas (Figura 3.15). De hecho, son las proteínas que encontramos de manera más abundante en todo el estudio. También se encuentran muy abundantes las enzimas de las rutas de biosíntesis de almidón y de ribosas involucradas en la biosíntesis de las bases nitrogenadas. Cada una de estas rutas prácticamente no varían entre los días de muestreo, pero varían de manera significativa entre ellas.

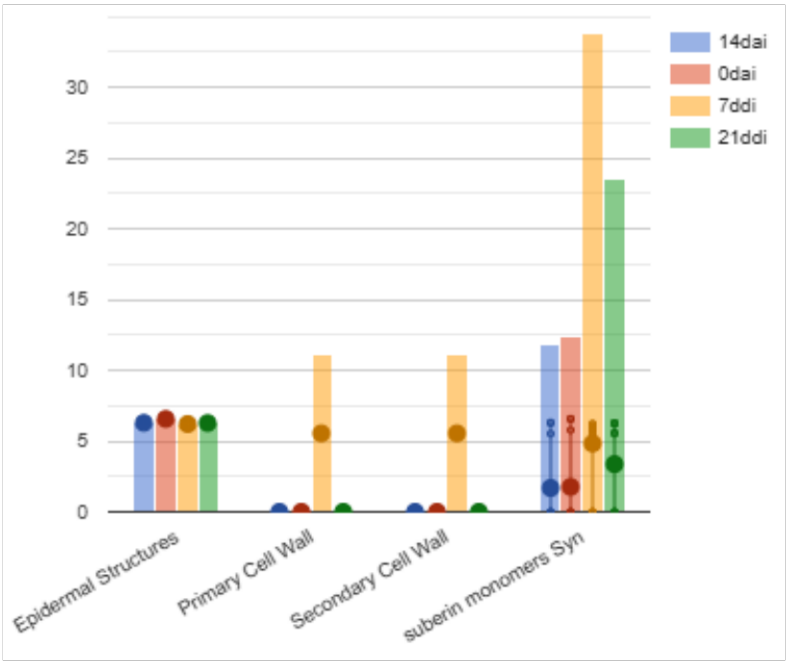


Figura 3.16. Biosíntesis de la estructura celular. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

La construcción de la pared celular, y las conexiones e interacciones que se dan entre las células vegetales a través de las diferentes capas que la conforman son vitales para el organismo, por esa razón analizamos el comportamiento de las enzimas que tienen que ver con su biosíntesis (Figura 3.16).

Las enzimas involucradas en la construcción de las estructuras epidérmicas están presentes a lo largo de todo el estudio de forma constante y sin variar. En tanto que las enzimas que sintetizan los bloques que construyen tanto la pared primaria, como la secundaria sólo tienen un aumento en el día siete después de la inducción de la ES. Las enzimas que llevan a cabo la síntesis de los monómeros de suberina se encuentran muy aumentados, en particular en los días siete y 21 después de la inducción de la ES (Figura 3.16).

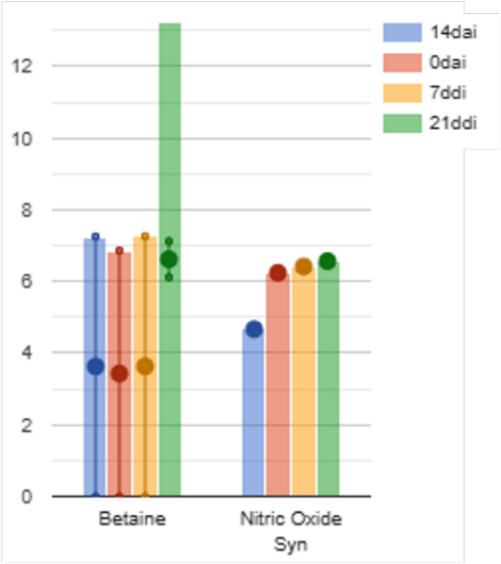


Figura 3.17. Biosíntesis de reguladores metabólicos. El eje de las ordenadas está expresado como Log2FC.

El último grupo de enzimas que analizamos fue el de la biosíntesis de dos reguladores metabólicos, la de la betaína (trimetilglicina) y la del óxido nítrico (Figura 3.17). Este último no sólo es un regulador metabólico, sino también es un importante regulador del crecimiento. Las enzimas de la biosíntesis de la betaína se encuentran activas desde el que la plantulita se coloca en el pretratamiento y se mantiene en los mismos niveles hasta el día 7 después de la inducción de la ES. Esta ruta tiene un aumento del 100% el día 21 después de la inducción de la ES (Figura 3.17).

La maquinaria enzimática de síntesis del óxido nítrico se encuentra presente en niveles semejantes a los de las enzimas de la biosíntesis de la betaína a lo largo de todo el estudio (Figura 3.17).

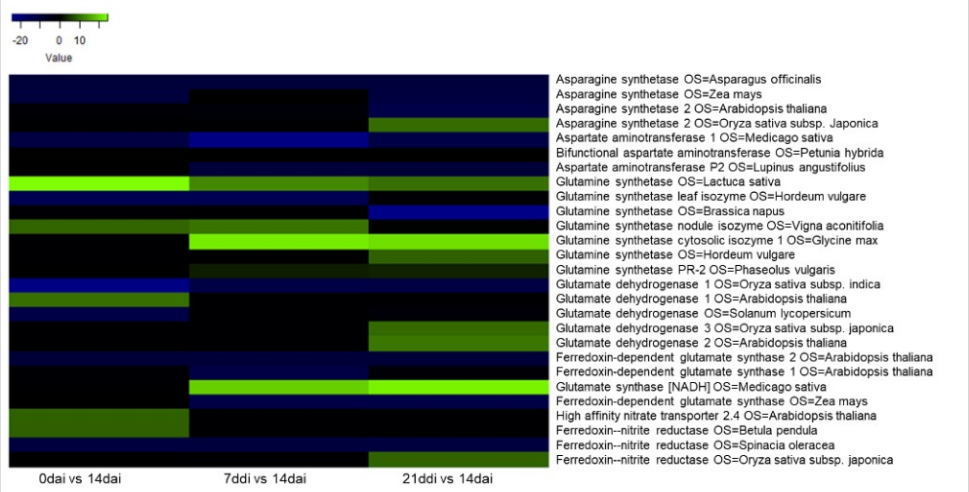


Figura 3.18. Mapa de calor de las enzimas del metabolismo nitrogenado primario.

Los datos obtenidos durante el análisis proteómico permiten la comparación de proteínas individuales a lo largo del estudio. En este caso comparamos el comportamiento en la cantidad de proteína de algunas de las enzimas involucradas en la asimilación primaria del nitrógeno y de la asparagina sintetasa y aspartato aminotransferasa. Las enzimas del metabolismo primario del nitrógeno que analizamos fueron la glutamino sintetasa, la glutamato deshidrogenasa, la nitrito reductasa y un transportador de alta afinidad para el nitrato (Figura 3.18). Estas proteínas suman un total de 27 proteínas.

