



**Ciencia y Tecnología**

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Análisis molecular de transportadores de auxinas durante  
la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea  
canephora*

Tesis que presenta

Marina Guadalupe Hernández Chacón

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Bioquímica y Biología Molecular)

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 Marina Guadalupe Hernández Chacón titulado **Análisis molecular de transportadores de auxinas durante la inducción de embriogénesis somática en *Coffea canephora***, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, dentro de la línea de investigación de morfogénesis y regulación genética, en el laboratorio 24 del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, dentro de la opción de Bioquímica y Biología Molecular, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



---

Dr. José Luis Hernández-Stefanoni  
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 02 de Julio 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 en razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: \_\_\_\_\_



Marina Guadalupe Hernández Chacón

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada, numero 1289468.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) por brindarme la oportunidad de ser parte de su planta estudiantil.

A mi comité tutorial conformado por la Dra. Nancy Santana Buzzy y la Dra. Sara Luz Nahuat, por todas las observaciones y comentarios sobre mi proyecto.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de laboratorio.

A la técnica de laboratorio, la Dra. Rosa María Galaz Avalos, por ser una gran compañera de trabajo y una gran amiga.

A la Dra. Ana Odette Quintana por su apoyo para el desarrollo de la estrategia experimental.

A mis compañeras del laboratorio 24, por nunca negarme su ayuda, guiarme en mis primeros pasos experimentales, siempre estar dispuestas a brindarme apoyo y ser una magnificas amigas.

## **DEDICATORIAS**

A mi madre, espero un día ser una parte de la gran mujer que eres.

Para Alexis, el hombre que cree que soy fuerte, inteligente y capaz, y de hecho valora mi opinión. Me hace sentir como su igual, como si pudiera lograr tanto como el, e incluso más. Y si digo una buena idea, ni siquiera se sorprende, lo espera, hace que cada día quiera ser mejor persona, me hace creer en mí y me inspira para tener un magnífico futuro a su lado.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
FIGURAS.....	V
TABLAS.....	VII
TABLA 2.1: CEBADORES DISEÑADOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN.....	VII
<b>CAPÍTULO I.....</b>	<b>3</b>
ANTECEDENTES.....	3
1. GENERALIDADES DEL CAFÉ.....	3
1.1.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	4
1.1.3 ESTADIOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO.....	5
1.1.4 PAPEL DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	6
1.1.5 AUXINAS.....	7
1.2 JUSTIFICACIÓN.....	11
1.3. OBJETIVO GENERAL.....	12
1.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
1.4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	12
1.5 HIPÓTESIS.....	13
1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	13
<b>CAPÍTULO II.....</b>	<b>14</b>
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14

2.1. MATERIALES.....	14
2.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO .....	14
2.1.2. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	14
2.2. MÉTODOS .....	15
2.2.1. CONTEO DE LA PRODUCCIÓN EMBRIOGÉNICA .....	15
2.2.2. EXTRACCIÓN DE AUXINAS .....	15
2.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS AUXINAS Y SUS CONJUGADOS. ....	16
2.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	16
2.2.5 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA .....	17
2.2.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO .....	17
2.2.7. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc. ....	17
2.2.8. DISEÑO DE CEBADORES .....	18
TABLA 2.1: CEBADORES DISEÑADOS PARA EL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA LOS TRANSPORTADORES DE AUX ESTUDIADOS .....	18
2.2.9. CONDICIONES PARA LA PCR.....	18
2.2.10. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO.....	19
RESULTADOS .....	20
3.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	20
3.2 CONTEO DE EMBRIONES SOMÁTICOS .....	21
3.3 CUANTIFICACIÓN DE AUXINA LIBRE (AIA) Y SUS CONJUGADOS.....	22

3.4 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA .....	27
3.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO. ....	24
3.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA. ....	26
4. DISCUSIÓN .....	37
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	42
5.1 CONCLUSIONES .....	42
5.2 PERSPECTIVAS .....	43
BIBLIOGRAFÍA .....	45
ANEXOS .....	51
ANEXO 1: CUADRO DE REACTIVOS PARA MEDIO DE CULTIVO YASUDA MODIFICADO. .....	51
ANEXO 2: MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS. .....	52

## FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Comparación de la embriogénesis somática directa con la embriogénesis somática indirecta. La ES directa mostrará una organización en sus tejidos, contando con desarrollo uní o multicelular de embriones somáticos. La ES indirecta producirá la formación de tejido amorfo conocido comunmente como « callo » el cual posteriormente producira embriones somáticos Modificado a partir de Quiroz-Figueroa et al. (2006b). .....	5
<b>Figura 1.2</b> Diferentes tipos de auxinas conocidas: A) Tipos naturales, B) Tipo sintéticas. Modificado a partir de Sauer et al. (2013) .....	7
<b>Figura 1.3:</b> Estructura de los conjugados de auxinas y aminoácidos. Modificado a partir de Bajguz et al. (2009). .....	8
<b>Figura 1.4</b> Transporte de auxinas por PIN y ABCB a través de los diferentes estadios. Modificado de Petrášek et al. (2009). .....	9
<b>Figura 1.5</b> Diagrama general de la estrategia experimental.....	13
<b>Figura 3.1</b> Proceso de embriogénesis somática a través de los días. ....	20
<b>Figura 3.2</b> Número de embriones somáticos por matraz. El conteo de embriones se realizó en tres matraces con cinco explantes cada uno. ....	21
<b>Figura 3.3</b> Número de embriones somáticos de acuerdo con su estadio. ....	22
<b>Figura 3.4</b> Gráfica de cuantificación del ácido-3-indol acético libre durante el pre- acondicionamiento (días -14, -9, -7, -4 y 0) en unidades de pico moles por gramo de peso fresco. ....	23
<b>Figura 3.5</b> Grafica de cuantificación de ácido-3-indol acético (AIA) conjugado con leucina por medio de HPLC durante el pre acondicionamiento, siendo el día -4 con mayor cantidad de AIA-Leu y el día -7 con menor AIA-Leu en picomoles por gramos de peso seco. ....	24
<b>Figura 3.6</b> Cuantificación por medio de HPLC del ácido-3-indol acético conjugado con alanina durante el pre-acondicionamiento.....	25
<b>Figura 3.7</b> Grafica de cuantificación de ácido-3- indol acetico conjugado con aspartico por medio de HPLC durante el pre-acondicionamiento, el día -14 muestra los niveles mas bajos y el día -7 los mayores niveles de AIA-Aspartico en picomoles por gramo de peso seco. ....	25
<b>Figura 3.8</b> Grafica de cuantificación de ácido-3-indol acetico conjugado con Glutamico por medio de HPLC durante el pre-acondicionamiento, el día -9 muestra los niveles mas bajos de AIA-Glutamico y el día -7 los mayores niveles de AIA-Glutamico en picomoles por gramos de peso seco. ....	26
<b>Figura 3.9</b> Mapa de calor correspondiente a las familias de genes relacionadas con los transportadores de auxinas .....	27
<b>Figura 3.10</b> Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados (GDE) en cada día analizado del proceso de inducción de ES. Las regiones traslapadas muestran el número de GDE compartidos entre cada día del proceso. ....	23

<b>Figura 3.11</b> Análisis filogenético de la familia de transportadores ABCB en las diferentes especies seleccionadas.....	24
<b>Figura 3.12</b> Análisis filogenético de la familia de transportadores PIN en las diferentes especies seleccionada.....	25
<b>Figura 3.13</b> Análisis de expresión de genes asociados a transportadores de auxinas durante el pre-acondicionamiento (días -14, -9), día de la inducción (día 0) y días después de la inducción (días 7, 14 y 21). .....	27
<b>Figura 3.14</b> Análisis densitométrico de los geles resultantes de la PCR.....	28

**TABLAS**

**Tabla 2.1:** Cebadores diseñados para el análisis de expresión.....18

## ABREVIATURAS

<b>AIA</b>	Ácido indol-3-acético
<b>AIB</b>	Ácido indol butírico
<b>AIA-Ala</b>	Ácido indol-3-acético conjugado con alanina
<b>AIA-Asp</b>	Ácido indol-3-acético conjugado con ácido aspártico
<b>AIA-Glu</b>	Ácido indol-3-acético conjugado con ácido glutámico
<b>AIA-Leu</b>	Ácido insol-3-acético conjugado con leucina
<b>ANA</b>	Ácido naftalén acético
<b>AUX</b>	Auxinas
<b>CK</b>	Citocininas
<b>ES</b>	Embriogénesis somática
<b>GH3</b>	Gretchen
<b>KIN</b>	Kinetina
<b>NPA</b>	Ácido naftiltalámico
<b>RCV</b>	Reguladores del crecimiento vegetal.
<b>RE</b>	Retículo endoplásmico
<b>2,4D</b>	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
<b>5BA</b>	5 benciladenina

---

## RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) es una técnica biotecnológica que se usa para el estudio de los procesos que participan en la formación y el desarrollo de los embriones cigóticos de las plantas y para la propagación masiva de plantas.

Se conocen múltiples factores que influyen en la ES como puede ser el genotipo de la planta, el medio de cultivo, la fuente de nitrógeno y los reguladores del crecimiento. Entre estos últimos, las auxinas (Aux) son el RCV clave en la inducción de la ES. La acción de las Aux depende de su concentración, por lo que su homeostasis es la clave. La homeostasis involucra su síntesis, degradación, conjugación y transporte. El transporte de las Aux puede darse célula a célula y a larga distancia.

En esta tesis se presentan los resultados de investigar el papel de los transportadores de Aux durante una dinámica temporal de la ES, enfocándose en el transportador de influjo *LAX1* y los transportadores de eflujo *PIN1*, *PIN5*, *ABCB1* y *ABCB19* durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES en *Coffea canephora*.

---

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) is a biotechnological technique for studying the processes involved in the formation and development of zygotic plant embryos and for mass plant propagation.

Multiple factors influence SE, such as plant genotype, culture medium, nitrogen source, and growth regulators. Among the latter, auxins (Aux) are the key growth regulators in developing SE. The action of Auxin depends on its concentration, so its homeostasis is crucial. Homeostasis involves its synthesis, degradation, conjugation, and transport. Auxin transport can occur from cell to cell and over long distances.

This thesis presents the results of investigating the role of auxin transporters during a temporal dynamic of SE, focusing on the influx transporter *LAX1* and the efflux transporters *PIN1*, *PIN5*, *ABCB1*, and *ABCB19* during the preconditioning and induction phases of SE in *Coffea canephora*.

---

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es un conjunto de técnicas para el cultivo aséptico de células, tejidos, órganos y sus componentes en condiciones físicas y químicas definidas *in vitro* y en un entorno controlado (Loyola-Vargas *et al.*, 2008). Este conjunto de herramientas comprende la obtención de callos, suspensiones celulares, la obtención de protoplastos, la micropropagación, la obtención de metabolitos secundarios, y la embriogénesis somática (ES) (Loyola-Vargas *et al.*, 2008).

La ES es una poderosa herramienta biotecnológica que permite la formación de embriones somáticos partiendo de células somáticas (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2016a). Esta técnica permite analizar el desarrollo embrionario y los múltiples factores que influyen en el proceso, como pueden ser el genotipo de la planta madre, el origen del explante, el medio de cultivo, la fuente de nitrógeno del medio de cultivo y los reguladores del crecimiento empleados (Loyola-Vargas *et al.*, 2016).

Las Aux juegan un papel fundamental en el proceso de la ES (Loyola-Vargas *et al.*, 2016; Nic-Can and Loyola-Vargas, 2016). Las Aux y el estrés que sufre el explante durante el proceso de inducción de la ES son parte de la señal que modifica el programa genético de las células somáticas y que las convierte en un embrión somático (Méndez-Hernández *et al.*, 2019).

La homeostasis de las auxinas es de suma importancia durante el proceso de la ES (Nic-Can and Loyola-Vargas, 2016). La homeostasis comprende la conjugación, biosíntesis, degradación y transporte de un determinado compuesto. La formación y desarrollo de los embriones somáticos requiere de un adecuado transporte de las Aux (Petrášek and Friml, 2009). Para que se de este flujo polar se requiere de transportadores localizados en partes específicas de la membrana plasmática (MP). Por ejemplo, la familia de transportadores AUX/LAX1 se encargan de que las Aux entren en la células (Karami *et al.*, 2023). En tanto que la familia de los transportadores PIN se encargan de movilizar a las Aux fuera de célula o hacia el interior de los organelos. Por ejemplo. PIN1 está localizado en el lado opuesto de la membrana a los transportadores AUX/LAX1 lo que

provoca que las Aux se muevan en una determinada dirección (transporte polar) (Karami *et al.*, 2023; Křeček *et al.*, 2009). Hay una tercera familia de transportadores que está involucrada en la movilización de las Aux, los transportadores ABCB, los cuales pertenecen a la súper familia de transportadores ABC. Los transportadores ABCB tanto pueden introducir Aux dentro de la célula, como movilizarla fuera de ella (Petrášek and Friml, 2009).

En el modelo de estudio que se empleó en esta investigación nuestro grupo de trabajo ha estado estudiando diversos aspectos de la ES. Entre ellos se encuentran la señalización (Quintana-Escobar *et al.*, 2019), la conjugación de las Aux (Méndez-Hernández *et al.*, 2021), biosíntesis del ácido-3-indol acético (AIA) (Uc-Chuc *et al.*, 2020) y la localización del AIA durante el proceso de la inducción de la ES (Márquez-López *et al.*, 2018). Nuestro grupo ha determinado que el transporte de las Aux es esencial para que se lleve a cabo la inducción de la ES (Uc-Chuc *et al.*, 2020), por lo que en este estudio nos propones profundizar en el mecanismo del transporte de Aux durante la inducción de la ES en *Coffea canephora*.

---

---

## CAPÍTULO I

### ANTECEDENTES

#### 1. GENERALIDADES DEL CAFÉ

El género *Coffea* es una planta tropical que cuenta con más de 127 especies conocidas (DaMatta *et al.*, 2007). Las especies *C. arabica* y *C. canephora* son las de mayor relevancia comercial (Davis *et al.*, 2006) y se les cultiva en alrededor de 80 países (Martins *et al.*, 2014; Ramalho *et al.*, 2003). El último dato disponible sobre la producción de café es para la cosecha 2023-2024 e indica que el 42.6% de la producción mundial correspondía a la especie *C. canephora* y 57.4% a la especie *C. arabica* (ICO, 2025). Después del petróleo, el café es el producto con mayor comercialización en el mundo, generando una derrama económica estimada de \$90 mil millones de dólares alrededor del mundo (DaMatta *et al.*, 2007).

Las diferencias del café producido por las dos especies habían marcado una importante diferencia entre ellas tanto en su producción como en su precio. Sin embargo, actualmente con las mezclas que se realizan con café provenientes de diferentes partes del mundo en una sola cápsula, los precios y la producción de ambas especies casi se han emparejado.

*C. canephora* es una especie diploide ( $2n=44$ ) con elevada variabilidad genética debido a que es una planta alógama. Cuenta con poblaciones polimórficas, grupos heteróticos altamente heterócigos, con tallo leñoso, raíces poco profundas y temperatura ideal de crecimiento de 22 a 26 °C (Campuzano-Duque *et al.*, 2021). Sus flores son hermafroditas y estrictamente alógamas (Berthaud, 1981). *C. canephora* tiene un ciclo fenológico que varía de 9-11 meses, cuentan con una forma alargada y una coloración verde profunda en sus hojas, los frutos son drupas comúnmente llamadas “cerezas” que contienen dos semillas (Montagnon *et al.*, 2012). El fruto es de color rojo y en algunos casos amarillo (Zhang *et al.*, 2021).

## CAPÍTULO I

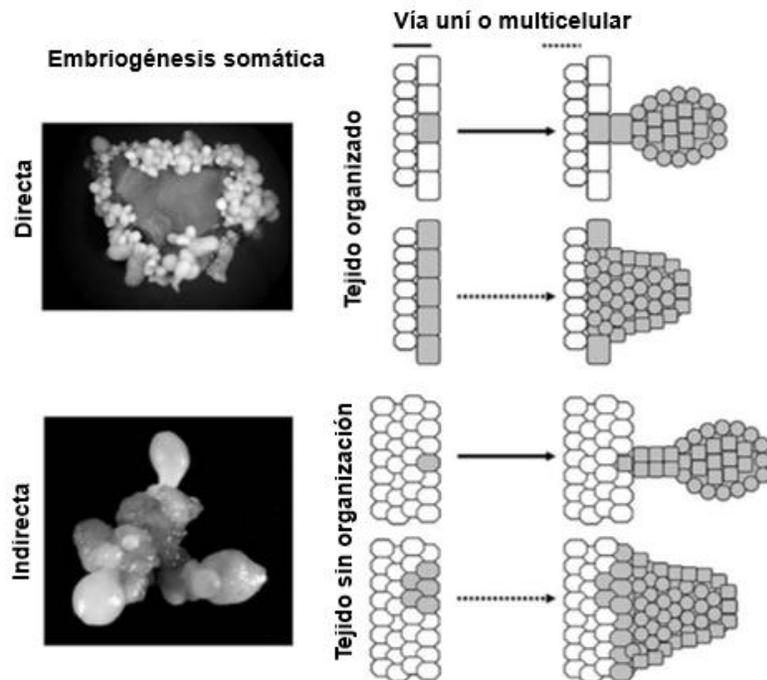
Las raíces de *C. canephora* muestran un mayor desarrollo en comparación con las raíces de *C. arabica*, lo cual les permite absorber una mayor cantidad de nutrientes y agua, haciendo que la planta cuente con una mayor resistencia en caso de deficiencias hídricas o nutricionales (da Costa *et al.*, 2023). El aumento en el cultivo de *C. canephora* está relacionada con su adaptabilidad a condiciones de las regiones tropicales, crecimiento acelerado, alta productividad, permite un cultivo fuera de sombra, además de mayor resistencia a enfermedades y cambios climáticos (Simon-Gruita *et al.*, 2019).

### 1.1.2 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La ES es una poderosa herramienta biotecnológica que permite el desarrollo de embriones sin la necesidad de la participación de los gametos (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2016a). Este proceso tiene como base la totipotencia de las células vegetales, la cual les permite generar un nuevo organismo, viable y vigoroso a partir de una célula (Fehér, 2015).

Algunas especies pueden llevar a cabo este proceso de manera natural como lo hace *Kalanchoe diargremontiana* (Garcês *et al.*, 2007). La ES es influenciada por múltiples factores, tales como el genotipo, la fisiología de la planta de la que se obtienen los explantes, el origen del explante, el medio de cultivo, la fuente de nitrógeno y carbono del medio de cultivo, el tiempo de exposición a diversos reguladores del crecimiento vegetal (RCV), además de las condiciones de cultivo *in vitro* de la planta en estudio (Fuentes-Cerda *et al.*, 2001; Loyola-Vargas *et al.*, 2008; Nic-Can *et al.*, 2016). El uso de RCV exógenos como las Aux, en combinación con otros RCV o estrés modifican el programa genético de las células somáticas y regulan la transición a través de los diferentes estadios de la ES (Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2016b).

Se conocen dos rutas para la producción de embriones somáticos (Figura 1.1), la ES directa y la ES indirecta (Horstman *et al.*, 2017). La ES indirecta comienza con la formación de un tejido desdiferenciado denominado callo, el cual está formado por una masa de células desdiferenciadas (Ikeuchi *et al.*, 2013). En la ES directa los embriones somáticos se forman directamente a partir del explante sin pasar por la formación de callo (Horstman *et al.*, 2017; Su *et al.*, 2009).



**Figura 1.1.** Comparación de la embriogénesis somática directa con la embriogénesis somática indirecta. La ES directa mostrará una organización en sus tejidos, contando con desarrollo uní o multicelular de embriones somáticos. La ES indirecta producirá la formación de tejido amorfo conocido comúnmente como « callo » el cual posteriormente producirá embriones somáticos. Modificado a partir de Quiroz-Figueroa et al. (2006b).

### 1.1.3 ESTADIOS DEL DESARROLLO EMBRIONARIO

Los estadios de desarrollo de los embriones somáticos durante la ES se dividen en dos grandes fases metabólicas. La primera fase corresponde a la etapa morfogénica, caracterizada por la división y diferenciación celular de la célula original (Pila Quinga *et al.*, 2018). Dentro de esta fase se distinguen varios estadios de desarrollo, siendo el primero el estadio globular, que culmina con la formación del protodermo, la capa celular externa que recubre al embrión (Yeung, 1995). La capa externa de células se divide de manera anticlinal, mientras que las capas internas presentan divisiones periclinales. Los embriones en esta etapa se reconocen fácilmente por su forma esférica y superficie lisa (Schiavone and Cooke, 1985), y es aquí donde comienza la diferenciación de los organelos celulares (Wang *et al.*, 1994).

## **CAPÍTULO I**

Posteriormente, se produce un alargamiento de las células internas del embrión, lo que da lugar a una expansión longitudinal cerca del extremo inferior del embrión. Este proceso indica el inicio de la formación del procámbium, fenómeno que se observa de manera pronunciada en el estadio conocido como “corazón” (Schiavone and Cooke, 1985).

A medida que el embrión avanza al estadio “torpedo”, se aprecia un notable alargamiento axial (Schiavone and Cooke, 1985). Finalmente, en la etapa cotiledonar, se forman los cotiledones, que aparecen como pequeñas protuberancias en la periferia de los extremos terminales del embrión somático (Yeung, 1995). La formación de estos cotiledones está relacionada con la actividad local de gradientes de auxinas, que regulan el desarrollo y diferenciación de estas estructuras.

El segunda etapa, que hace referencia a al estado metabólico del embrión y su fase de maduración, la cual se caracteriza por su actividad bioquímica, su preparación para la desecación, dormancia y germinación (Pila Quinga *et al.*, 2018). Esta etapa no se lleva a cabo en los embriones somáticos.

### **1.1.4 PAPEL DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA**

Los RCV como las Aux y las citocininas (CK), son utilizados en el 80% de los protocolos para la inducción de la ES, ya que son factores clave de la división y diferenciación de las células vegetales (Nic-Can and Loyola-Vargas, 2016).

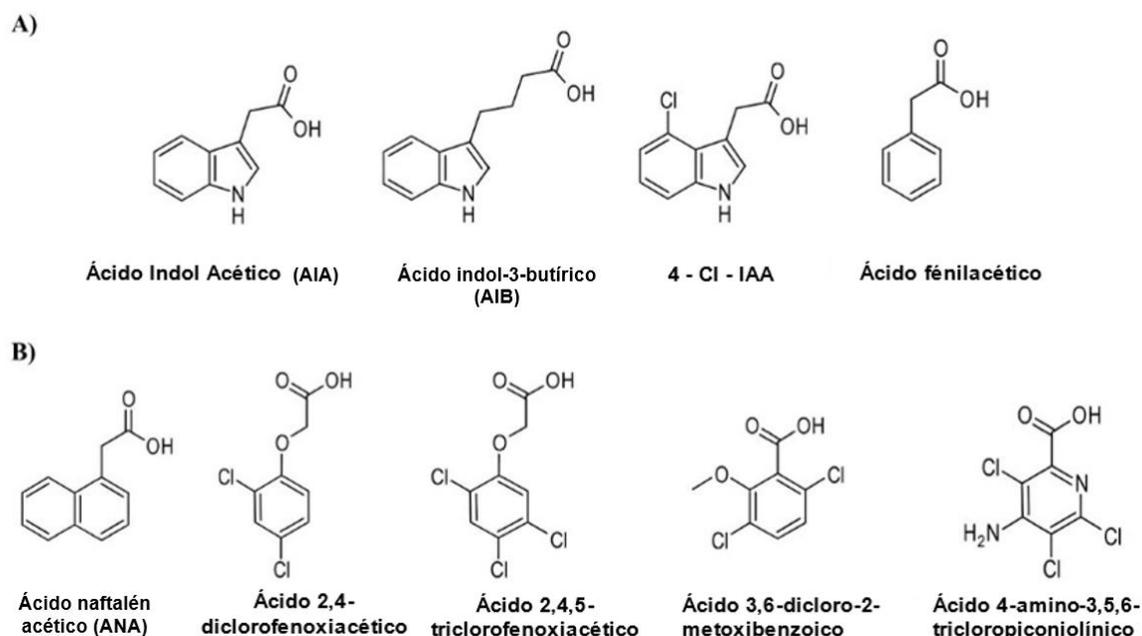
Una aplicación equilibrada de Aux y CK en los cultivos de tejidos vegetales determina el estadio de desarrollo de la célula. La formación de callos se relaciona con una relación igual entre Aux y CK; una relación mayor de Aux/CK origina raíces y una relación menor de Aux/CK produce brotes (Skoog and Armstrong, 1970).

El estrés provocado por la presencia de grandes cantidades de RCV propicia una modificación en el estado de la cromatina, lo cual lleva a la activación de genes como *BBM*, *LEC* y *WUS* que participan en la inducción de la ES (Pasternak and Dudits, 2019). Esto sugiere que los RCV desencadenan una reprogramación general de la expresión

génica mediante modificaciones de la cromatina y la activación de factores de transcripción específicos (Salaün *et al.*, 2021).

### 1.1.5 AUXINAS

La auxinas están conformadas por un anillo indólico, acoplado a una cadena lateral que alberga a un grupo carboxilo terminal (Ljung, 2013). La auxina natural con mayor abundancia es el ácido AIA (Figura 1.2). Otra auxina natural es el ácido indol-3-butírico (AIB). Además de las Aux naturales se han identificado compuestos análogos a las Aux como el ácido naftalén acético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), estos compuestos y varios más son utilizados como herbicidas (Figura 1.2) (Paque and Weijers, 2016).



**Figura 1.2** Diferentes tipos de auxinas conocidas: A) Tipos naturales, B) Tipo sintéticas.

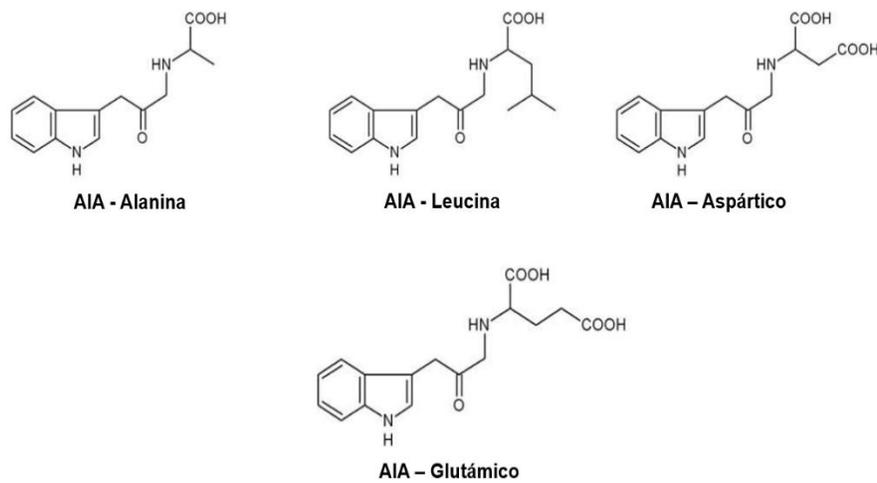
Modificado a partir de Sauer *et al.* (2013)

La homeostasis de las Aux está dada por su biosíntesis, conjugación, transporte, y degradación (Méndez-Hernández, 2021). El AIA es sintetizado en las plantas a través de cinco rutas (Kasahara, 2016). Cuatro de las rutas inician en el triptofano, y la quinta vía

## CAPÍTULO I

inicia en el indol-3-fosfo glicerato. De las cuatro rutas que utilizan al triptofano como sustrato, la que convierte al triptofano en indol-3-piruvato, reacción catalizada por la enzima triptófano aminotransferasa (EC 2.6.1.27) (Kasahara, 2016). Este indol-3-piruvato es descarboxilado a AIA por una familia de enzimas conocidas con el nombre de indol-3-piruvato monooxigenasa (EC 1.14.13.168) codificada por la familia de genes *YUCCA* (Kasahara, 2016) es la más común en las plantas superiores.

El AIB, al oxidarse, también puede dar origen al AIA (Nonhebel, 2015). Las Aux son sintetizadas principalmente en el meristemo apical, los embriones cigóticos y las hojas jóvenes (Grieneisen *et al.*, 2007).



**Figura 1.3:** Estructura de los conjugados de auxinas y aminoácidos. Modificado a partir de Bajguz *et al.* (2009).

El AIA puede ser conjugado mediante una reacción reversible con diferentes aminoácidos como la alanina y la leucina (Figura 1.3) con la finalidad de ser reservados y ser usados posteriormente por la célula, o una reacción irreversible con aminoácidos como glutámico y aspártico (Figura 1.3) para ser degradados posteriormente (Ludwig-Müller, 2011).

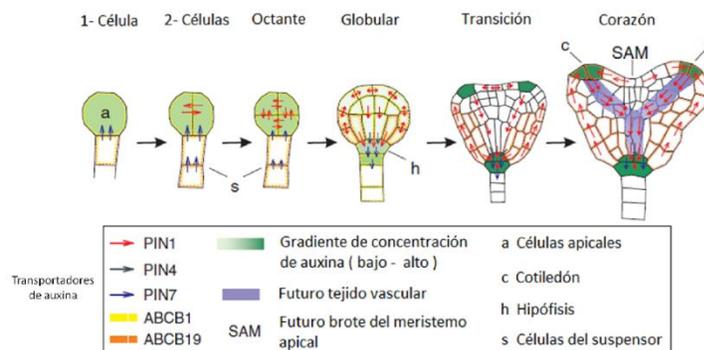
Esta conjugación es llevada a cabo por las proteínas *GH3*, las cuales pertenecen a la superfamilia de la luciferasa de luciérnaga formadora de acil adenilato, y son codificadas por la familia de genes Gretchen Hagen 3 (*GH3*) (Méndez-Hernández, 2021). Estas

proteínas catalizan la reacción por medio de dos pasos; el primer paso es la adenilación del AIA, y a continuación se lleva a cabo un ataque nucleofílico al grupo amino del aminoácido, dando como resultado una molécula conjugada (AIA-aminoácido) (Vielba, 2019).

La síntesis de los conjugados de AIA–aminoácidos se lleva a cabo en el citosol (Ludwig-Müller, 2011). Se ha sugerido que una vez que se ha llevado la formación de un conjugado de almacenamiento, estos son reconocidos por el retículo endoplásmico, esto mediante los receptores *ABP1* que los transportan y almacenan en la vacuola de donde más tarde podrán recuperados para ser hidrolizados para su liberación cuando la célula requiera AIA (Anai *et al.*, 1997).

Otro aspecto fundamental del estudio de la función de las Aux es su transporte (Petrášek and Friml, 2009). En las plantas el AIA se transporta lejos de los tejidos en donde fue sintetizado. El AIA se puede movilizar por medio de dos mecanismos, uno involucra el transporte célula a célula (polar) y el otro a larga distancia por medio del floema (Ljung, 2013).

En transporte de las Aux es vital en los primeros estadios del desarrollo del embrión, ya que se ha demostrado que la distribución diferencial de las Aux participa en la especificación del eje apical-basal del el embrión y la formación de los cotiledones (Petrášek and Friml, 2009). (Figura 1.4)



**Figura 1.4** Transporte de auxinas por PIN y ABCB a través de los diferentes estadios. Modificado de Petrášek et al. (2009).