Los mayores cambios observados se pueden documentar para la glutamino sintetasa 1 (GS 1), la cual es una isoenzima citosólica. Esta enzima aumenta de manera importante a partir del día 7 después de la inducción de la ES. La otra enzima que aumenta, y lo hace exactamente de la misma manera que la GS1, es la glutamato sintasa dependiente de NADH (Figura 3.18). Este hecho es muy importante, porque la GS y la GOGAT forman un ciclo para que el amonio se convierta en ácido glutámico. La GS cataliza la conversión del amonio en glutamina, utilizando al ácido glutámico como el sustrato aceptor del amonio, y la GOGAT cataliza la conversión del α-cetoglutarato y la glutamina en dos moléculas de ácido glutámico utilizando, en este caso, el NADH como el agente reductor.

Hay otras seis proteínas que aumentan el día 21 en comparación con el día -14 (cuando

las plantas se colocan en el pre-tratamiento). Son la asparagina sintetasa 2, dos de las enzimas de la GS diferente a la GS 1, las GDH 2 y 3, así como la nitrito reductasa dependiente de ferredoxina (Figura 3.18).

CAPÍTULO IV

Discusión

Desde el descubrimiento de la ES se vio el gran potencial que tenía en dos campos de la investigación en Biología, su aplicación como herramienta biotecnológica para la producción masiva de plantas y su uso como modelo de investigación para estudiar el desarrollo de los embriones. Hasta ahora ambas expectativas solo se han cumplido parcialmente. Si bien la ES ya se usa comercialmente para producir plantas, no se ha explotado en todo su potencial. Esto tiene que ver sobre todo por el hecho de que la forma en que se aborda el establecimiento de los protocolos es empírica. Esto consume tiempo y recursos y no rinde los resultados esperados. En la parte del estudio del desarrollo de los embriones se han hecho avances muy importantes, sin embargo, aún desconocemos la señal y el mecanismo que dicha señal desencadena para que una célula somática se convierta en un embrión que dará origen a una planta sana y vigorosa.

El estudio presentado en esta investigación aborda varios aspectos que se han informado particularmente usando zanahoria como modelo. El efecto de la fuente nitrogenada en el proceso morfogénico, la presencia de proteínas en el medio de cultivo, así como los cambios en el patrón de proteínas que se lleva a cabo en los tejidos al pasar de células somáticas a un tejido que produce embriones.

Nuestros resultados muestran que la fuente de nitrógeno modifica sustancialmente la respuesta embriogénica como se ha reportado en otros modelos (Duarte-Aké et al., 2022; Kamada & Harada, 1984). Es un hecho notable que el amonio como única fuente de nitrógeno no permite la formación de embriones somáticos (Figuras 3.1 y 3.2), pero combinado con nitrato produce una mejor y mayor respuesta que con nitrato como única fuente de nitrógeno. Sabemos que el amonio en los medios de cultivo, al ser adsorbido por las células provoca una acidificación del medio de cultivo (Mihaljevic et al., 2011; Rose & Martin, 1975). Cuando es la única fuente de nitrógeno, es posible que esta acidificación del medio provoque la muerte de los explantes. También sabemos que el amonio es un tóxico muy poderoso ya que desacopla la fosforilación oxidativa, tanto en las mitocondrias como en los cloroplastos, provocando de esta manera la muerte de las células (Hachiya et al., 2021; Mihaljevic et al., 2011). Entonces ¿por qué no daña a las células cuando se encuentra presente el nitrato y por el contrario produce mayores rendimientos en la

obtención de embriones somáticos? La respuesta parece estar en el hecho de que al tomarse el nitrato el medio se alcaliniza, neutralizando la acidificación provocada previamente por el amonio (Nic-Can et al., 2013; Sánchez-Teyer et al., 2003).

También es posible que sea el metabolismo del nitrato y del amonio lo que provoca el cambio en la respuesta embriogénica. De hecho, desde muy temprano en la investigación de la ES se descubrió que se requiere de ambas fuentes de nitrógeno para que el proceso sea eficiente y que ninguna de las dos fuentes de nitrógeno por separado iguala la respuesta de las dos fuentes combinadas (Reinert et al., 1967; Wetherell & Dougall, 1976). Nuestros datos indican que cuando se tiene una relación 2:1 en la fuente de nitrógeno hay una activa participación de las enzimas de asimilación del nitrógeno (Figuras 3.10-3.12) indicando una síntesis muy activa de ácido glutámico y glutamina, los primeros dos productos de la asimilación de la fuente de nitrógeno. Datos similares para la enzima GS han sido obtenidos em zanahoria por los grupos de Higashi et al. (1998) y Joy (1996) y en *Agyrolobium roseum* por Habib et al. (2015). Si bien aún falta mucha información, empieza a surgir un patrón de cómo la fuente de nitrógeno puede estar influyendo el cambio en el patrón morfogénico.

Si bien nuestro estudio no incluye el papel de los reguladores del crecimiento, datos recientes de nuestro laboratorio sugieren que la respuesta al cambio en la fuente de nitrógeno también altera el patrón endógeno de auxinas y citocininas. Así es que es posible que al final la respuesta sea una combinación de compuestos del metabolismo nitrogenado combinados con una alteración en el patrón de reguladores del crecimiento.

Otro aspecto importante que resalta de los datos obtenidos en esta investigación, además del total de embriones somáticos obtenidos, es el de que cuando se utiliza sólo nitrato como fuente de nitrógeno sólo se obtienen embriones en el estadio globular (Figura 3.2). Este es un punto central para tratar de elucidar el mecanismo mediante el cual la fuente de nitrógeno modifica la respuesta morfogénica. Si el nitrato permite la formación de una gran cantidad de embriones somáticos en el estadio globular, pero ya no se desarrollan más allá de este estadio, un análisis detallado de todos los aspectos bioquímicos y moleculares podrían indicarnos el camino a seguir. Esto es relevante porque en otros sistemas, o en cafeto bajo otras condiciones de inducción de la ES si se pueden obtener embriones somáticos (Fuentes-Cerda et al., 2001; Neumann, 1966).

Desde luego el problema es más complejo. En *Cucurbita pepo* cuando se utiliza amonio

como única fuente de nitrógeno el crecimiento del tejido es lento y provoca una acidificación considerable del medio de cultivo. Se produce una masa proembriogénica de células esféricas pequeñas con citoplasma denso que no pueden convertirse en embriones cotiledonares. Los embriones en estadios avanzados solo se desarrollaron después de un reabastecimiento de nitrógeno en forma de nitrato o L-glutamina Mihaljevic et al. (2011). Este resultado muestra lo complejo del proceso en estudio.