## CAPÍTULO I

Para que las Aux logren transportarse de manera eficaz, este proceso se lleva a cabo ya sea por difusión libre o transporte activo (Song *et al.*, 2020). La difusión libre ocurre dadas las condiciones de pH ácido del apoplasto, en donde la molécula de Aux se encuentra protonada (Vanneste and Friml, 2009), brindándole propiedades lipofílicas, las cuales les permiten difundirse a través de la membrana celular. Una vez en el citoplasma, la molécula será desprotonada haciéndola incapaz de permear la membrana plasmática, siendo concentrada dentro del citoplasma celular (Vanneste and Friml, 2009).

El transporte activo se lleva a cabo mediante transportadores de influjo de alta afinidad conocidos como Aux/Lax, transcritos de los genes *AUX1/LAX1-3*. Estas proteínas (transportadores) llevan a cabo el transporte del AIA que se encuentra desprotonado al interior de la célula (Swarup and Péret, 2012). Estos transportadores cuentan con 11 segmentos transmembranales con el extremo amino terminal en el interior de la célula y el extremo carboxilo en el apoplasto (Péret *et al.*, 2012).

Los transportadores de eflujo abarcan dos grandes familias como *ABCB* y *PIN* (Adamowski and Friml, 2015), si bien es importante señalar que algunos miembros de la familia ABC también transportan AIA al interior de la célula. Los transportadores ABCB cuentan con un dominio transmembranal y un dominio de unión a nucleótidos, siendo *ABCB1* y *ABCB19* los más estudiados debido a su papel en el TPA (Ma and Han, 2016). La familia de genes *PIN* en *Arabidopsis thaliana* está compuesta por ocho integrantes (*PIN1-8*), los cuales están divididos en dos subgrupos, el primero abarcando *PIN5*, *PIN6* y *PIN8*, los cuales cuentan con su bucle hidrofílico reducido (Křeček *et al.*, 2009) y el segundo grupo que abarca a los genes *PIN1*, *PIN2*, *PIN3*, *PIN4*, y *PIN7*, localizados en la membrana plasmática y se encargan del eflujo de Aux (Křeček *et al.*, 2009). Su localización en la membrana plasmática no es permanente debido a que son relocalizados en diferentes partes de la célula a través de un mecanismo conocido como “transitosis” generada como respuesta a señales ambientales (Kleine-Vehn *et al.*, 2008).

El papel de los transportadores de Aux se ha reportado en especies como *A. thaliana* (Karami *et al.*, 2023; Robert *et al.*, 2015), *Lilium pumilum* DC Fisch (Song *et al.*, 2020),

*Oryza sativa* (Xu *et al.*, 2014), *Citrullus lanatus* (Yu *et al.*, 2017) y *Abies alba* (Vondráková *et al.*, 2011).

La acción concertada de PIN1, ABCB1, y ABCB19 es necesaria para la distribución diferencial de las Aux durante la embriogénesis cigótica (Friml *et al.*, 2003). Ya que se ha determinado que el nivel endógeno de Aux es esencial y se encuentra relacionado con el mecanismo de inducción de la ES. El uso de inhibidores de los transportadores como el ácido N-naftiltalámico (NPA) y el ácido 2,3,5-triyodobenzoico (TIBA) (Klíma *et al.*, 2016) genera aberraciones morfológicas en los embriones somáticos producidos en su presencia (Choi *et al.*, 2001; Márquez-López *et al.*, 2018).

### 1.2 JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas, el cultivo del cafeto ha adquirido una relevancia global, generando una amplia gama de impactos socioeconómicos. Ante el creciente consumo mundial de café, se hace imperativo desarrollar estrategias innovadoras para incrementar su producción. La embriogénesis somática se presenta como una prometedora alternativa para optimizar la propagación de este cultivo.

Numerosos estudios se han dedicado a elucidar los mecanismos que llevan a la ES. A pesar de los significativos avances logrados, aún persisten interrogantes fundamentales, entre los que destaca el papel de los transportadores de Aux en este proceso.

En nuestro laboratorio, hemos desarrollado un protocolo que favorece significativamente la inducción de embriogénesis somática en nuestro modelo experimental, *C. canephora*. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan este fenómeno y la interacción de los genes que codifican para los transportadores de auxinas involucrados aún no han sido completamente esclarecidos.

Los resultados de la investigación realizada en la presente tesis buscan llenar este vacío de conocimiento al caracterizar los transportadores de auxinas involucrados en la ES de *C. canephora*. Los resultados obtenidos en esta investigación servirán como base sólida

## **CAPÍTULO I**

para futuros estudios que profundicen en el papel de las Aux en la regulación de este proceso fundamental para la propagación del cafeto y el desarrollo de nuevas estrategias de mejoramiento genético.

### **1.3. OBJETIVO GENERAL**

Analizar el papel de los transportadores de Aux antes y durante la inducción de la ES en *C. canephora*.

#### **1.3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analizar la variación temporal del número de transcritos asociados con el transporte de auxinas durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES.
- Examinar filogenéticamente los transportadores de auxinas en *C. canephora* en comparación con otras especies para identificar diferencias evolutivas y posibles implicaciones funcionales.
- Investigar las diferencias en la expresión de genes asociados con los transportadores de *LAX*, *PIN* y *ABCB* en diferentes días de pre-acondicionamiento e inducción de la ES.

#### **1.4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

- I. ¿Cómo se regula el número de transcritos asociados con el transporte de las Aux en un ciclo temporal durante el pre-acondicionamiento y la inducción de la ES?
- II. ¿Existen variaciones en los transportadores de Aux entre especies cercanas a *C. canephora*?
- III. ¿Cómo los transportadores de Aux regulan las diferentes etapas de la inducción de la ES?

1.5 HIPÓTESIS

Si los transportadores de Aux regulan los gradientes de concentración de auxinas durante el desarrollo embrionario, entonces los genes asociados a los transportadores de auxinas mostraran una expresión diferencial durante la inducción de la ES en *C. canephora*.

1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

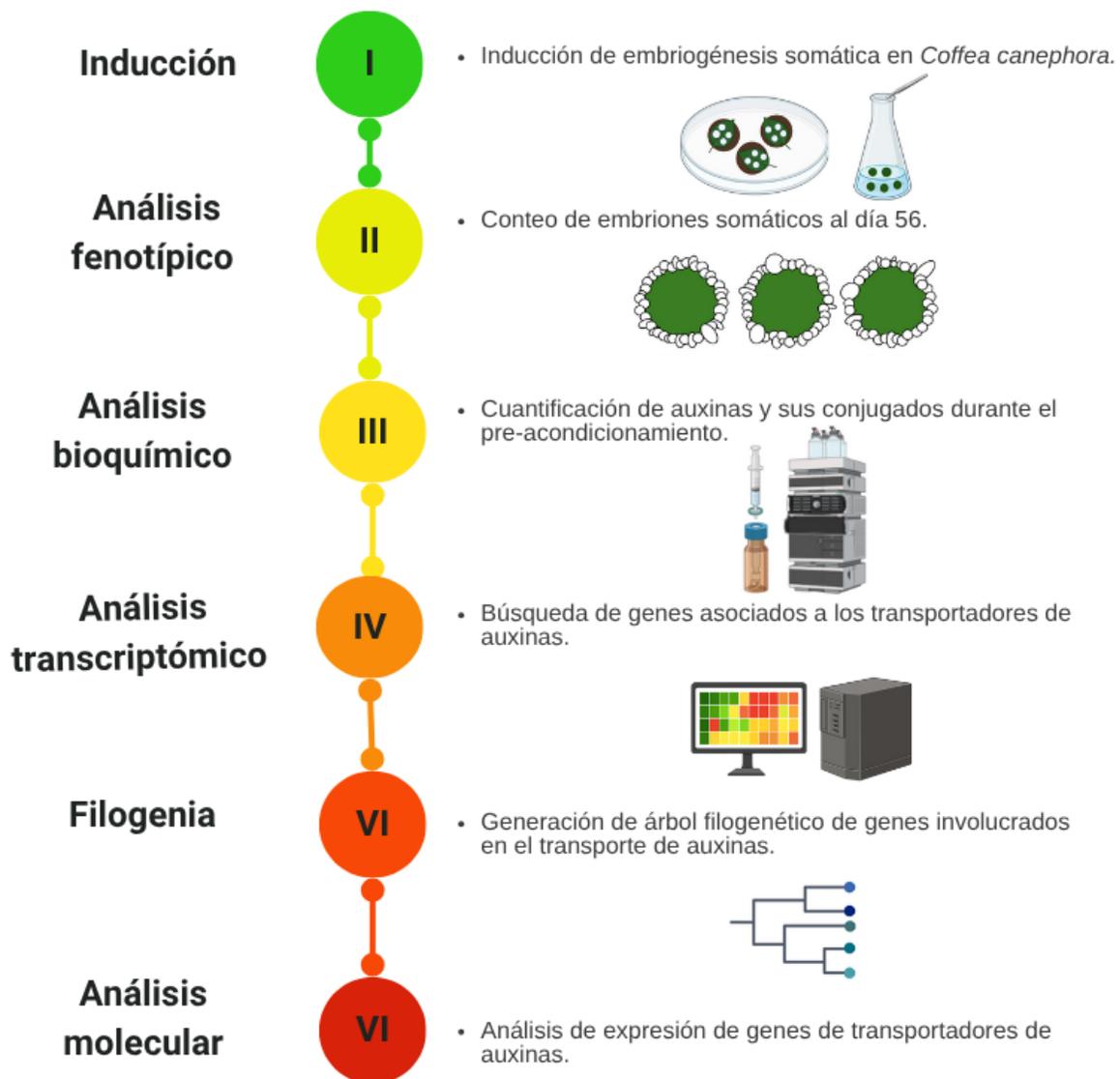


Figura 1.5 Diagrama general de la estrategia experimental.

## CAPÍTULO II

---

### CAPÍTULO II

#### MATERIALES Y MÉTODOS

##### 2.1. MATERIALES

###### 2.1.1. Material biológico

Las plántulas de *C. canephora* fueron cultivadas *in vitro* en medio de mantenimiento de Murashige y Skoog (1962) (MS) que consiste en un medio semisólido adicionado con tiamina-HCl 29.6 µM, mio-inositol 550 µM, L-cisteína 0.15 µM (Sigma-Aldrich, C121800), sacarosa 87.64 mM (Sigma-Aldrich, S 5391) y 0.25% Gellan Gum (PhytoTechnology Laboratories, G434). El pH del medio fue ajustado a 5.8 y esterilizado a 121 °C por 20 minutos. Las plántulas se cultivaron bajo un fotoperiodo de 16/8 h luz/ (150 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) /oscuridad a una temperatura de 25° C. y fue reseñado cada 4 semanas de acuerdo con el protocolo de (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006a).

###### 2.1.2. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Para la inducción de la ES de *C. canephora* las plántulas fueron colocadas por 14 días en un medio de pre – acondicionamiento, el cual contenía 0.44 µM de ácido naftalén acético (ANA) (SIGMA, K0763-5G) y 2.32 µM de kinetina (KIN) (Sigma-Aldrich, K0763-5G).

La inducción de la ES fue realizada de acuerdo con el protocolo de Quiroz-Figueroa *et al.* (2006a). Brevemente, pasados los 14 días del pre – acondicionamiento, se obtuvieron explantes foliares del segundo y tercer par de hojas, con ayuda de un sacabocados de 0.8 mm. Cinco explantes se depositaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían 50 mL de medio líquido (Yasuda *et al.*, 1985), con 5 µM de benciladenina (Phyto Technology Laboratories, B800). Los matraces se mantuvieron en agitación a 55 rpm en condiciones de oscuridad a una temperatura de 25 ± 2 ° C, durante un periodo de 56 días.

## **2.2. MÉTODOS**

### **2.2.1. CONTEO DE LA PRODUCCIÓN EMBRIOGÉNICA**

El conteo del número de embriones somáticos se llevó a cabo 56 días después del día de la inducción, se contabilizaron los 5 explantes en cada matraz, por un total de 3 matraces. Para el conteo los embriones fueron separados y contabilizados de acuerdo con su estadio de desarrollo. Para visualizar los embriones para su conteo se utilizó un estereoscopio marca Nikon SMZ745T equipado con una cámara Canon modelo DS126311

### **2.2.2. EXTRACCIÓN DE AUXINAS**

Para la cuantificación de las Aux se colectaron 100 mg de tejido foliar para cada punto de muestreo y se congeló a -80 °C y almacenado hasta su uso. Todos los análisis se llevaron a cabo con un mínimo de dos réplicas biológicas.

El tejido congelado fue liofilizado durante 48 horas, posteriormente macerado y pesado. Se colocaron 20 mg de muestra en cada tubo Eppendorf de 2 mL, a los cuales se añadieron 200 µL de agua ácida (pH 2.8, ajustado con HCl). Luego, se añadieron 200 µL de una solución de hidroxitolueno butilado (Agros Organics) y acetato de etilo (MERCK, 506188N). La mezcla fue agitada en un vórtex (Scientific Industries, Vortex Genie 2) durante 2 min y posteriormente centrifugada (Hettich- Mikro 22R) a 20,000 × g durante 5 min. Se tomó la fase superior (fase orgánica) y se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y seco. Se añadieron nuevamente 200 µL de hidroxitolueno butilado (Agros Organics) y acetato de etilo (MERCK, 506188N). La mezcla fue agitada en un vórtex durante 2 min y centrifugada (Hettich- Mikro 22R) nuevamente a 20,000 × g por 5 minutos.

Después de separar las fases, se extrajo la fase orgánica y se añadió al tubo Eppendorf que contenía las extracciones anteriores. Este procedimiento se repitió una vez más, añadiendo 200 µL adicionales de hidroxitolueno butilado (Agros Organics) y acetato de

## CAPÍTULO II

---

etilo (MERCK, 506188N). La mezcla se agitó en un vórtex por 2 min y se centrifugó (Hettich- Mikro 22R) a 20,000 x g por 5 minutos. Finalmente, la fase orgánica extraída fue colocada en el mismo tubo Eppendorf con las extracciones previas.

Las muestras fueron evaporadas en un SpeedVac (Labconco, CentriVap Micro IR) a 35 °C durante 15 min. Una vez secas, las muestras se almacenaron a -80 °C (Thermo Scientific, 8922) hasta su resuspensión.

Para el análisis mediante HPLC, las muestras se resuspendieron en 500 µL de la fase móvil, compuesta por 60% de acetonitrilo (MEYER, 75-05-8) y 40% de agua HPLC (J.T. Baker, 4218-03) con 0.5% de ácido acético (TEDIA, AS1102-002). Finalmente, las muestras resuspendidas fueron filtradas con una jeringa a través de un filtro de membrana de nailon (MILLEX-GN, SLGNX13NK) y transferidas a viales para HPLC.

### **2.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS AUXINAS Y SUS CONJUGADOS.**

Para su análisis las muestras fueron inyectadas en el HPLC (Thermo Scientific, Ultimate 3000). Se utilizó un gradiente isocrático en una columna de fase reversa C<sub>18</sub> utilizando como fase móvil, una relación de acetonitrilo (MEYER, 75-05-8) - ácido acético (TEDIA, AS1102-002) al 0.5% (6:4 v/v), previamente desgasificada y a una velocidad de flujo de 0.6 mL min<sup>-1</sup>. La detección de las Aux se realizó con un detector de fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 280 nm y de emisión de 340 nm.

Para la cuantificación de las Aux se comparó el área de los picos de las muestras con el área de los picos de una curva de calibración.

### **2.2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para análisis estadístico se utilizó el software R (V 4.3.3) para realizar pruebas de normalidad. Los datos que seguían una distribución normal fueron analizados a través de la prueba ANOVA ( $P > 0.05$ ), mientras que los datos no paramétricos fueron analizados con la prueba de Kruskal-Wallis.

### 2.2.5 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA

La búsqueda de los genes de la familia PIN se llevó a cabo en el transcriptoma de *C. canephora* reportado recientemente por Couoh-Cahuich et al. (2025). De los 23,375 unigenes reportados en el transcriptoma, se identificaron 25 unigenes pertenecientes a los transportadores de Aux. Los mapas de calor fueron generados usando la plataforma “heatmapper” (diciembre 2024; [www.heatmapper.ca](http://www.heatmapper.ca)) utilizando el cálculo del valor Z y el método de agrupamiento de unión completa y medición de distancia euclidiana.

### 2.2.6. ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Para la obtención de los árboles filogenéticos, las secuencias de los genes pertenecientes a las familias *PIN* y *ABCB* de las diferentes especies fueron alineadas por medio de CLUSTAL W, y posteriormente estos alineamientos permitieron la generación de las filogenias dentro del software MEGA 12 (enero 2025; [www.megasoftware.net/](http://www.megasoftware.net/)). Se aplico el método neighbor-joining (NJ) a una matriz de distancias por pares estimadas utilizando el enfoque de máxima verosimilitud compuesta (MCL). El análisis involucro un total de 98 secuencias. El porcentaje de replicas en el que los taxones asociados se agruparon en la prueba Bootstrap (1000 réplicas) se muestra junto a las ramas. Todas las secuencias fueron obtenidas de NCBI (enero 2025, [www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

### 2.2.7. EXTRACCIÓN DE ARN Y SÍNTESIS DE ADNc.

El ARN total fue aislado utilizando el método de extracción por TRIZOL (93289, Sigma) a partir de 100 mg de muestra de pre-acondicionamiento (días -14, -9 y 0) y días posteriores a la inducción (7, 14, 21). El tejido fue congelado a -80 °C hasta su utilización. La concentración y pureza del ARN fueron verificadas por medio de un Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) y fueron analizadas en geles de agarosa (Promega) al 1.5 % y teñidos con GelRed (Sigma, 41003).

## CAPÍTULO II

---

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit de síntesis Thermo Scientific (K1622), siguiendo las instrucciones del fabricante, partiendo de 1000 ng de ARN.

### 2.2.8. DISEÑO DE CEBADORES

Los cebadores para analizar la expresión de los genes que codifican para los transportadores de eflujo (*LAX1*) y eflujo (*PIN1*, *PIN5*, *ABCB1*, *ABCB19*) de las auxinas fueron diseñados partiendo del transcriptoma de *C. canephora* (Couch-Cauchic *et al.*, 2025) (Tabla 2.1). Las herramientas bioinformáticas utilizadas fueron Oligocalc version 3.27, OligoEvaluator y OligoAnalyzer. Finalmente, también se evaluó *in silico* la efectividad de los cebadores en la plataforma Solgenomics.

<i>Gen</i>	<b>Forward</b>	<b>Reverse</b>	<b>Tamaño (pb)</b>
<i>PIN1</i>	AAGCGTGATGACAAGGCTGA	CGGTTGCAAAGCCATGAACA	127
<i>PIN5</i>	TTGTGGGAGTGCCTATTGCC	TGTCAGCCGCCTTTGAATCT	183
<i>LAX1</i>	GGTCATGCTGTCACTGTGGA	ACGAAAACGAGTGCGAGGAA	192
<i>ABCB1</i>	CAGGCCAGGTGGAGCTAAAA	TCTGCTGCCTCAGCCATCTA	243
<i>ABCB19</i>	GGGAATTGCTTTTGCTGGGG	AGGTGCATCCCAATCCAAGG	238
<i>ACTINA</i>	GTCAAGGCTGGTTTTGCTGG	CAATGCCATGCTCGATTGGG	178

**Tabla 2.1:** Cebadores diseñados para el análisis de expresión de los genes que codifican para los transportadores de Aux estudiados.

### 2.2.9. CONDICIONES PARA LA PCR.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo empleando una concentración inicial de 500 ng de ADNc para cada una de las muestras, 0.15  $\mu$ L de Taq ADN polimerasa, 1  $\mu$ L de cada cebador (10 mM), 0.5  $\mu$ L de dNTPS (10 mM), 2.5  $\mu$ L de amortiguador 10 $\times$ , y 1.5  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> para analizar la expresión de los genes *PIN5*, *LAX1*, *ABCB1*, *ABCB19* y *actina*; para el caso de *PIN1* el volumen se modificó a 2  $\mu$ L y el volumen total fue ajustado con agua libre de nucleasas a un volumen final de 25  $\mu$ L.

Las condiciones de corrida de los genes fueron las siguientes:

- *PIN1*: 95 °C durante 2 minutos, 32 ciclos de 95 °C durante 30s, 64 °C durante 30s, 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.
- *PIN5*: 95 °C durante 2 minutos, 32 ciclos de 95 °C durante 30s, 58 °C durante 30s, 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.
- *LAX1*: 95 °C durante 2 minutos, 32 ciclos de 95 °C durante 30s, 60 °C durante 30s, 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.
- *ABCB1*: 95 °C durante 2 minutos, 32 ciclos de 95 °C durante 30s, 56 °C durante 30s, 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.
- *ABCB19*: 95 °C durante 2 minutos, 32 ciclos de 95 °C durante 30s, 56 °C durante 30s, 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.
- *ACTINA*: 95 °C durante 2 minutos, 32 ciclos de 95 °C durante 30s, 60 °C durante 30s, 72 °C durante 1 minuto y una extensión final de 72 °C durante 10 minutos.

Los productos obtenidos de la PCR fueron visualizados en un gel de agarosa (Promega) al 2% y teñidos con GelRed (Sigma, 41003).

### **2.2.10. ANÁLISIS DENSITOMÉTRICO**

Se llevó a cabo un análisis densitométrico de cada gel en los distintos días de pre-acondicionamiento e inducción durante la ES, utilizando el software ImageJ. Las imágenes de los geles se importaron al programa, donde se seleccionaron las bandas correspondientes para cuantificar el área y el porcentaje de intensidad de cada banda en cada réplica. Los datos obtenidos fueron normalizados y posteriormente representados gráficamente.

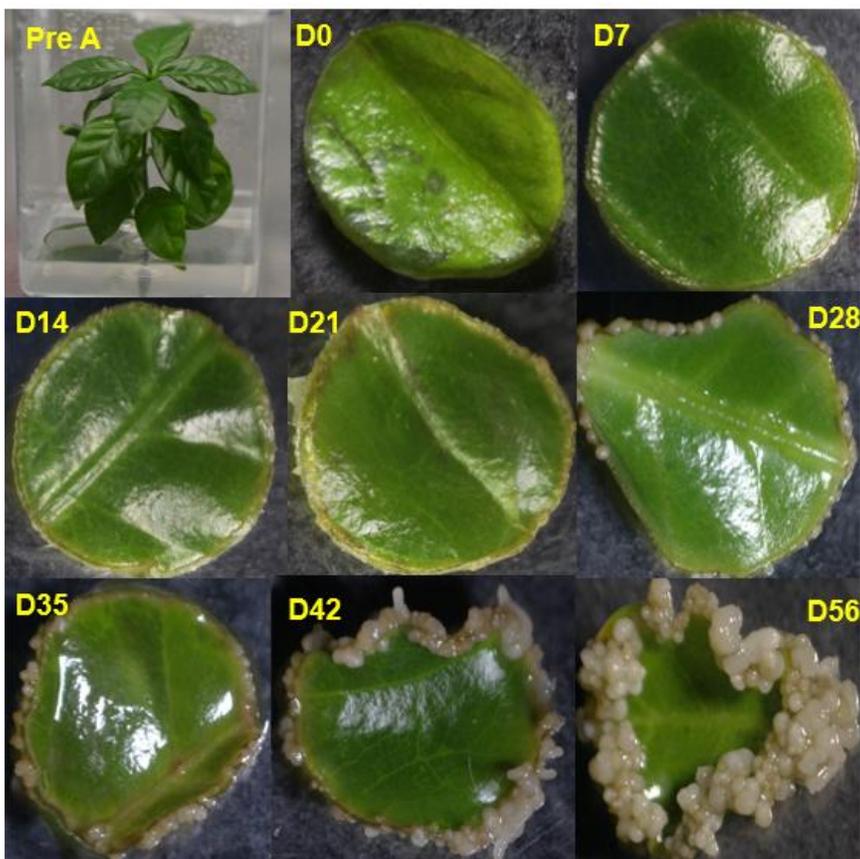
## CAPÍTULO III

## CAPÍTULO III

## RESULTADOS

### 3.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La inducción de la ES se realizó de acuerdo con el protocolo establecido por Quiroz-Figueroa et al. (Quiroz-Figueroa et al., 2006a). Fueron fotografiados diferentes días del proceso de nuestra inducción para observar su progreso y la formación de embriones somáticos (Figura 3.1).



**Figura 3.1** Proceso de embriogénesis somática a través de los días.

14 días antes de la inducción de la embriogénesis somática, las plantas de *C. canephora* fueron expuestas en un medio adicionado con ácido naftalén acético y kinetina (Figura 3.1, Pre A), una vez transcurridos los 14 días, los explantes se obtuvieron del segundo y

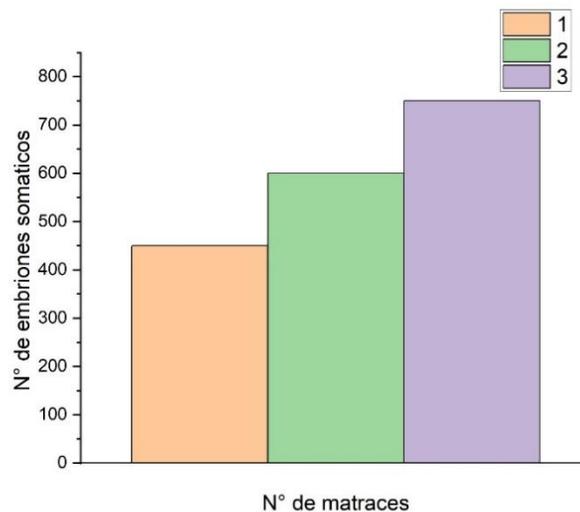
---

tercer par de hojas con la ayuda de una sacabocado de 8 mm (Figura 3.1, D0). Este consideró como día 0 de la inducción de la ES.

Siete días después de la inducción (Figura 3.1, D7) no se observaron cambios morfológicos en el explante. Al día 14 (Figura 3.1, D14) se encontró una ligera decoloración en el perímetro del explante. Al día 21 (Figura 3.1, D21) ya se puede apreciar la formación de masa pre-embriogénica en el perímetro del explante. Al día 28 (Figura 3.1, D28) se observaron las primeras estructuras globulares en el borde del explante, y al día 35 (Figura 3.1, D35) se observó un aumento en el número de embriones somáticos y en desarrollo. Este aumento continuó para el día 42 (Figura 3.1, D42). Después de 56 días de iniciada la inducción de la ES se observó un aumento exponencial en el número de estructuras embriogénicas, las cuales se encontraban en diferentes estadios de desarrollo.

### 3.2 CONTEO DE EMBRIONES SOMÁTICOS

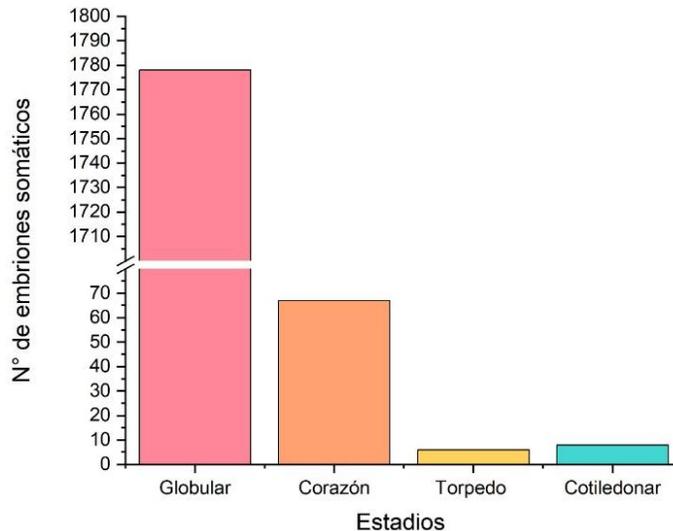
El conteo de los embriones somáticos se llevó a cabo 56 días después a la inducción. Se contaron los embriones de tres matraces, cada uno conteniendo 5 explantes.



**Figura 3.2** Número de embriones somáticos por matraz. El conteo de embriones se realizó en tres matraces con cinco explantes cada uno.

### CAPÍTULO III

El resultado del conteo fue el siguiente (Figura 3.2): 1er matraz se obtuvieron 450 embriones, 2º matraz se obtuvieron 600 embriones y en el 3er matraz se obtuvieron 750 embriones somáticos.

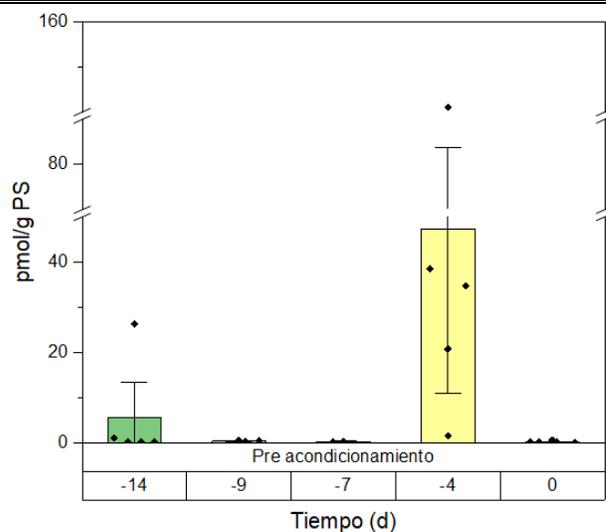


**Figura 3.3** Número de embriones somáticos de acuerdo con su estadio.

Los embriones somáticos obtenidos fueron contabilizados de acuerdo en su estadio de desarrollo sumando los embriones de los tres matraces para cada estadio de desarrollo (Figura 3.3). Los resultados obtenidos fueron los siguientes. Se obtuvieron 1,778 embriones en el estadio globular. En el estadio de corazón se obtuvieron 67 embriones, en la etapa de torpedo 6 embriones y finalmente se obtuvieron 8 embriones en su estadio cotiledonar.

### 3.3 CUANTIFICACIÓN DE AUXINA LIBRE (AIA) Y SUS CONJUGADOS.

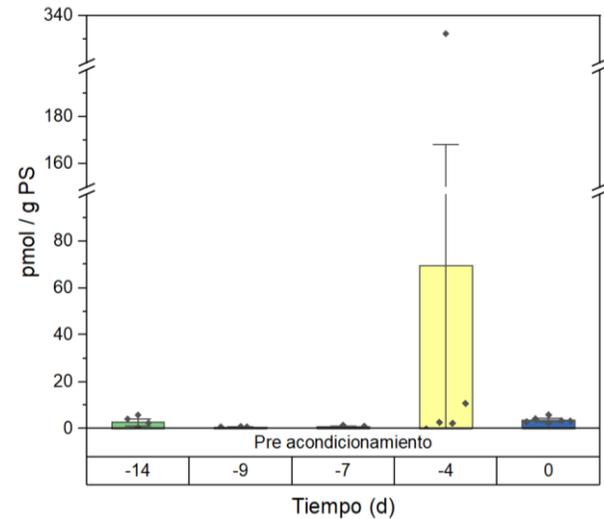
La cuantificación del AIA y sus conjugados con aminoácidos (leucina, alanina, glutamato y aspártico) se realizó de acuerdo con el protocolo de Dobrev et al. (2017).