Nuestros datos muestran que los explantes secretan proteína al medio de cultivo y que esta secreción varía con la fuente de nitrógeno empleada (Figuras 3.4 y 3.5). A los 56 días de cultivo la cantidad secretada por los explantes varía un poco más del 25% entre los tratamientos más extremos. En todos los casos la cantidad de proteína secretada alcanza valores totales importantes. Será crucial identificar todas las proteínas secretadas y ver si caen en las categorías reportadas para zanahoria, en particular el grupo de quitinasas, o si son diferentes. También será central determinar las variantes entre los diferentes tratamientos.

El análisis proteómico de los tejidos del tratamiento testigo muestra la dinámica que se está llevando a cabo dentro de ellos en respuesta a la inducción de la ES (Figuras 3.10 – 3.18). Todos los análisis realizados muestran cambios importantes en la cantidad de enzima. Aquí es importante señalar que el siguiente paso deberá ser la medida de algunas de las actividades enzimáticas.

Es alentador ver como enzimas que funcionan en ciclos metabólicos, como la GS/GOGAT aumentan en forma paralela (Figuras 3.11 y 3.18). También es importante que los mecanismos que controlan los productos de estas dos enzimas también se encuentran muy activos (Figura 3.14). Probablemente el aspecto que más resalta, y que tiene mucha lógica bioquímica, es el de que no todas las isoenzimas de una de las enzimas están modificadas a la alza. Tanto la GS, la GOGAT y la GDH tienen varias isoenzimas, las cuales funcionan en diferentes tejidos o bajo diferentes condiciones metabólicas (Kishorekumar et al., 2020; Kumari et al., 2022; Liyaqat Nahvi & Khurshid, 2022; Taria et al., 2022; Valderrama-Martín et al., 2022; Wani et al., 2022). Así podemos ver que sólo alguna de ellas es la que responde a la condición en estudio.

Una ausencia importante en la identificación de proteínas que se hizo es la de la nitrato reductasa. Solo vimos a la segunda enzima de la vía, la nitrito reductasa. Este es un punto que deberá abordase a la brevedad. Es posible que la enzima está en el tejido, pero

la técnica que usamos solo mide las veces de cambio en la cantidad de proteína. Si la proteína no cambia de cantidad no la vamos a ver. Será importante reanalizar los datos para determinar si está presente y lo que pasa es que no cambia de cantidad. Esta es otra razón por lo cual se deben validar los datos proteómicos con la medida de las actividades enzimáticas.

CAPÍTULO V

5.1. Conclusiones

En resumen, podemos concluir que

- ✓ Los explantes secretan una gran cantidad de proteínas al medio de cultivo.
- ✓ El patrón de proteínas secretadas al medio de cultivo varía con la fuente nitrogenada presente en el medio de cultivo.
- ✓ Hay cambios importantes en el proteoma de los tejidos durante el pretratamiento y conforme se inicia el proceso morfogénico.

5.2. Perspectivas

Nuestro trabajo ha abierto la puerta a un número importante de perspectivas. Por ejemplo, será muy importante continuar con algunas de las siguientes acciones,

- ✓ Identificar la totalidad de los proteínas secretadas al medio de cultivo en cada uno de los tratamientos.
- ✓ Completa la identificación de la totalidad de los proteínas en los tejidos en cada uno de los tratamientos.
- ✓ Realizar el estudio morfo-histológico del proceso de ES en presencia de las diferentes fuentes de nitrógeno.
- ✓ Determinar la poza de los aminoácidos durante el proceso de ES.
- ✓ Medir las actividades enzimáticas de las enzimas que se vea que tienen los mayores cambios, como la GS, GOGAT y GDH.

BIBLIOGRAFÍA

Aloni, R. (2021). Importance of NO_3^- and PO_4^- for development, differentiation, and competition. In R. Aloni (Ed.), *Vascular Differentiation and Plant Hormones*, 97-99. Springer.

Anagbogu, C. F., Zhou, J., Olasupo, F. O., Baba Nitsa, M., & Beckles, D. M. (2021). Lipidomic and metabolomic profiles of Coffea canephora L. beans cultivated in Southwestern Nigeria. *PLoS ONE*, *16*.

Anthony, F., Combes, M. C., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G., & Lashermes, P. (2002). The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, *104*, 894-900.

Aponte, A. M. E. (1993). Somatic embryogenesis induced by culture on single media in coffee plants crosses of *Coffea arabica* by timor hybrid. In *15è Colloque Scientifique International sur le Café* (pp. 82-88). Association Scientifique Internationale du Café.

Arimarsetiowati, R. (2017). Embryo germination development of *Coffea arabica* L. at various media composition, subcultures stages and embryo size. *Pelita Perkebunan*, *33*(3), 156-167.

Arondel, V., & Kader, J.-C. (1990). Lipid transfer in plants. *Experientia*. 46(6), 579-585.

Avila-Victor, C. M., Ordaz-Chaparro, V. M., Arjona-Suárez, E. D., Iracheta-Donjuan, L., Gómez-Merino, F. C., & Robledo-Paz, A. (2023). *In vitro* mass propagation of coffee plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through indirect somatic embryogenesis. *Plants*, *12*(6), 1237.

Awada, R., Lepelley, M., Breton, D., Charpagne, A., Campa, C., Berry, V., Georget, F., Breitler, J. C., Léran, S., Djerrab, D., Martinez-Seidel, F., Descombes, P., Crouzillat, D., Bertrand, B., & Etienne, H. (2023). Global transcriptome profiling reveals differential regulatory, metabolic and hormonal networks during somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *BMC Genomics*, *24*(1), 41.

Balotf, S., Kavoosi, G., & Kholdebarin, B. (2016). Nitrate reductase, nitrite reductase, glutamine synthetase, and glutamate synthase expression and activity in response to different nitrogen sources in nitrogen-starved wheat seedlings. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *63*(2), 220-229.

Barrea, L., Pugliese, G., Frias-Toral, E., El Ghoch, M., Castellucci, B., Chapela, S. P., Carignano, M. L. A., Laudisio, D., Savastano, S., Colao, A., & Muscogiuri, G. (2023). Coffee consumption, health benefits and side effects: a narrative review and update for dietitians and nutritionists. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, *63*(9), 1238-1261.

Bartos, P. M. C., Gomes, H. T., do Amaral, L. I. V., Teixeira, J. B., & Scherwinski-Pereira,

J. E. (2018). Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *3 Biotech*, *8*, 209.

Ben-Amar, A. (2021). Secretome-derived cultured cell system: Overview towards extracellular protein characterization and biotechnological applications. *Journal of Basic & Applied Sciences*, *17*, 13-24.

Berthouly, M., Dufour, M., Alvard, D., Carasco, C., Alemanno, L., & Teisson, C. (1995). Coffee micropropagaction in a liquid medium using the temporary immersion technique. In *16è Colloque Scientifique International sur le Café* (pp. 514-519). Association Scientifique Internationale du Café.