**Figura 3.4** Gráfica de cuantificación del ácido-3-indol acético libre durante el pre-acondicionamiento (días -14, -9, -7, -4 y 0) en unidades de pico moles por gramo de peso fresco. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Los puntos individuales muestran los datos crudos (n=5). La prueba ANOVA reveló diferencias significativas entre los tiempos ( $p < 0.05$ ), destacando el pico en el día -4.

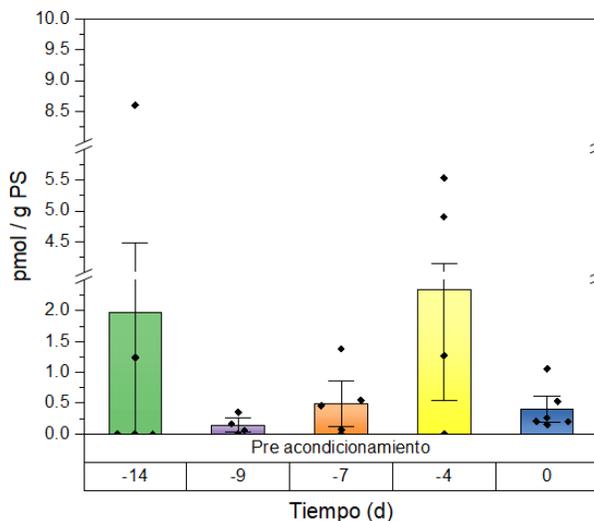
En la Figura 3.4 se presentan los resultados de la cuantificación mediante HPLC de ácido-3-indolacético libre. En el día -14 se determinó una concentración de 10 pmoles, la cual disminuyó de manera significativa en los días -9 y -7. En el día -4 se observó un incremento exponencial, alcanzando un valor de 50 pmoles  $g\ PS^{-1}$ , seguido de una reducción en el día 0, momento en el que los explantes son transferidos al medio de inducción.

### CAPÍTULO III



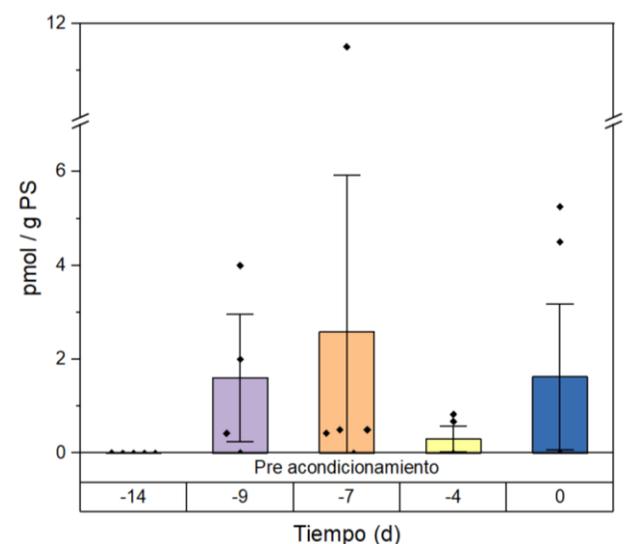
**Figura 3.5** Grafica de cuantificación de ácido-3-indol acético (AIA) conjugado con leucina por medio de HPLC durante el pre acondicionamiento, siendo el día -4 con mayor cantidad de AIA-Leu y el día -7 con menor AIA-Leu en picomoles por gramos de peso seco. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Los puntos individuales muestran los datos crudos (n=5). La prueba ANOVA reveló diferencias significativas entre los tiempos ( $p < 0.05$ ), destacando el pico en el día -4.

En la Figura 3.5 se presentan los resultados de la cuantificación mediante HPLC de AIA conjugado con leucina. En el día -14 se detectaron bajos niveles de AIA conjugado con leucina, los cuales disminuyeron aún más en los días -9 y -7. Sin embargo, en el día -4 se observó un aumento significativo, alcanzando 80 pmoles g PS<sup>-1</sup>, seguido de una nueva disminución en el día 0, con valores cercanos a 2 pmoles g PS<sup>-1</sup>.



**Figura 3.6** Cuantificación por medio de HPLC del ácido-3-indol acético conjugado con alanina durante el pre-acondicionamiento. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Los puntos individuales muestran los datos crudos (n=5). La prueba ANOVA reveló que no había diferencias significativas entre los tiempos ( $p>0.05$ ), destacando el pico en los días -14 y -4.

En la Figura 3.6 se presentan los resultados de la cuantificación mediante HPLC del ácido-3-indolacético conjugado con alanina. En el día -14 se detectan 2 pmoles g PS<sup>-1</sup>, cantidad que disminuye en el día -9, sigue con un ligero incremento en el día -7 y alcanza un valor de 2.5 pmoles g PS<sup>-1</sup> en el día -4. Posteriormente, los niveles se reducen a 0.5 pmoles g PS<sup>-1</sup> en el día 0.

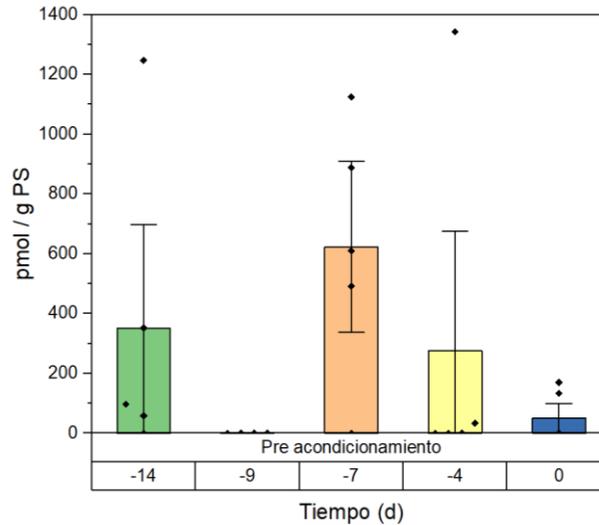


**Figura 3.7** Grafica de cuantificación de ácido-3- indol acetico conjugado con aspartico por medio de HPLC durante el pre-acondicionamiento, el día -14 muestra los niveles mas bajos y el día -7 los mayores niveles de AIA-Aspartico en picomoles por gramo de peso seco. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Los puntos individuales muestran los datos crudos (n=5). La prueba ANOVA reveló diferencias significativas entre los tiempos ( $p<0.05$ ).

En la **Figura 3.7** se presentan los resultados de la cuantificación mediante HPLC del ácido-3-indolacético conjugado con ácido aspártico. En el día -14 se cuantificaron concentraciones muy bajas, las cuales aumentaron al día -9 hasta 2 pmoles g PS<sup>-1</sup>. En

### CAPÍTULO III

el día -7, los niveles continuaron incrementándose y alcanzaron 2.5 pmoles g PS<sup>-1</sup>. Sin embargo, en el día -4 se observó una disminución hasta 0.5 pmoles g PS<sup>-1</sup>, seguida de un nuevo aumento al día 0, alcanzando valores de 2 pmoles g PS<sup>-1</sup>.

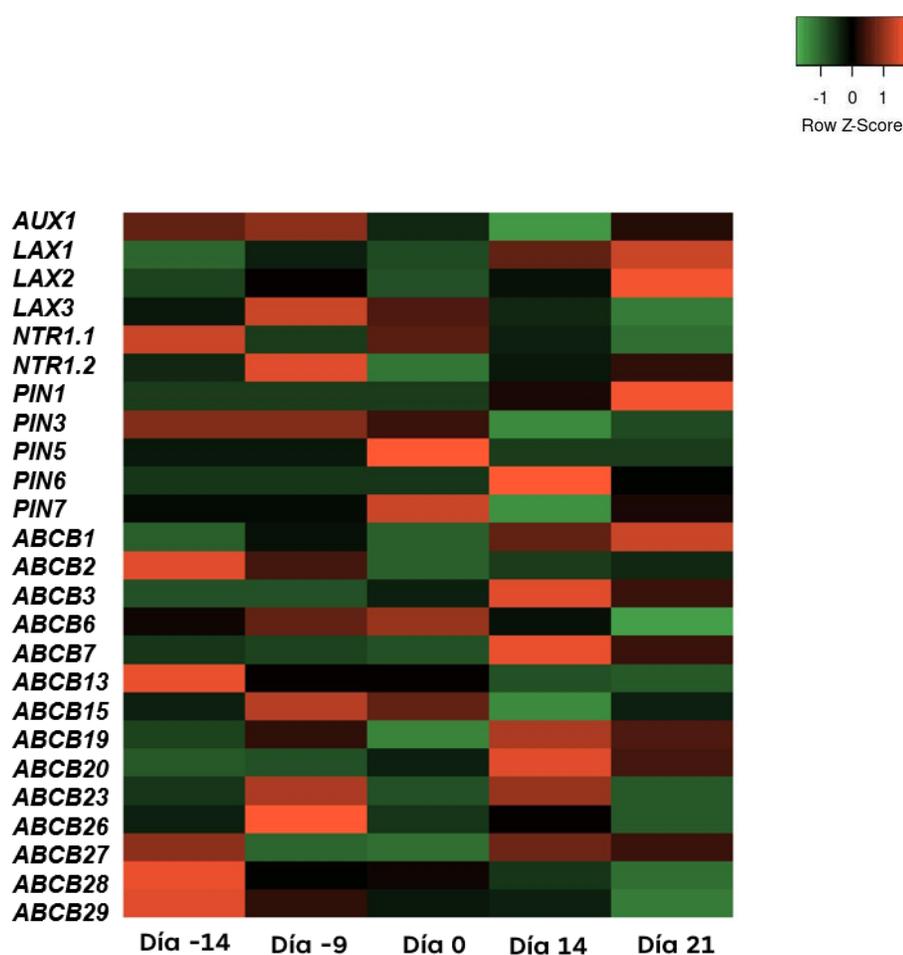


**Figura 3.8** Grafica de cuantificación de ácido-3-indol acético conjugado con Glutámico por medio de HPLC durante el pre-acondicionamiento, el día -9 muestra los niveles mas bajos de AIA-Glutámico y el día -7 los mayores niveles de AIA-Glutámico en picomoles por gramos de peso seco. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media. Los puntos individuales muestran los datos crudos (n=5). La prueba ANOVA reveló que no había diferencias significativas entre los tiempos ( $p < 0.05$ ).

En la **Figura 3.8** se presentan los resultados de la cuantificación mediante HPLC del ácido-3-indol acético conjugado con ácido glutámico. En el día -14 se cuantificó una concentración de 350 pmoles g PS<sup>-1</sup>, la cual disminuyó drásticamente en el día -9. Posteriormente, se observó un aumento exponencial, alcanzando 600 pmoles g PS<sup>-1</sup> en el día -7. Esta concentración disminuyó a 300 pmoles en el día -4 y continuó descendiendo hasta 50 pmoles g PS<sup>-1</sup> en el día 0.

### 3.4 ANÁLISIS DEL TRANSCRIPTOMA

En el estudio de las interacciones genéticas relacionadas con los transportadores de auxinas del transcriptoma de *C. canephora* (Cough-Cauich *et al.*, 2025), se identificaron 25 unigenes asociados con este proceso. De estos, cuatro pertenecen a la familia *AUX/LAX* (*AUX1*, *LAX1*, *LAX2* y *LAX3*), dos a la familia *NTR* (*NTR1.1* y *NTR1.2*), cinco que corresponden a la familia *PIN* (*PIN1*, *PIN3*, *PIN5*, *PIN6* y *PIN8*) y 14 a la familia *ABCB* (*ABCB1*, *ABCB2*, *ABCB3*, *ABCB6*, *ABCB7*, *ABCB13*, *ABCB15*, *ABCB19*, *ABCB20*, *ABCB23*, *ABCB26*, *ABCB27*, *ABCB28* y *ABCB29*).



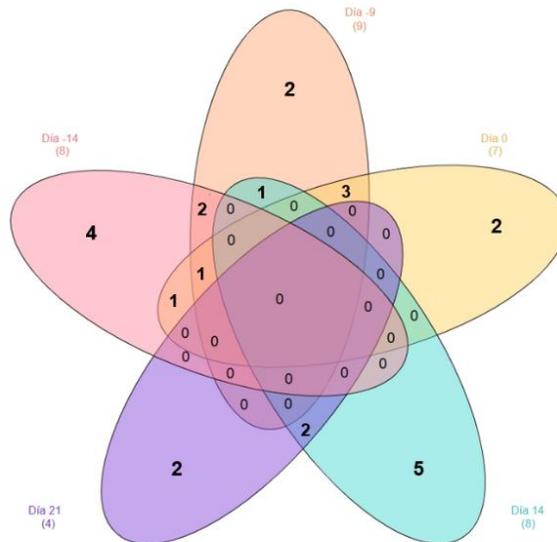
**Figura 3.9** Mapa de calor correspondiente a las familias de genes relacionadas con los transportadores de auxinas, color rojo correspondiente a genes a la alta y color verde correspondiente a genes a la baja.

En el mapa de calor generado de la expresión de los genes para la familia *AUX/LAX* se puede apreciar que, para el día -14, el gen con mayor expresión es *AUX1*. Al día -9, la expresión del gen *AUX1* aumenta, al igual que la del gen *LAX3*. Para el día 0, la expresión del gen *LAX3* disminuye. Durante el proceso de inducción, al día 14, se observa un aumento en la expresión del gen *LAX1*, y al día 21, la expresión de *LAX1* continúa incrementándose. Además, en este punto también se registra un aumento en la expresión del gen *LAX2*.

El mismo análisis para la expresión de los genes de la familia de los genes *PIN* muestra que, para el día -14, el gen *PIN3* aumenta su expresión. Para el día -9, los genes *PIN3* y *PIN8* presentan un aumento significativo en su expresión. Al día 0, se observa un drástico aumento en la expresión del gen *PIN5*. Al día 14, el gen *PIN6* muestra un aumento considerable en su expresión, y al día 21, *PIN1* es el único gen que registra altos niveles de expresión.

En el caso de la familia *ABCB*, el análisis de su expresión durante el estudio muestra que al día -14 observamos una mayor expresión de *ABCB2*, *ABCB13*, *ABCB27*, *ABCB28* y *ABCB29*, para el día -9 un aumento de expresión en *ABCB15*, *ABCB23* y *ABCB26*, para el día 0 los genes *ABCB6* y *ABCB15* muestran una mayor expresión, para el día 14 se observa una expresión a la alta de *ABCB3*, *ABCB7*, *ABCB19* y *ABCB20*, finalmente para el día 21 se muestra un aumento significativo en la expresión de *ABCB1*.

### CAPÍTULO III



**Figura 3.10** Diagrama de Venn de los genes diferencialmente expresados (GDE) en cada día analizado del proceso de inducción de ES. Las regiones traslapadas muestran el número de GDE compartidos entre cada día del proceso.

El análisis de expresión diferencial (Figura 3.10) en los días antes de la inducción nos permitió observar al día -14 (color rosa) 8 genes diferencialmente expresados a la alta (*AUX1*, *NTR1.1*, *ABCB2*, *ABCB13*, *ABCB27*, *ABCB28*, *ABCB29*), al día -9 (color naranja) 9 genes diferencialmente expresados (*AUX1*, *LAX3*, *NTR1.2*, *PIN3*, *ABCB2*, *ABCB6*, *ABCB15*, *ABCB23*, y *ABCB26*) y al día 0 (color amarillo) 7 genes diferencialmente expresados (*PIN5*, *PIN7*, *LAX3*, *NTR1.1*, *PIN3*, *ABCB6* y *ABCB15*)

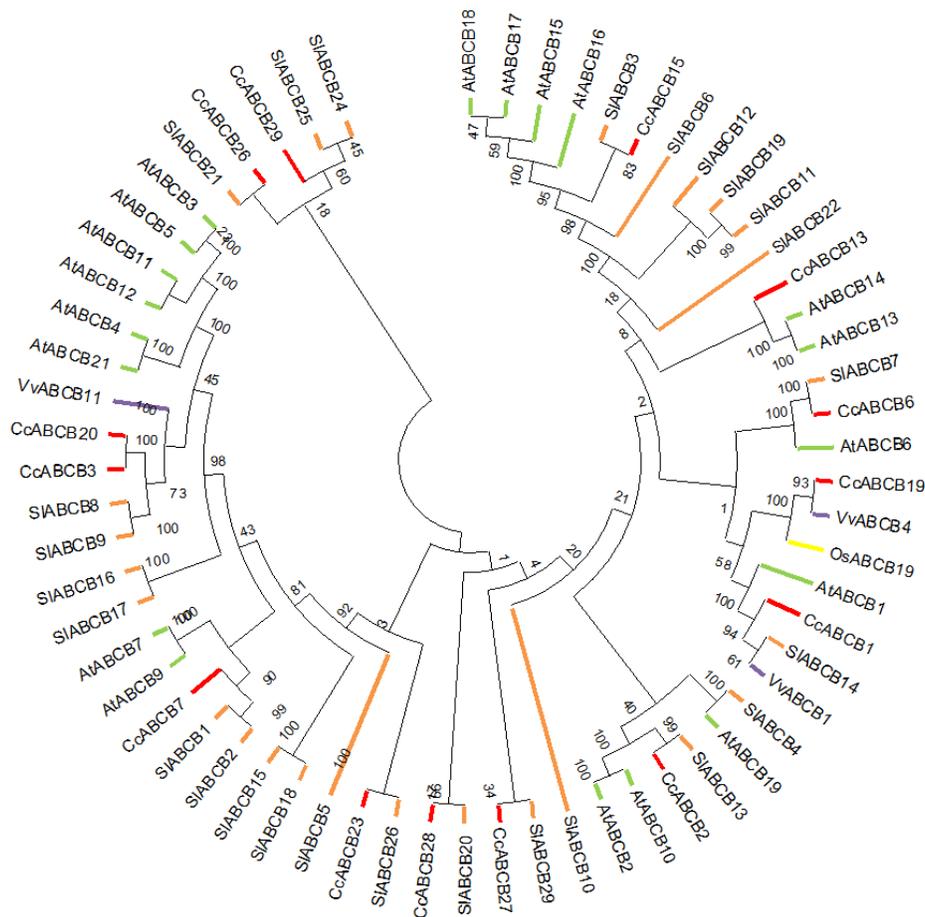
Dentro de estos días, se observan GDE que se pueden encontrar en más de un día del proceso, en el caso del día -14 vs. -9 se encuentran dos GDE (*AUX1* y *ABCB2*), en ambos días, para -14 vs. 0 se encuentra un GDE (*NTR1.1*), para -9 vs 0 se encuentran tres GDE (*LAX3*, *ABCB6* y *ABCB15*), y para -14 vs 0 se encuentra un GDE (*PIN3*).

En cuanto a los días posteriores a la inducción (14 y 21), al día 14 (color azul) se encuentran cinco genes diferencialmente expresados a la alta (*ABCB19*, *ABCB20*, *ABCB23*, *PIN6* y *ABCB1*) y al día 21 (color púrpura) se encuentran cuatro genes diferencialmente expresados a la alta (*LAX1*, *LAX2*, *ABCB1* y *PIN1*). Dentro de la

comparativa de 0 vs. 14 y 0 vs. 21, no se encontraron GDE, sin embargo, en el caso de 14 vs. 21 se encontraron 2 GDE (*LAX1* y *ABCB1*).

### 3.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.

Las diferencias evolutivas de las familias *PIN* y *ABCB* pudieron ser visualizadas con la construcción de filogenias. Para el análisis las especies seleccionadas fueron *Arabidopsis thaliana* (representante del grupo de las dicotiledóneas), *Oriza sativa* (grupo de las monocotiledóneas), *Solanum lycopersicum* (especie cerca taxonómicamente al modelo de estudio), *Vitis vinifera* (especie con investigaciones previas al papel de los transportadores de auxinas en la ES) y *C. canephora*.

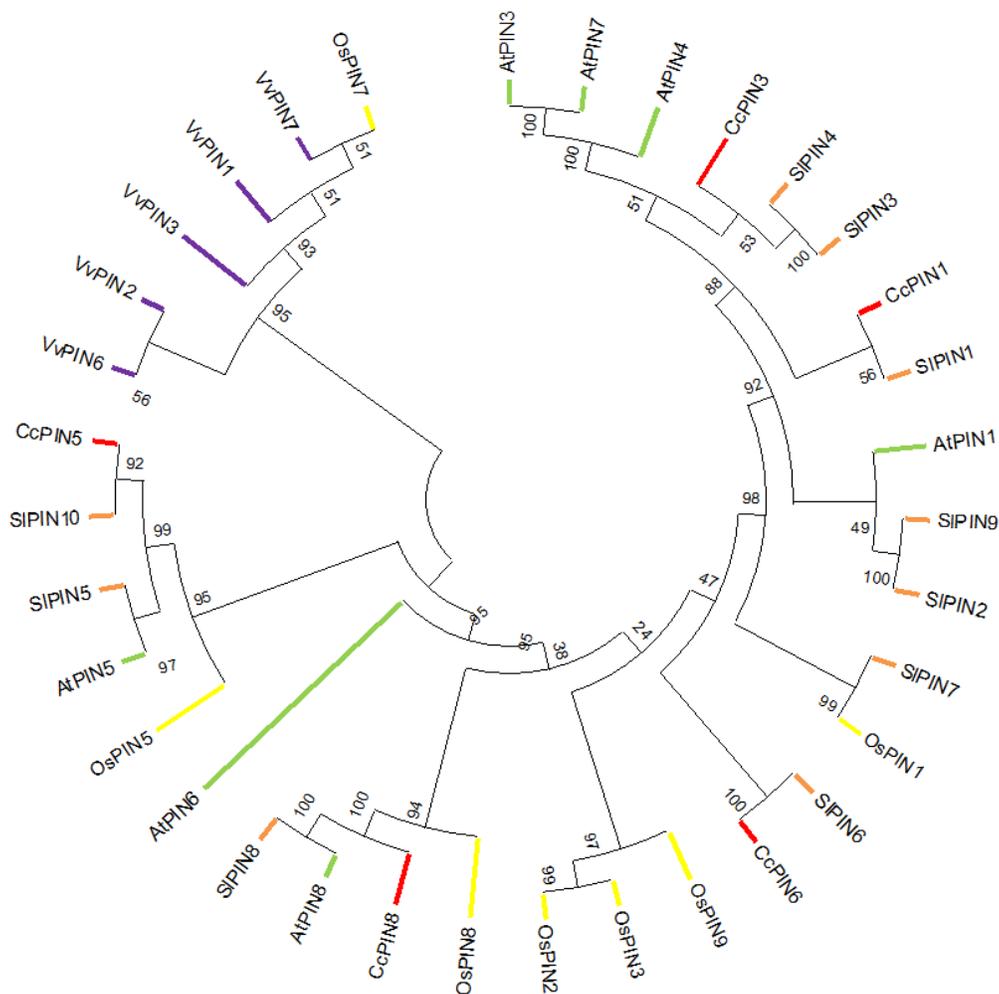


**Figura 3.11** Análisis filogenético de la familia de transportadores ABCB en las diferentes especies seleccionadas.

### CAPÍTULO III

La relación filogenética entre los miembros de las familia *ABCB* en diferentes especies (Figura 3.11) se realizó con 19 secuencias correspondientes a *A. thaliana*, siete secuencias correspondientes a *O. sativa*, 26 secuencias de *S. lycopersicum*, 14 secuencias de *C. canephora* y tres secuencias de *V. vinifera*.

Este análisis filogenético reveló una relación cercana entre el gen *CcABCB19* con genes como *VvABCB4* y *OsABCB19*. Cercano a estos podemos encontrar al gen *AtABCB1*, el cual muestra una cercana relación con el gen *CcABCB1*.



**Figura 3.12** Análisis filogenético de la familia de transportadores PIN en las diferentes especies seleccionada.

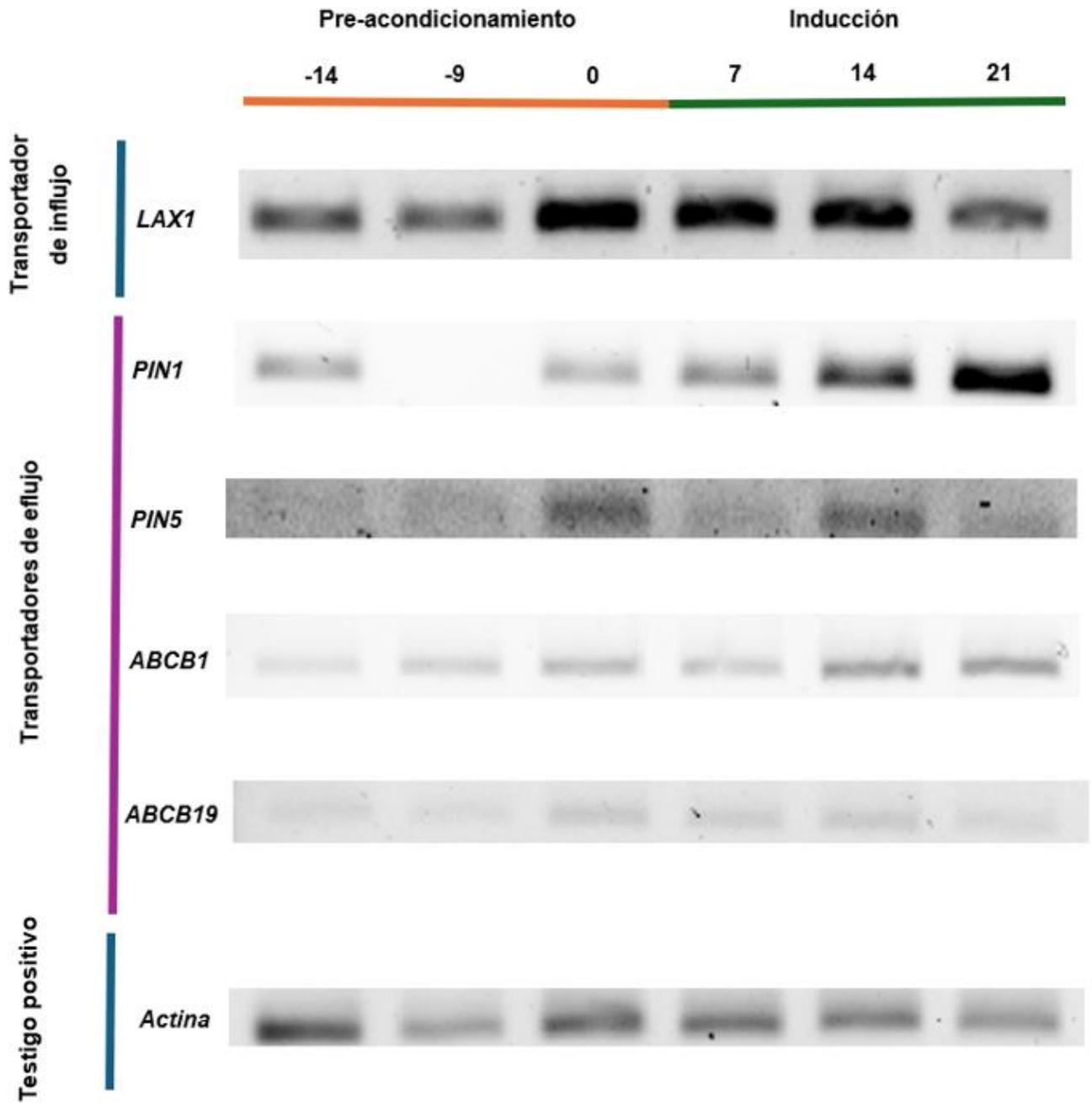
La relación filogenética entre los miembros de la familia PIN en diferentes especies (Figura 3.12) conto con 7 secuencias pertenecientes a *A. thaliana*, una secuencia perteneciente a *O. sativa*, 10 secuencias de *S. lycopersicum*, cinco secuencias de *C. canephora* y seis secuencias de *V. vinifera*.

El análisis filogenético perteneciente a esta familia de transportadores de eflujo mostró una relación cercana de los genes *CcPIN1* y *SIPIN1*, contando ambos con relación estadísticamente confiable con *AtPIN1*. Otro dato muy interesante es la cercanía del gen *CcPIN5* con *SIPIN10*, contando ambos con una relación estadísticamente confiable al gen *AtPIN5*.

### 3.5 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA.

Para el análisis de expresión genética se evaluaron la expresión de los genes *LAX1*, *ABCB1*, *ABCB19*, *PIN1* y *PIN5*, cuyos productos se encuentran involucrados en el transporte de las Aux; con ello generan gradientes de concentración. Se seleccionó al gen de la actina como testigo positivo.

### CAPÍTULO III



**Figura 3.13** Análisis de expresión de genes asociados a transportadores de auxinas durante el pre-acondicionamiento (días -14, -9), día de la inducción (día 0) y días después de la inducción (días 7, 14 y 21).

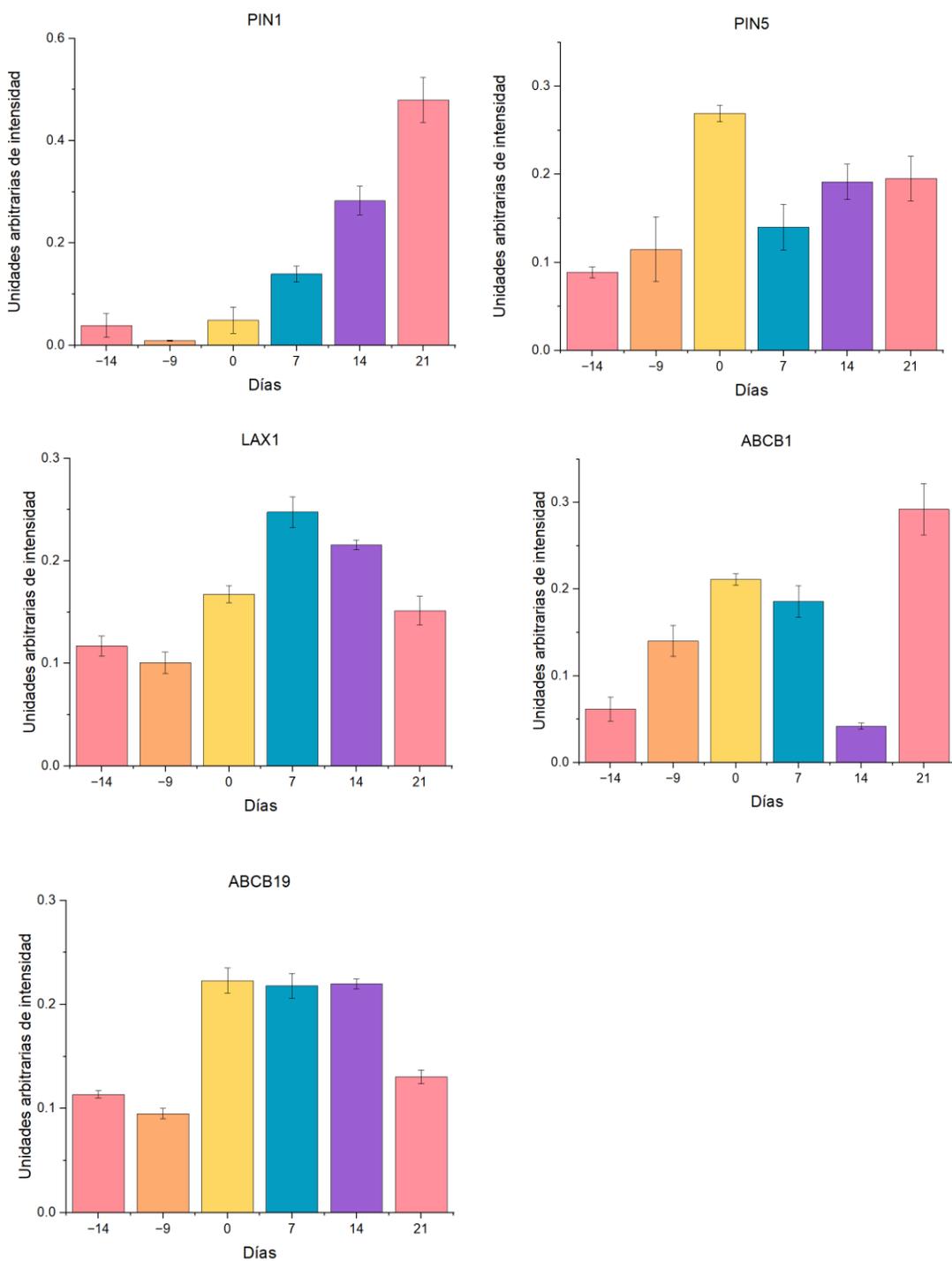


Figura 3.14 Análisis densitométrico de los geles resultantes de la PCR.