Bhuyan, S., & Bordoloi, R. (2019). Expression of extracellular proteins in somatic embryogenesis of plants. *Int. J. Pharm. Sci. Invent*, *8*, 1-7.

Bieysse, D., Gofflot, A., & Michaux-Ferrière, N. (1993). Effect of experimental conditions and genotypic variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Canadian Journal of Botany*, *71*(11), 1496-1502.

Blanckaert, A., Belingheri, L., Sautiere, P. E., Vasseur, J., & Hilbert, J. L. (2002). 9-kDa acidic and basic nsLTP-like proteins are secreted in the culture-medium conditioned by somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *40*(4), 339-345.

Borderies, G., le Bechec, M., Rossignol, M., Lafitte, C., Le Deunff, E., Beckert, M., Dumas, C., & Matthys-Rochon, E. (2004). Characterization of proteins secreted during maize microspore culture: arabinogalactan proteins (AGPs) stimulate embryo development. *European Journal of Cell Biology*, *83*(5), 205-212.

Boyer, C., Hilbert, J.-L., & Vasseur, J. (1993). Embryogenesis-related protein synthesis and accumulation during early acquisition of somatic embryogenesis competence in Cichorium. *Plant Science*, *93*(1), 41-53.

Cairney, J., & Pullman, G. S. (2007). The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytologist*, *176*(3), 511-536.

Candeira da Silva, C. K., & Alves dos Santos, R. M. (2022a). Induction of somatic embryos in Robusta and Conilon varieties of *Coffea canephora*. *International Journal of Development Research*, *12*(10), 59734-59737.

Candeira da Silva, C. K., & Alves dos Santos, R. M. (2022b). Optimization of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *International Journal of Development Research*, *12*(10), 59738-59740.

Carlberg, I., Söderhäll, K., Glimelius, K., & Eriksson, T. (1984). Protease activities in non-embryogenic and embryogenic carrot cell strains during callus growth and embryo formation. *Physiologia Plantarum*, *62*, 458-464.

Carlsson, J., Svennerstam, H., Moritz, T., Egertsdotter, U., & Ganeteg, U. (2017). Nitrogen uptake and assimilation in proliferating embryogenic cultures of Norway spruce-Investigating the specific role of glutamine. *PLoS ONE*, *12*(8), e0181785.

Charrier, A., & Berthaud, J. (1985). Botanical classification of coffee. In M. N. Clifford & K. C. Wilson (Eds.), *Coffee Botany, Biochemistry and Production of Beans and Beverage* (pp. 13-47). Springer.

Chibbar, R. N., Plowick, P. L., Newsted, W. J., Shyluk, J., & Goerges, F. (1989). Identification and isolation of a unique esterase from the medium of non-embryogenic cell line of cultured carrot cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *18*(1), 47-53.

Cho, W. K., Chen, X. Y., Chu, H., Rim, Y., Kim, S., Kim, S. T., Kim, S.-W., Park, Z.-Y., & Kim, J.-Y. (2009). Proteomic analysis of the secretome of rice calli. *Physiologia Plantarum*, *135*(4), 331-341.

Chugh, A., & Khurana, P. (2002). Gene expression during somatic embryogenesis –recent advances. *Current Science*, *83*(6), 715-730.

Cid, L. P. B., Cruz, A. R. R., & Castro, L. H. R. (2004). Somatic embryogenesis from three coffee cultivars: 'Rubi', 'Catuai Vermelho 81', and IAPAR 599'. *HortScience*, *39*(1), 130-131.

Cordewener, J., Booij, H., Van der Zandt, H., Van Engelen, F. A., Van Kammen, A., & De Vries, S. C. (1991). Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, *184*(4), 478-486.

Coutos-Thévenot, P., Maes, O., Jouenne, T., Mauro, M. C., Boulay, M., Deloire, A., & Guern, J. (1992). Extracellular protein pattern of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Science*, *86*, 137-145.

Crawford, N. M. (1995). Nitrate: nutrient and signal for plant growth. *The Plant Cell*, *7*(7), 859-868.

Das, P. (2011). In Vitro Somatic Embryogenesis in Some Oil Yielding Tropical Tree Species. *American Journal of Plant Sciences*, *02*(02), 217-222.

Davis, A. P., Govaerts, R., Bridson, D. M., & Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *152*(4), 465-512.

Davis, A. P., Tosh, J., Ruch, N., & Fay, M. F. (2011). Growing coffee: *Psilanthus* (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of *Coffea*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, *167*(4), 357-377.

de Almeida, J. A. S., Neofiti, W. C. F., Marchiori, P. E. R., & Giomo, G. S. (2024). Direct somatic embryogenesis on *Coffea arabica* L. explants previously subjected to water restriction. *Scientia Plena*, *20*(10), 1-10.

De Angeli, A., Monachello, D., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., Thomine, S., Gambale, F., & Barbier-Brygoo, H. (2006). The nitrate/proton antiporter AtClCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature*, *442*(7105), 939-942.

De Jong, A. J., Cordewener, J., LoSchiavo, F., Terzi, M., Vandekerckhove, J., Van Kammen, A., & De Vries, S. C. (1992). A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *The Plant Cell*, *4*(4), 425-433.

De Jong, A. J., Hendriks, T., Meijer, E. A., Penning, M., LoSchiavo, F., Terzi, M., Van Kammen, A., & De Vries, S. C. (1995). Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant *ts11*. *Devel. Genet*, *16*(4), 332-343.

de la Torre, F., Cañas, R. A., Pascual, M. B., Avila, C., & Cánovas, F. M. (2014). Plastidic aspartate aminotransferases and the biosynthesis of essential amino acids in plants. *Journal of Experimental Botany*, *65*(19), 5527-5534.

De los Santos-Briones, C., & Hernández-Sotomayor, S. M. T. (2006). Coffee biotechnology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*(1), 217-227.

de Morais Oliveira, J. P., da Silva, A. J., Neves Catrinck, M., & Ronildo Clarindo, W. (2023). Embryonic abnormalities and genotoxicity induced by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid during indirect somatic embryogenesis in Coffea. *Scientific Reports*, *13*(1), 9689.

De Vries, S. C., Booij, H., Janssens, R., Vogels, R., Saris, L., LoSchiavo, F., Terzi, M., & Van Kammen, A. (1988). Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Genes & Development*, *2*(4), 462-476.

Domon, J.-M., Dumas, B., Lainé, E., Meyer, Y., David, A., & David, H. (1995). Three clycosylated polypeptides secreted by several embryogenic cell cultures of Pine show highly specific serological affinity to antibodies directed against the wheat germin apoprotein monomer. *Plant Physiology*, *108, 141-148*.

Domon, J. M., Neutelings, G., Roger, D., David, A., & David, H. (2000). A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribaea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. *Journal of Plant Physiology*, *156*(1), 33-39.

Dong, J.-Z., & Dunstan, D. I. (1997). Endochitinase and β-1,3-glucanase genes are developmentally regulated during somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Planta*, *201*(2), 189-194.

Duarte-Aké, F., Monroy-González, Z., Borbolla-Pérez, V., & Loyola-Vargas, V. M. (2022). The source, level, and balance of nitrogen during the somatic embryogenesis process drive cellular differentiation. *Planta*, *256*(6), 113.

Dublin, P. (1981). Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, *25*(4), 237-242.

Ducos, J. P., Zamarripa, C. A., Eskes, A. B., & Pétiard, V. (1993). Production of somatic embryos of coffee in a bioreactor. In *15è Colloque Scientifique Internationale sur le Café* (pp. 89-96). Association Scientifique Internationale du Café.

Dyachok, J. V., Wiweger, M., Kenne, L., & Von Arnold, S. (2002). Endogenous nod-factor-like signal molecules promote early somatic embryo development in Norway spruce. *Plant Physiology*, *128*(2), 523-533.

Egertsdotter, U., & Von Arnold, S. (1995). Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiologia Plantarum*, *93*(2), 334-345.

Encina, C. L., Hamdi, A., Rodríguez-Arcos, R., Jiménez-Araujo, A., Regalado, J. J., & Guillén-Bejarano, R. (2024). Effect of arabinogalactans on induction of white-opaque somatic embryos of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Duke-7. *Plants*, *13*(1), 37.

Etienne, H., Bertrand, B., Anthony, F., Cote, F., & Berthouly, M. (1997). L'embryogenese somatique: un outil pour l'amélioration génétique du caféier. In *17è Colloque Scientifique Internationale sur le Café* (17 ed., pp. 457-465). Association Scientifique Internationale du Café.

Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E., Verdeil, J. L., & Barry-Etienne, D. (2013). Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*, *33*(6), 640-653.

Ferreira, T., Shuler, J., Guimardes, R., & Farah, A. (2019). Introduction to coffee plant and genetics. In A. Farah (Ed.), *Coffee: Production, Quality and Chemistry* (pp. 3-25). The Royal Society of Chemistry.

Filipecki, M. K., & Przybecki, Z. (1994). Marker proteins of somatic embryogenesis in cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Plant Genetics*, *35*, 1-9.

Fuentes-Cerda, C. F. J., Monforte-González, M., Méndez-Zeel, M., Rojas-Herrera, R., & Loyola-Vargas, V. M. (2001). Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by nitrogen source. *Biotechnology Letters*, *23*(6), 1341-1343.

Gamborg, O. L., Miller, R. A., & Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res*, *50*(1), 151-158.

Gavish, H., Vardi, A., & Fluhr, R. (1991). Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. *Physiologia Plantarum*, *82*, 606-616.

Gavish, H., Vardi, A., & Fluhr, R. (1992). Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta*, *186*(4), 511-517.

Gibson, M., & Newsham, P. (2018). Tea and Coffee. En Mark Gibson & Pat Bewsham (Ed.), MaIn *Food Science and the Culinary Arts*. (pp. 353-372) Academic Press.

Gomez-Garay, A., Lopez, J. A., Camafeita, E., Bueno, M. A., & Pintos, B. (2013). Proteomic perspective of *Quercus suber* somatic embryogenesis. *Journal of Proteomics*, *93*, 314-325.

Gupta, S., Wardhan, V., Verma, S., Gayali, S., Rajamani, U., Datta, A., Chakraborty, S., & Chakraborty, N. (2011). Characterization of the secretome of chickpea suspension culture reveals pathway abundance and the expected and unexpected secreted proteins. *Journal of Proteome Research*, *10*(11), 5006-5015.

Habib, D., Zia, M., Bibi, Y., Abbasi, B. H., & Chaudhary, M. F. (2015). Response of nitrogen assimilating enzymes during *in vitro* culture of *Agyrolobium roseum*. *Biologia*, *70*(4), 478-485.

Hachiya, T., Inaba, J., Wakazaki, M., Sato, M., Toyooka, K., Miyagi, A., Kawai-Yamada, M., Sugiura, D., Nakagawa, T., Kiba, T., Gojon, A., & Sakakibara, H. (2021). Excessive ammonium assimilation by plastidic glutamine synthetase causes ammonium toxicity in Arabidopsis thaliana. *Nature Communications*, *12*(1).

Helleboid, S., Bauw, G., Belingheri, L., Vasseur, J., & Hilbert, J. L. (1998). Extracellular β-1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta*, *205*(1), 56-63.

Hernández-Castellano, S., Loyola-Vargas, V. M., de Folter, S., & De-la-Peña, C. (2022). MiRNA expression analysis during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *150*(1), 177-190.

Higashi, K., Shiota, H., & Kamada, H. (1998). Patterns of expression of the genes for glutamine synthetase isoforms during somatic and zygotic embryogenesis in carrot. *Plant and Cell Physiology*, *39*(4), 418-424.

Higdon, J. V., & Frei, B. (2006). Coffee and health: a review of recent human research. *Critical Reviews in Food Science Nutrition*, *46*(2), 101-123.

Hilbert, J.-L., Dubois, T., & Vasseur, J. (1992). Detection of embryogenesis-related proteins during somatic embryo formation in Cichorium. *Plant Physiology and Biochemistry*, *30*(6), 733-741.

Hiraga, S., Sasaki, K., Ito, H., Ohashi, Y., & Matsui, H. (2001). A large family of class III plant peroxidases. *Plant and Cell Physiology*, *42*(5), 462-468.

Ibrahim, M. S. D., Hartati, R. S., Rubiyo, R., Reflinur, R., Purwito, A., & Sudarsono, S. (2024). Exploring indirect somatic embryogenesis and somaclonal variation for propagation of three *Coffea arabica* L. cultivars. *Chilean Journal of Agricultural Research*, *84*(1), 15-27.

ICO [International Coffee Organitation] . (2025). Trade Statistics. Available online at: http://www.ico.org/trade_statistics.asp (Accessed January 2025). *ICO*.

Johnson, B. (2022). The Scientification of Agriculture. In *Making Ammonia Fritz Haber, Walther Nernst, and the Nature of Scientific Discovery*. (pp. 9-28). Springer.

Joy, R. W., McIntyre, D. D., Vogel, H. J., & Thorpe, T. A. (1996). Stage-specific nitrogen metabolism in developing carrot somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, *97*(1), 149-159.

Kalaipandian, S., Mu, Z., Kong, E. Y. Y., Biddle, J., Cave, R., Bazrafshan, A., Wijayabandara, K., Beveridge, F. C., Nguyen, Q., & Adkins, S. W. (2021). Cloning coconut via somatic embryogenesis: A review of the current status and future prospects. *Plants*, *10*(10), 2050.