### **CAPÍTULO III**

De acuerdo con los análisis de expresión (Figura 3.13) y el análisis densitométrico (Figura 3.14), *PIN1* muestra un aumento a partir del día 0 hasta el día 21, el cual es el día mayor expresión. Para el caso de *PIN5* su expresión es variada durante el pre-acondicionamiento e inducción. El transportador *LAX1* se muestra un aumento progresivo en el pre-acondicionamiento (del día -14 al día 0), siguiendo con la misma tendencia en los primeros puntos de inducción (día 7) para finalmente comenzar a disminuir durante los días 14 y 21.

Los transportadores de eflujo como *ABCB1* y *ABCB19*, el primero muestra un aumento al día -9 y mantiene esta tendencia al día 0, comienza a disminuir al día 7, para en el día 14 de inducción muestra un descenso drástico, aumentando abruptamente al día 21, caso contrario de *ABCB19* el cual muestra expresión constante en los primeros días de inducción (0, 7, y 14) y una fuerte disminución al día 21.



## CAPÍTULO IV

## CAPÍTULO IV

### 4. DISCUSIÓN

La ES se ha posicionado como una gran técnica biotecnológica que permite propagar de forma masiva especies de importancia económica como *C. canephora*. A pesar de que esta técnica ha sido estudiada en múltiples especies, aún hay diversos factores celulares, bioquímicos, moleculares y genéticos que no se conocen.

Se sabe que diversos factores influyen en la inducción de la ES, entre ellos los RCV. De este grupo de compuestos el más estudiado es el grupo de las Aux. Estos compuestos están formados por un anillo indólico y una cadena lateral de ácido acético (Ljung, 2013). Durante la inducción de la ES, las Aux juegan un importante papel, si bien aún no se conoce el mecanismo mediante el cual modifican la respuesta morfogénica. Se sabe que su homeostasis es muy importante, de lo que se puede inferir la importancia de sus transportadores. De hecho, la inhibición del transporte de las Aux produce la inhibición en el desarrollo de las estructuras embriogénicas.

En el sistema de ES de *C. canephora* desarrollado en nuestro laboratorio (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006a), el cual se encuentra condicionado por la etapa de precondicionamiento, la cual cuenta con una duración de 14 días, generando exposición a nuestra planta donadora en un medio adicionado con ANA y KIN (Loyola-Vargas *et al.*, 2016) (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006a)

De acuerdo con los resultados obtenidos durante el precondicionamiento, al día -14, siendo este el día donde se colocó nuestra planta en el medio adicionado con RCV, el análisis transcriptómico de *Coffea canephora* (**Figura 3.9**) en este día no muestra una mayor acumulación múltiples transportadores de eflujo e influjo, lo cual es respaldado por nuestra cuantificación de AIA libre (**Figura 3.4**) en este día, ya que muestra bajas cantidades de AIA libre al igual que cuantificaciones realizadas este mismo día (Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013)

Al día -9, han transcurrido 5 días de nuestra planta donadora en el medio de preacondicionamiento, ocasionando de acuerdo con el análisis transcriptómico (**Figura 3.9**) un aumento en la circulación de aux, generando una mayor acumulación de múltiples transportadores de eflujo e influjo (*LAX3*, *NTR1.2*, *PIN3*, *ABCB2*, *ABCB6*, *ABCB15*, *ABCB23*, *ABCB26*), nuestros resultados están correlacionados con lo reportado por (Márquez-López *et al.*, 2018) ya que su inmunolocalización en este día observo un aumento en el AIA en *Coffea canephora*, esto en comparación con el día -14.

Este incremento en el número de transcritos de transportadores podría permitir que las Aux que entran en el espacio citoplasmático sean conjugadas para su almacenamiento debido a su conjugación con alanina (**figura 3.6**) o degradación debido a su conjugación con aspártico (**figura 3.7**) y glutámico (**figura 3.8**). Resultados similares han sido observados en reportes previos de ES en *C. canephora* (Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013).

Durante el día -4 en nuestra cuantificación se puede observar un aumento en la producción de AIA libre debido a la exposición de la planta al medio adicionado con RCV (**Figura 3.4**). Nuestros resultados concuerdan con los experimentos reportados, ya que el contacto de nuestra planta con el medio de pre-acondicionamiento genera una activación de los genes *TAAC1* y *YUC1*, los cuales están relacionados con la biosíntesis de auxinas (Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013), además de que se ha visualizado un aumento de AIA en nuestro sistema durante este día (Márquez-López *et al.*, 2018).

Al día 0 se lleva a cabo la inducción de la ES, donde por medio de estrés mecánico se obtuvieron los explantes del segundo y tercer par de hojas, los cuales fueron expuestos a nuestro medio de inducción adicionado con 5 BA (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006a), el factor de estrés unido a los niveles de auxinas endógenas, los cuales de acuerdo con (Márquez-López *et al.*, 2018) muestran una mayor circulación de AIA, generan cambios de la cromatina ocasionando una reprogramación celular (Nic-Can *et al.*, 2013), la cual le permite a la célula desarrollar la competencia embriogénica (Nic-Can *et al.*, 2016), siendo las Aux un inductor en la reprogramación de las células somáticas a células embriogénicas (Méndez-Hernández *et al.*, 2019).

## CAPÍTULO IV

Durante este día también se presenta un aumento en la expresión de diversos genes en comparación con los diferentes puntos de pre-acondicionamiento e inducción, siendo estos: *PIN5*, *LAX1*, *ABCB1* y *ABCB19*. *PIN5* muestra mayor expresión durante este día (**Figura 3.14**), tomando en cuenta su localización intracelular en el retículo endoplasmático (RE) (Mravec *et al.*, 2009), cumple su tarea de regulador intracelular de los niveles de Aux (Mravec *et al.*, 2009) facilitando su transporte hasta el núcleo, donde promoverá la interacción entre *TIR1/AFB* y *AUX/IAA*, provocando la degradación por ubiquitinación de los *AUX/IAA* por medio del proteosoma 26S, ya que estas actúan como correpresores de los *ARF*, encargados de transcribir los genes de respuesta rápida a las auxinas (Weijers and Wagner, 2016)

*ABCB19* también muestra mayor expresión en este día (**Figura 3.14**), y es que este transportador cuenta con otra función muy poco conocida que puede atribuirse a los primeros días de inducción de ES, debido a que estabiliza los microdominios de la membrana plasmática, que en días 7, y 14 después de la inducción, facilitara la actividad de transporte de *PIN1* (Titapiwatanakun *et al.*, 2009)

El aumento en la expresión de *LAX1* (**Figura 3.14**) durante los días 0 (**figura 3.1 D0**) y 7 (**figura 3.1 D7**) es consistente con los resultados reportados previamente (Méndez-Hernández *et al.*, 2021) debido a que podrían facilitar la entrada de auxinas a las células para ser posteriormente conjugadas con aminoácidos, los cuales facilitarían su reserva en la vacuola.

14 días después de la inducción (**figura 3.1 D14**) se observó un aumento en la expresión de *PIN5* (**Figura 3.14**) resultados los cuales se asocian con lo reportado por (Márquez-López *et al.*, 2018) en el que se encontró que las células de la periferia del explante mostraron un aumento de AIA que era acumulado en el citoplasma y transportado al núcleo. Además, esta acumulación de AIA produjo la formación de grupos celulares en división, lo cual es consistente con (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006b) ya que los embriones somáticos cuentan con un origen multicelular, lo cual permite la fusión directa del embrión al explante.

Al día 21 después de la inducción (**Figura 3.1 D21**) se observa la generación de masa pre embriogénica, resultado consistente con lo reportado con (Márquez-López *et al.*, 2018), ya que durante esta etapa se lleva a cabo la formación de centros meristemáticos y embriones globulares, aunque estos últimos no son visibles al ojo humano.

*PIN1* presenta su mayor expresión este día (**Figura 3.14**), esto debido a que una de sus principales funciones en la ES es movilizar la mayor cantidad de Aux hacia las células de la periferia por medio del TPA (Márquez-López *et al.*, 2018). *LAX1* muestra cambios en su expresión los días posteriores a la inducción (**Figura 3.14**), ya que de acuerdo con (Robert *et al.*, 2015) este transportador se expresa en las células apicales durante las primeras divisiones y se restringe al pro-embrión hasta la división de 16 células, además de contribuir a la formación del meristemo apical (Robert *et al.*, 2015)

La importancia de los transportadores en la ES se puede ver reflejada en el conteo de embriones somáticos, ya que de acuerdo a nuestros resultados al día 56 (**Figura 3.2**) se obtuvo un total de 1850 embriones en diferentes estadios (**Figura 3.3**) estos resultados guardan relación con lo reportado con (Márquez-López *et al.*, 2018) ya que la inhibición de los transportadores por TIBA generó una drástica disminución en la producción de embriones somáticos donde obtuvo un total de 345 embriones somáticos con deformaciones visibles.

El análisis filogenético sugiere una cercana relación con otras especies, lo que puede esclarecer un poco sobre la función de estos en nuestro sistema. *CcPIN5* muestra una cercana relación con *AtPIN5* (**Figura 3.12**), el cual es indispensable para la homeostasis de auxinas, contribuyendo al control intracelular de estas (Titapiwatanakun *et al.*, 2009).

La familia de transportadores *ABCB* mostro resultados interesantes, ya que el gen *CcABCB1* muestra una cercana relación filogenética con *AtABCB1* (**Figura 3.11**), mientras que *CcABCB19* muestra una cercanía con el gen *OsABCB19* (**Figura 3.11**), el cual muestra una cercanía con *AtABCB19* (Xu *et al.*, 2014), lo cual es apoyado por nuestros resultados, sugiriendo que tanto *CcABCB19* y *OsABCB14* son altamente sensitivos al AIA.



## CAPÍTULO V

### 5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

#### 5.1 CONCLUSIONES

- El día de mayor actividad en la mayoría de los transportadores es el día 0, lo cual podría estar asociado a la transición que se lleva a cabo en este día de la inducción.
- El transportador *PIN1* muestra incremento en el número de transcritos en los días 14 y 21, lo cual podría estar relacionado con las primeras divisiones del embrión somático.
- El transportador *PIN5* muestra un incremento en el número de transcritos durante el día 0, lo cual podría estar relacionado con el transporte de auxinas al núcleo necesario para la reprogramación celular.
- El transportador *LAX1* muestra un incremento en el número de transcritos durante los días 7 y 14, lo cual podría asociarse con las primeras divisiones del embrión somático.
- Los análisis filogenéticos muestran una cercana relación entre *Coffea canephora* y *Arabidopsis thaliana*.

## 5.2 PERSPECTIVAS

- Analizar los efectos de la sobreexpresión de genes asociados a los transportadores de auxinas.
- Identificar cual es la molécula señal que producen las auxinas para la generación de los embriones somáticos.
- Llevar a cabo una inmunolocalización de transportadores de influjo (*LAX1*), eflujo (*ABCB19* y *ABCB1*) y transportadores intracelulares (*PIN5*) para visualizar su papel a lo largo del proceso de la ES.
- Estudiar los efectos de la inhibición en la distribución de la auxina y las diferentes localizaciones de transportadores de influjo y eflujo durante la ES.



---

**BIBLIOGRAFÍA**

Adamowski M y Friml J. 2015. PIN-dependent auxin transport: Action, regulation, and evolution. *The Plant Cell* 27, 20-32.

Anai T, Miyata M, Kosemura S, Yamamura S, Tsuge T, Matsui M, Uchida H y Hasegawa K. 1997. Comparison of *abp1* primary sequences from monocotyledonous and dicotyledonous species. *Journal of Plant Physiology* 151, 446-449.

Ayil-Gutiérrez BA, Galaz-Ávalos RM, Peña-Cabrera E y Loyola-Vargas VM. 2013. Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior* 8, e26998.

Bajguz A y Piotrowska A. 2009. Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* 70, 957-969.

Berthaud J. 1981. L'incompatibilité chez *Coffea canephora*: Méthode de test et déterminisme génétique. *Café Cacao Thé* 4, 267-274.

Campuzano-Duque LF, Herrera JC, Ged C y Blair MW. 2021. Bases for the establishment of Robusta coffee (*Coffea canephora*) as a new crop for Colombia. *Agronomy* 11, 2550.

Choi YE, Katsumi M y Sano H. 2001. Triiodobenzoic acid, an auxin polar transport inhibitor, suppresses somatic embryo formation and postembryonic shoot/root development in *Eleutherococcus senticosus*. *Plant Science* 160, 1183-1190.

Couoh-Cauich M-D, Méndez-Hernández HA, Galaz-Ávalos RM, Quintana-Escobar AO, Ibarra-Laclette E y Loyola-Vargas VM. 2025. Transcriptional dynamics underlying somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plants* 14, 1108.

da Costa DS, Albuquerque TG, Costa HS y Bragotto APA. 2023. Thermal contaminants in coffee induced by roasting: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 20, 5586.

DaMatta FM, Ronchi CP, Maestri M y Barros RS. 2007. Ecophysiology of coffee growth and production. *Braz. Journal of Plant Physiology* 19, 485-510.

Davis AP, Govaerts R, Bridson DM y Stoffelen P. 2006. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 152, 465-512.

Dobrev PI, Hoyerová K y Petrášek J. 2017. Analytical determination of auxins and cytokinins. In: Dandekar T, Naseem M, eds. *Auxins and Cytokinins in Plant Biology: Methods and Protocols*. New York: Springer, 31-39.

## CAPÍTULO V

Fehér A. 2015. Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1849, 385-402.

Friml J, Vieten A, Sauer M, Weijers D, Schwarz H, Hamann T, Offringa R y Jurgens G. 2003. Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature* 426, 147-153.

Fuentes-Cerda CFJ, Monforte-González M, Méndez-Zeel M, Rojas-Herrera R y Loyola-Vargas VM. 2001. Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by nitrogen source. *Biotechnology Letters* 23, 1341-1343.

Garcês HMP, Champagne CE, Townsley BT, Park S, Malho R, Pedroso MC, Harada JJ y Sinha NR. 2007. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoë*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 15578-15583.

Grieneisen VA, Xu J, Maree AFM, Hogeweg P y Scheres B. 2007. Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature* 449, 1008-1013.

Horstman A, Bemer M y Boutilier K. 2017. A transcriptional view on somatic embryogenesis. *Regeneration* 4, 201-216.

ICO. 2025. Trade Statistics. Available online at: [http://www.ico.org/trade\\_statistics.asp](http://www.ico.org/trade_statistics.asp) (Accessed January 2025). ICO.