Kamada, H., & Harada, H. (1984). Studies on nitrogen metabolism during somatic embryogenesis in carrot. I. Utilization of α-alanine as a nitrogen source. *Plant Science Letters*, *33*(1), 7-13.

Kim, G., & Sung, J. (2023). Transcriptional Expression of Nitrogen Metabolism Genes and Primary Metabolic Variations in Rice Affected by Different Water Status. *Plants*, *12*(8), 1649.

King, B. J., Siddiqi, M. Y., Ruth, T. J., Warner, R. L., & Glass, A. (1993). Feedback Regulation of Nitrate Influx in Barley Roots by Nitrate, Nitrite, and Ammonium. *Plant Physiology*, *102, 1279-1286*.

Kishorekumar, R., Bulle, M., Wany, A., & Gupta, K. J. (2020). An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants. In K. J. Gupta (Ed.), *Nitrogen Metabolism in Plants: Methods and Protocols* (pp. 1-13). Springer.

Kragh, K. M., Hendriks, T., De Jong, A. J., LoSchiavo, F., Bucherna, N., Hojrup, P., Mikkelsen, J. D., & De Vries, S. C. (1996). Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Molecular Biology*, *31*(3), 631-645.

Kreuger, M., & Van Holst, G. (1995). Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, *197*, 135-141.

Kreuger, M., & Van Holst, G. J. (1993). Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, *189*(2), 243-248.

Kumar, P., Eriksen, R. L., Simko, I., Shi, A., & Mou, B. (2022). Insights into nitrogen metabolism in the wild and cultivated lettuce as revealed by transcriptome and weighted gene co-expression network analysis. *Scientific Reports*, *12*(1), 9852.

Kumari, R., Bhatnagar, S., & Kalra, C. (2022). Nitrogen assimilation in plants. In P. Y. Yousuf, P. A. Shabir, & K. R. Hakeem (Eds.), *Advances in Plant Nitrogen Metabolism* (pp. 36-54). CRC Press.

Kurczynska, E., Gaj, M., Ujczak, A., & Mazur, E. (2007). Histological analysis of direct somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta*, *226*(3), 619-628.

Kwinta, J., & Bielawski, W. (1998). Glutamate dehydrogenase in higher plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, *20*(4), 453-463.

Lal, S. K., Gaggar, P., Kumar, S., Mallikarjuna, M. G., Vishwakarma, C., Rakshit, S., Pandey, A., Achary, V. M. M., & Mehta, S. (2024). Recent advancements in nitrogen use efficiency in crop plants achieved by genomics and targeted genetic engineering approaches. *Plant Molecular Biology Reporter*, *42*(3), 435-449.

Lanaud, C. (1981). Production of *Coffea canephora* plantlets by somatic embryogenesis obtained by *in vitro* culture of ovules. *Café Cacao Thé*, *XXV*(4), 231-236.

Lane, B. G., Dunwell, J. M., Ray, J. A., Schmitt, M. R., & Cuming, A. C. (1993). Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *Journal of Biological Chemistry*, *268*(17), 12239-12242.

Lasa, B., Frechilla, S., paricio-Tejo, P. M., & Lamsfus, C. (2002). Role of glutamate dehydrogenase and phosphoenolpyruvate carboxylase activity in ammonium nutrition tolerance in roots. *Plant Physiology and Biochemistry*, *40*(11), 969-976.

Lashermes, P., Combes, M. C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthony, F., & Charrier, A. (1999). Molecular characterisation and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*, *261*(2), 259-266.

Léran, S., Varala, K., Boyer, J. C., Chiurazzi, M., Crawford, N., Daniel-Vedele, F., David, L., Dickstein, R., Fernandez, E., Forde, B., Gassmann, W., Geiger, D., Gojon, A., Gong, J. M., Halkier, B. A., Harris, J. M., Hedrich, R., Limami, A. M., Rentsch, D.,…Lacombe, B. (2014). A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in Plant Science*, *19*(1), 5-9.

Lippert, D., Zhuang, J., Ralph, S., Ellis, D. E., Gilbert, M., Olafson, R., Ritland, K., Ellis, B., Douglas, C. J., & Bohlmann, J. (2005). Proteome analysis of early somatic embryogenesis in *Picea glauca*. *Proteomics*, *5*, 461-473.

Liyaqat Nahvi, S., & Khurshid, A. (2022). Nitrogen metabolism enzymes: Structure, role, and Regulation. In P. Y. Yousuf, P. A. Shabir, & K. R. Hakeem (Eds.), *Advances in Plant Nitrogen Metabolism* (pp. 227-236). CRC Press.

Lo Schiavo, F., Giuliano, G., De Vries, S. C., Genga, A., Bollini, R., Pitto, L., Cozzani, F., Nuti-Ronchi, V., & Terzi, M. (1990). A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Molecular and General Genetics*, *223*(3), 385-393.

Lokkamlue, N., & Hongwiangchanand, J. (2023). Effects of reducing browning on the somatic embryogenesis of *Coffea arabica*. *Jordan Journal of Biological Sciences*, *16*(4), 633-639.

Loyola-Vargas, V. M., Avilez-Montalvo, J. R., Avilez-Montalvo, R. N., Márquez-López, R. E., Galaz-Ávalos, R. M., & Mellado-Mojica, E. (2016). Somatic embryogenesis in *Coffea* spp. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications* (pp. 241-266). Springer.

Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2016a). Somatic embryogenesis. An overview. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications* (pp. 1-10). Springer.

Loyola-Vargas, V. M., & Ochoa-Alejo, N. (2016b). *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*. Springer.

Ludwig, I. A., Mena, P., Calani, L., Cid, C., Del Rio, D., Lean, M. E., & Crozier, A. (2014). Variations in caffeine and chlorogenic acid contents of coffees: what are we drinking? *Food & Function*, *5*(8), 1718-1726.

Mathieu, M., Lelu-Walter, M. A., Blervacq, A. S., David, H., Hawkins, S., & Neutelings, G. (2006). Germin-like genes are expressed during somatic embryogenesis and early development of conifers. *Plant Molecular Biology*, *61, 615-627*.

McDonald, T. R., & Ward, J. M. (2016). Evolution of electrogenic ammonium transporters (AMTs). *Frontiers in Plant Science*, *7*, 352.

Méndez-Hernández, H. A., & Loyola-Vargas, V. M. (2024). Plant micropropagation and temporary immersion systems. In V. M. Loyola-Vargas & N. Ochoa-Alejo (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 35-50). Springer.

Michaux-Ferrière, N., Bieysse, D., Alvard, D., & Dublin, P. (1989). Étude histologique del l'embryogenése somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. *Café Cacao Thé*, *33*(4), 207-217.

Michaux-Ferrière, N., Dublin, P., & Schwendiman, J. (1987a). Étude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*, *31*(2), 103-111.

Michaux-Ferrière, N., Dublin, P., & Schwendiman, J. (1987b). Histological study of somatic embryogenesis from foliar explants of *Coffea arabica*. *Café Cacao Thé*, *31*, 112-114.

Michaux-Ferrière, N., & Schwendiman, J. (1992). Histology of somatic embryogenesis. In Y. Dattée, C. Dumas, & A. Gallais (Eds.), *Reproductive Biology and Plant Breeding* (pp. 247-259). Springer-Verlag.

Miflin, B. J., & Lea, P. J. (1982). Ammonia assimilation and amino acid metabolism. In D. Boulter & B. Parthier (Eds.), *Nucleic Acids and Proteins in Plants I. Structure, Biochemistry and Physiology of Proteins* (pp. 5-64). Springer.

Mihaljevic, S., Radic, S., Bauer, N., Garic, R., Mihaljevic, B., Horvat, G., Leljak-Levanic, D., & Jelaska, S. (2011). Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Plant Physiology*, *168*(16), 1943-1951.

Mita, G., Nocco, G., Leuci, C., Greco, V., Rampino, P., & Perrotta, C. (1997). Secreted heat shock proteins in sunflower suspension cell cultures. *Plant Cell Reports*, *16*(11), 792-796.

Mohanty, B. D., & Ghosh, P. D. (1988). Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Callus of Hordeum vulgare. *Annals of Botany*, *61, 551-555*.

Molina, D. M., Aponte, M. E., Cortina, H., & Moreno, G. (2002). The effect of genotype and explant age on somatic embryogenesis of coffee. *Plant Cell, Tissue and Organ*

Culture, *71*(2), 117-123.

Mukul-López, H. G., De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2012). Evaluation of the extracellular proteome profile during the somatic embryogenesis process of *Coffea spp*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, *56*(1), 72-79.

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, *15*(3), 473-497.

Mwaniki, W. I., Lubabali, A. H., Asava, K. K., Agwanda, C. O., & Anami, S. E. (2019). Effects of genotype and plant growth regulators on callus induction in leaf cultures of *Coffea arabica* L. F1 hybrid. *African Journal of Biotechnology*, *18*(31), 1004-1015.

Nassuth, A., Wormer, T. M., Bouman, F., & Staritsky, G. (1980). The histogenesis of callus in *Coffea canephora* stem explants and the discovery of early embryoid initiation. *Acta Botanica Neederlandica*, *29*(1), 49-54.

Neumann, K. H. (1966). Wurzelbidung und Nukleinsäuregehalt bei Phloem-Gewebekulturen der Karottenwurzel auf synthetischem Nährmedium. *Les Congress et Colloques de l'Universite de Liege*, *38*, 96-102.

Neutelings, G., Domon, J. M., Membré, N., Bernier, F., Meyer, Y., David, A., & David, H. (1998). Characterization of a germin-like protein gene expressed in somatic and zygotic embryos of pine (*Pinus caribaea* Morelet). *Plant Molecular Biology*, *38*(6), 1179-1190.

Nic-Can, G. I. (2010). *Cambio en el patrón embriogénico de Coffea canephora por efecto de moléculas provenientes del medio de cultivo de Coffea arabica*. CICY.

Nic-Can, G. I., Galaz-Ávalos, R. M., De-la-Peña, C., Alcazar Magana, A., Wrobel, K., & Loyola-Vargas, V. M. (2015). Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. *PLoS ONE*, *10*(6), e0126414.

Nic-Can, G. I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F. A., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V. M., Rojas-Herrera, R., & De-la-Peña, C. (2013). New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE*, *8*(8), e72160.

Niedz, R. P., & Evens, T. J. (2008). The effects of nitrogen and potassium nutrition on the growth of nonembryogenic and embryogenic tissue of sweet orange (Citrus sinensis (L.) Osbeck). *BMC Plant Biology*, *8 (16), 126*.

Nielsen, K. A., & Hansen, I. B. (1992). Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Physiology*, *139*, 489-497.

Orsel, M., Krapp, A., & Daniel-Vedele, F. (2002). Analysis of the NRT2 nitrate transporter family in Arabidopsis. Structure and gene expression. *Plant Physiology*, *129*(2),

886-896.

Ozgur, R., Turkan, I., Uzilday, B., & Sekmen, A. H. (2014). Endoplasmic reticulum stress triggers ROS signalling, changes the redox state, and regulates the antioxidant defence of Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, 1377-1390.

Patnaik, D., & Khurana, P. (2001). Germins and germjn like proteins: An overview. *Indian Journal of Experimental Biology*, *39, 191-200*.

Pernis, M., Salaj, T., Bellová, J., Danchenko, M., Baráth, P., & Klubicová, K. (2023). Secretome analysis revealed that cell wall remodeling and starch catabolism underlie the early stages of somatic embryogenesis in *Pinus nigra*. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1225424.

Peterson, G. L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, *83*(2), 346-356.

Pijeira-Fernández, G., & Santana-Buzzy, N. (2024). Capsicum recalcitrance: physiological and molecular challenges of pepper tissue culture. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *60*(6), 725-741.

Quiroz-Figueroa, F. R., Fuentes-Cerda, C. F. J., Rojas-Herrera, R., & Loyola-Vargas, V. M. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, *20*(12), 1141-1149.

Quiroz-Figueroa, F. R., Méndez-Zeel, M., Larqué-Saavedra, A., & Loyola-Vargas, V. M. (2001). Picomolar concentrations of salycilates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in *Coffea arabica* tissue culture. *Plant Cell Reports*, *20*(8), 679-684.

Quiroz-Figueroa, F. R., Monforte-González, M., Galaz-Ávalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006a). Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In V. M. Loyola-Vargas & F. A. Vázquez-Flota (Eds.), *Plant Cell Culture Protocols* (pp. 111-117). Humana Press.

Quiroz-Figueroa, F. R., Rojas-Herrera, R., Galaz-Ávalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. (2006b). Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *86*(3), 285-301.

Raghuramulu, Y., Purushotham, K., Sreenivasan, M. S., & Ramaiah, P. K. (1987). *In vitro* regeneration of *Coffee* plantlets in India. *J. Coffee Res*, *17*(2), 57-64.

Ramakrishna, A., Giridhar, P., Jobin, M., Paulose, C., & Ravishankar, G. (2012). Indoleamines and calcium enhance somatic embryogenesis in *Coffea canephora* P ex Fr. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *108*(2), 267-278.

Ramírez-Mosqueda, M. A. (2022). *Somatic Embryogenesis*. Springer.

Reinert, J., Tazawa, M., & Semenoff, S. (1967). Nitrogen compounds as factors of the embryogenesis *in vitro*. *Nature*, *216*(5121), 1215-1216.

Repalli, S. K., Geda, C. K., Pradhan, N. S. N., & Rao, G. J. N. (2019). Influence of additional nutrients and gelling agents on *in vitro* response of selected Indica rice varieties. *International Journal of Biology*, *11*(4), 26.