Ikeuchi M, Sugimoto K y Iwase A. 2013. Plant callus: mechanisms of induction and repression. *The Plant Cell* 25, 3159-3173.

Karami O, Philipsen C, Rahimi A, Nurillah AR, Boutilier K y Offringa R. 2023. Endogenous auxin maintains embryonic cell identity and promotes somatic embryo development in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 113, 7-22.

Kasahara H. 2016. Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 80, 34-42.

Kleine-Vehn J, Dhonukshe P, Sauer M, Brewer P, Wisniewska J, Paciorek T, Benková E y Friml J. 2008. ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology* 18, 526-531.

Klíma P, Laňková M y Zažímalová E. 2016. Inhibitors of plant hormone transport. *Protoplasma* 253, 1391-1404.

Křeček P, Skůpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J y Zažímalová E. 2009. The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology* 10, 249.

Ljung K. 2013. Auxin metabolism and homeostasis during plant development. *Development* 140, 943-950.

---

Loyola-Vargas VM, Avilez-Montalvo JR, Avilez-Montalvo RN, Márquez-López RE, Galaz-Ávalos RM y Mellado-Mojica E. 2016. Somatic embryogenesis in *Coffea* spp. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications. Handel, Switzerland: Springer, 241-266.

Loyola-Vargas VM, De-la-Peña C, Galaz-Ávalos RM y Quiroz-Figueroa FR. 2008. Plant tissue culture. In: Walker JM, Rapley R, eds. Molecular Biotechnology Handbook. Totowa: Humana Press, 875-904.

Loyola-Vargas VM y Ochoa-Alejo N. 2016a. Somatic embryogenesis. An overview. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications. Switzerland: Springer, 1-10.

Loyola-Vargas VM y Ochoa-Alejo N. 2016b. Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications. Switzerland: Springer.

Ludwig-Müller J. 2011. Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* 62, 1757-1773.

Ma JJ y Han M. 2016. Genomewide analysis of ABCBs with a focus on ABCB1 and ABCB19 in *Malus domestica*. *Journal of Genetics* 95, 141-149.

Márquez-López RE, Pérez-Hernández CA, Kú-González Á, Galaz-Ávalos RM y Loyola-Vargas VM. 2018. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma* 255, 695-708.

Martins LD, Tomaz MA, Lidon FC, DaMatta FM y Ramalho JC. 2014. Combined effects of elevated [CO<sub>2</sub>] and high temperature on leaf mineral balance in *Coffea* spp. plants. *Climatic Change* 126, 365-379.

Méndez-Hernández HA. 2021. Role of *GH3* genes during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Mérida, Yucatán: CICY.

Méndez-Hernández HA, Ledezma-Rodríguez M, Avilez-Montalvo RN, Juárez-Gómez YL, Skeete A, Avilez-Montalvo J, De-la-Peña C y Loyola-Vargas VM. 2019. Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Frontiers in Plant Science* 10, 77.

Méndez-Hernández HA, Quintana-Escobar AO, Uc-Chuc MÁ y Loyola-Vargas VM. 2021. Genome-wide analysis, modeling, and identification of amino acid binding motifs suggest the involvement of *GH3* genes during somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. *Plants* 10, 2034.

Montagnon C, Cubry P y Leroy T. 2012. *Coffea canephora* Pierre genetic improvement: Acquired knowledge, strategies and perspectives. *Cahiers Agricultures* 21, 143-153.

Mravec J, Skupa P, Bailly A, Hoyerova K, Krecek P, Bielach A, Petrášek J, Zhang J, Gaykova V, Stierhof YD, Dobrev PI, Schwarzerova K, Rolcik J, Seifertova D, Luschnig C, Benková E, Zazimalová E, Geisler M y Friml J. 2009. Subcellular homeostasis of

## CAPÍTULO V

phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature* 459, 1136-1140.

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

Nic-Can GI, Avilez-Montalvo JR, Avilez-Montalvo RN, Márquez-López RE, Mellado-Mojica E, Galaz-Ávalos RM y Loyola-Vargas VM. 2016. The relationship between stress and somatic embryogenesis. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*. Switzerland: Springer, 151-170.

Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool FA, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R y De-la-Peña C. 2013. New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE* 8, e72160.

Nic-Can GI y Loyola-Vargas VM. 2016. The role of the auxins during somatic embryogenesis. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*. Handel, Switzerland: Springer, 171-181.

Nonhebel HM. 2015. Tryptophan-independent IAA synthesis: critical evaluation of the evidence. *Plant Physiology* 169, 1001-1005.

Paque S y Weijers D. 2016. Auxin: the plant molecule that influences almost anything. *BMC Biology* 14, 1-5.

Pasternak T y Dudits D. 2019. Epigenetic clues to better understanding of the asexual embryogenesis *in planta* and *in vitro*. *Front. Plant Science* 10, 778.

Péret B, Swarup K, Ferguson A, Seth M, Yang Y, Dhondt S, James N, Casimiro I, Perry P, Syed A, Yang H, Reemmer J, Venison E, Howells C, Perez-Amador MA, Yun J, Alonso J, Beemster GTS, Laplaze L, Murphy A, Bennett MJ, Nielsen E y Swarup R. 2012. AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *The Plant Cell* 24, 2874-2885.

Petrášek J y Friml J. 2009. Auxin transport routes in plant development. *Development* 136, 2675-2688.

Pila Quinga LA, Heringer AS, Pacheco de Freitas Fraga H, do Nascimento Vieira L, Silveira V, Steinmacher DA y Guerra MP. 2018. Insights into the conversion potential of *Theobroma cacao* L. somatic embryos using quantitative proteomic analysis. *Scientia Horticulturae* 229, 65-76.

Quintana-Escobar AO, Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, Loyola-Vargas VM y Góngora-Castillo E. 2019. Transcriptome analysis of the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora* and the participation of ARF and AUX/IAA genes. *PeerJ* 7, e7752.

---

Quiroz-Figueroa FR, Monforte-González M, Galaz-Ávalos RM y Loyola-Vargas VM. 2006a. Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In: Loyola-Vargas VM, Vázquez-Flota FA, eds. Plant Cell Culture Protocols. Totowa, NJ, USA: Humana Press, 111-117.

Quiroz-Figueroa FR, Rojas-Herrera R, Galaz-Ávalos RM y Loyola-Vargas VM. 2006b. Embryo production through somatic embryogenesis can be used to study cell differentiation in plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 86, 285-301.

Ramalho JC, Quartin VL, Leitão E, Campos PS, Carelli MLC, Fahl JI y Nunes MA. 2003. Cold acclimation ability and photosynthesis among species of the tropical *Coffea* genus. *Plant Biology* 5, 631-641.

Robert HS, Grunewald W, Sauer M, Cannoot B, Soriano M, Swarup R, Weijers D, Bennett M, Boutilier K y Friml J. 2015. Plant embryogenesis requires AUX/LAX-mediated auxin influx. *Development* 142, 702-711.

Salaün C, Lepiniec L y Dubreucq B. 2021. Genetic and molecular control of somatic embryogenesis. *Plants* 10, 1467.

Sauer M, Robert S y Kleine-Vehn J. 2013. Auxin: simply complicated. *Journal of Experimental Botany* 64, 2565-2577.

Schiavone FM y Cooke TJ. 1985. A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell culture. *Canadian Journal of Botany* 63, 1573-1578.

Simon-Gruita A, Pojoga MD, Constantin N y Duta-Cornescu G. 2019. Genetic engineering in coffee. In: Grumezescu AM, Holban AM, eds. Caffeinated and Cocoa Based Beverages: Woodhead Publishing, 447-488.

Skoog F y Armstrong DJ. 1970. Cytokinins. *Annual Review of Plant Physiology* 21, 359-384.

Song S, Wang Z, Ren Y y Sun H. 2020. Full-length transcriptome analysis of the ABCB, PIN/PIN-LIKES, and AUX/LAX families involved in somatic embryogenesis of *Lilium pumilum* DC. *Fisch. International Journal of Molecular Sciences* 21, 453.

Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD y Zhang XS. 2009. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 59, 448-460.

Swarup R y Péret B. 2012. AUX/LAX family of auxin influx carriers - an overview. *Frontiers in Plant Science* 3, 225.

Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, Sakai T, Friml J, Peer WA y Murphy AS. 2009. *ABCB19/PGP19* stabilises *PIN1* in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 57, 27-44.

## CAPÍTULO V

Uc-Chuc MÁ, Pérez-Hernández CA, Galaz-Ávalos RM, Brito-Argáez L, Aguilar-Hernández V y Loyola-Vargas VM. 2020. YUCCA-mediated biosynthesis of the auxin IAA is required during the somatic embryogenic induction process in *Coffea canephora*. International Journal of Molecular Sciences 21, 4751.

Vanneste S y Friml J. 2009. Auxin: a trigger for change in plant development. Cell 136, 1005-1016.

Vielba JM. 2019. Identification and initial characterization of a new subgroup in the GH3 gene family in woody plants. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology 28, 280-290.

Vondráková Z, Eliášová K, Fischerová L y Vágner M. 2011. The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. Central European Journal of Biology 6, 587-596.

Wang L, Bao X-M, Liu Y-H y Hao S. 1994. Origin of direct somatic embryos from cultured inflorescence axis segments of *Freesia refracta*. International Journal of Plant Sciences 155, 672-676.

Weijers D y Wagner D. 2016. Transcriptional responses to the auxin hormone. Annual Review of Plant Biology 67, 539-574.

Xu Y, Zhang S, Guo H, Wang S, Xu L, Li C, Qian Q, Chen F, Geisler M, Qi Y y Jiang DA. 2014. *OsABCB14* functions in auxin transport and iron homeostasis in rice (*Oryza sativa* L.). The Plant Journal 79, 106-117.

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

Yeung EC. 1995. Structural and development patterns in somatic embryogenesis. In: Thorpe TA, ed. *In vitro* embryogenesis in plants. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 205-247.

Yu C, Dong W, Zhan Y, Huang Za, Li Z, Kim IS y Zhang C. 2017. Genome-wide identification and expression analysis of CILAX, CIPIN and CIACB genes families in *Citrullus lanatus* under various abiotic stresses and grafting. BMC Genetics 18, 33.

Zhang S, Liu X, Wang X, Gao Y y Yang Q. 2021. Evaluation of coffee ecological adaptability using Fuzzy, AHP, and GIS in Yunnan Province, China. Arabian journal of Geosciences 14, 1366.

## ANEXOS

## ANEXO 1: CUADRO DE REACTIVOS PARA MEDIO DE CULTIVO YASUDA MODIFICADO.

Stock	Reactivo	mg/L	Gramos necesarios
A	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	.110	2.75
B	$\text{KNO}_3$	475	11.87
	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	412	10.30
C	$\text{KN}_2\text{PO}_4$	85	2.125
	$\text{H}_3\text{BO}_4$	3.100	.0775
	$\text{Na}_2 \text{MoO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$	.125	.00312
D	$\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	92.5	2.31
	$\text{MnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	6.83	.17
	$\text{CuSO}_4 - 5\text{H}_2\text{O}$	.05	.0012
	$\text{ZnSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	4.3	.1075
E	$\text{FeSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$	21	.525
	$\text{Na}_2 \text{EDTA} - 2\text{H}_2\text{O}$	27.9	.6975
F	Piridoxina	1	.025
	Ac. Nicotínico	1	.025
	Tiamina	10	.25

## CAPÍTULO V

	Myo-inositol	100	2.5
	6-BA	1.12	5

### ANEXO 2: MATERIALES Y EQUIPOS UTILIZADOS EN LAS DIFERENTES METODOLOGÍAS.

Reactivo	Marca	Identificador
Fosfato monopotásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Sigma-Aldrich	P-0662
Ácido bórico ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ )	Sigma-Aldrich	B6768
Molibdato de sodio di hidratado ( $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	Sigma-Aldrich	M1651
Nitrato de potasio ( $\text{KNO}_3$ )	Fermont	41842
Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ )	Sigma-Aldrich	A-9642
Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )	Sigma-Aldrich	A9434
Cloruro de potasio (KCl)	Jalmek	P4825
6-bencilaminopurina (BA, $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ )	SIGMA	B3408-1G
N6-benciladenina (BA, $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}_5$ )	Phyto Technology Laboratories	B800
Kinetina ( $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_5\text{O}$ )	SIGMA-ALDRICH	K0763-5G
Sal potásica del ácido 1- naftalenacético ( $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{KO}_2$ )	SIGMA	K0763-5G
Gellan Gum	PhytoTechnology Laboratories	G434
Cloruro de Calcio Dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	SIGMA-ALDRICH	C8106-500G

Tiamina	SIGMA	#BCCC3997
Piridoxina (C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	SIGMA	30H0244
<b>Químicos, péptidos y proteínas recombinantes</b>		
Murashige y Skoog (medio MS)	PhytoTech	M524
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	J. T. Baker	2500-01
Sulfato de manganeso heptahidratado (MnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	Sigma	
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	J. T. Baker	1843
Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich	Z-0501
Sacarosa grado II (C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> )	Sigma-Aldrich	S-5391
Cisteina (C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>2</sub> S)	Sigma-Aldrich	C121800
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	Sigma – Aldrich	F-7002
Sal disódica- Dihidratada (Na <sub>2</sub> EDTA – 2H <sub>2</sub> O)	J.T. Baker	8993-01 (CAS6381-92-6)
Myo-inositol (C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub> )	SIGMA	#SLCD9427
Ácido nicotínico (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> )	SIGMA	61H0366

## CAPÍTULO V

Metanol ACS(CH <sub>3</sub> OH)	Fermont	67-56-1
Acetato de etilo (C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> )	MERCK	506188N
Acetonitrilo H.P.L.C (CH <sub>3</sub> CN)	MEYER	75-05-8
Agua H.P.L.C (H <sub>2</sub> O)	J.T.Baker	4218-03
2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol, 99% (C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O)	Agros Organics	
Ácido fórmico (HCOOH)	Sigma - Aldrich	#STBH6997
Hidroxido de amonio (NH <sub>4</sub> OH)	BAKER ANALYZED	9721-03
Ácido acético H.P.L.C. (CH <sub>3</sub> COOH)	TEDIA (High Purity Solvents)	AS1102-002
<b>Modelo experimental: Organismo</b>		
<i>Coffea canephora</i>		
<b>Biología molecular</b>		
TRIZOL	Sigma	93289
Cloroformo	CTR	01876
Isopropanol	JT baker	9038
Etanol		
Resuspensor	Elution solutions A	Lot # 595013
Agarosa	Promega	Lot 0000031750
Kit síntesis de cDNA	Thermo Scientific	K2562
Primers	T4OLIGO	R4855 – R4870
Taq polimerasa	Thermo Scientific	00795671

Gel red	Sigma	41003
Buffer 10x	Thermo Scientific	00775703
MgCl <sub>2</sub>	Thermo Scientific	00783322
Dntps	Thermo Scientific	R0192
<b>Equipos</b>		
Potenciómetro	Hanna Instruments	pH 210
HPLC	Thermo Scientific	Ultimate 3000
Ultracongelador	Thermo Scientific	8922
Centrifuga	Thermo Scientific	Sorvall ST16R
Liofilizadora	Labconco	FreeZone 4.5
Speedvac	Labconco	CentriVap micro IR
Balanza	AND	HR-60
Termociclador	Techne	5 Prime
Parrilla de agitación y calentamiento	Corning	PC-620D
Agitador Vortex	Scientific Industries	Vortez Genie 2
Estereoscopio	Nikon	SMZ 745T
Nanodrop		
Baño maría	Lab line instruments	N°2090/115 volts
Termociclador		
Ultra pure water system	Barnstead	Easypure II
<b>Materiales</b>		

## CAPÍTULO V

Unidad de filtro accionada por jeringa H.P.L.C.	MILLEX-GN	SLGNX13NK
--	-----------	-----------