Rose, D., & Martin, S. M. (1975). Effect of ammonium on growth of plant cells (*Ipomoea sp.*) in suspension cultures. *Canadian Journal of Botany*, *53*(17), 1942-1949.

Saare-Surminski, K., Preil, W., Knox, J. P., & Lieberei, R. (2000). Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiologia Plantarum*, *108*(2), 180-187.

Sánchez-Teyer, L. F., Quiroz-Figueroa, F. R., Loyola-Vargas, V. M., & Infante-Herrera, D. (2003). Culture-induced variation in plants of *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo, regenerated by direct and indirect somatic embryogenesis. *Mol. Bio/Technology*, *23*(2), 107-116.

Santana-Buzzy, N., Rojas-Herrera, R., Galaz-Ávalos, R. M., Ku-Cauich, R., Mijangos Cortés, J. O., Gutiérrez-Pacheco, L. C., Canto-Flick, A., Quiroz-Figueroa, F. R., & Loyola-Vargas, V. M. (2007). Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *43*(6), 507-520.

Santiago, C., Sandoval-Cortes, J., Chávez González, M. L., Ruelas-Chacón, X., Aguilar-González, M. A., & Aguilar, C. N. (2025). *Coffea canephora* (robusta): Quality and health benefits. In V. R. Preedy & V. B. Patel (Eds.), *Coffee in Health and Disease Prevention* (pp. 19-25). Academic Press.

Söndahl, M. R., Salisbury, J. L., & Sharp, W. R. (1979). SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in *Coffee* callus cells. *Z. Pflanzenphysiol*, *94*(2), 185-188.

Söndahl, M. R., & Sharp, W. R. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, *81*(5), 395-408.

Söndahl, M. R., Spahlinger, D., & Sharp, W. R. (1979). A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol*, *94*(2), 101-108.

Soumare, A., Diedhiou, A. G., Thuita, M., Hafidi, M., Ouhdouch, Y., Gopalakrishnan, S., & Kouisni, L. (2020). Exploiting biological nitrogen fixation: A route towards a sustainable agriculture. *Plants*, *9*(8), 1011.

Sreenath, H. L., Shanta, H. M., Babu, K. H., & Naidu, M. M. (1995). Somatic embryogenesis from integument (perisperm) cultures of coffee. *Plant Cell Reports*, *14*(10), 670-673.

Staehelin, C., Granado, J., Müller, J., Wiemken, A., Mellor, R. B., Felix, G., Regenass, M., Broughton, W. J., & Boller, T. (1994). Perception of *Rhizobium* nodulation factors by tomato cells and inactivation by root chitinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*, 2196-2200.

Staritsky, G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Botanica Neederlandica*, *19*(4), 509-514.

Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G. A., Van Kammen, A., & De Vries, S. C. (1991). Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *The Plant Cell*, *3*(9), 907-921.

Tajedini, S., Goessnitzer, F., & Ingelbrecht, I. L. W. (2023). Somatic embryogenesis and temporary immersion for mass propagation of chimera-free mutant Arabica coffee plantlets. In I. L. W. Ingelbrecht, M. d. C. L. d. Silva, & J. Jankowicz-Cieslak (Eds.), *Mutation Breeding in Coffee with Special Reference to Leaf Rust: Protocols* (pp. 51-60). Springer.

Taria, S., Arora, A., Alam, B., Kumar, S., Yadav, A., Kumar, S., Kumar, M., Anuragi, H., Kumar, R., & Meena, S. (2022). Introduction to plant nitrogen metabolism: An overview. In P. Y. Yousuf, P. A. Shabir, & K. R. Hakeem (Eds.), *Advances in Plant Nitrogen Metabolism* (pp. 1-18). CRC Press.

Tchorbadjieva, M., & Odjakova, M. K. (2001). An acidic esterase as a biochemical marker for somatic embryogenesis in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) suspension cultures. *Plant Cell Reports*, *20*(1), 28-33.

Toonen, M. A. J., Schmidt, E. D. L., Van Kammen, A., & De Vries, S. C. (1997). Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta*, *203*(2), 188-195.

Valderrama-Martín, J. M., Ortigosa, F., Ávila, C., Cánovas, F. M., Hirel, B., Cantón, F. R., & Cañas, R. A. (2022). *A revised view on the evolution of glutamine synthetase isoenzymes in plants* The Plant Journal, 110, 946-960.

Van Boxtel, J., & 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*(1), 7-17.

Van Engelen, F. A., & De Vries, S. C. (1992). Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends in Genetics*, *8*(2), 66-70.

Van Engelen, F. A., Sterk, P., Booij, H., Cordewener, J. H. G., Rook, W., Van Kammen, A., & De Vries, S. C. (1991). Heterogeneity and cell type-specific localization of a cell wall glycoprotein from carrot suspension cells. *Plant Physiology*, *96*(3), 705-712.

von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J., & Filonova, L. (2001). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *69, 233-249*.

Wani, B. A., Rashid, S., Rashid, K., Javid, H., Magray, J. A., ul Qadir, R., & Islam, T. (2022). Assimilation of nitrates in plants. In P. Y. Yousuf, P. A. Shabir, & K. R. Hakeem (Eds.), *Advances in Plant Nitrogen Metabolism* (pp. 55-68). CRC Press.

Wetherell, D. F., & Dougall, D. K. (1976). Sources of nitrogen supporting growth and

embryogenesis in cultured wild carrot tissue. *Physiologia Plantarum*, *37*(2), 97-103.

Willats, W. G. T., McCartney, L., Mackie, W., & Knox, J. P. (2001). Pectin: cell biology and prospects for functional analysis. *Plant Molecular Biology*, *47*, 9-27.

Yasuda, T., Fujii, Y., & Yamaguchi, T. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology*, *26*(3), 595-597.

Yoas, A. I. L., & Johannes, E. (2021). Somatic embryogenesis of arabica coffee (*Coffea arabica* var. Lini-s 795) from toraja by *in vitro* with the additional of 2, 4 dichlorophenoxyacetid acid (2, 4 d) and 6 furfurylamino purine (kinetin). *Academic Research International*, *12*(1), 78-83.

Zdravkovic-Korac, S., Belic, M., Calic, D., & Milojevic, J. (2023). Somatic embryogenesis in spinach - A Review. *Horticulturae*, *9*(9), 1048.

Zhang, W., Ni, K., Long, L., & Ruan, J. (2023). Nitrogen transport and assimilation in tea plant (*Camellia sinensis*): a review. *Frontiers in Plant Science*, *14*, 1249202.

Zhu, T., Wang, J., Hu, J., & Ling, J. (2022). Mini review: Application of the somatic embryogenesis technique in conifer species. *Forestry Research*, *2*, 18.

Zimmerman, J. L. (1993). Somatic embryogenesis: A model for early development in higher plants. *The Plant Cell*, *5*(10), 1411-1423.