



Ciencia y Tecnología

Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

ESTUDIO DEL EFECTO DE LA RELACIÓN DE LA
FUENTE NITROGENADA EN LA CONCENTRACIÓN
DE CITOCININAS DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS
SOMÁTICA

Tesis que presenta

MONSERRAT HERNANDEZ SOLIS

En opción al título de

MAESTRA EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción 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 Monserrat Hernandez Solis titulado **Estudio del efecto de la relación de la fuente nitrogenada en la concentración de citocininas durante la embriogénesis somática**, fue realizado en la Unidad de Biología Integrativa, dentro de la línea 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



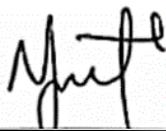
Dr. José Luis Hernández-Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 13 de agosto 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: _____



Monserrat Hernandez Solis

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biología Integrativa del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado: Descifrando el papel del AMPc como segundo mensajero en la embriogénesis somática: un paso hacia su control, CBF-2025-I-758, bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por abrirme las puertas para realizar mi posgrado y a la SECIHTI por la beca otorgada, sin la cual esto no habría sido posible.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por todas las enseñanzas y consejos, por abrirme las puertas de su laboratorio y ser un profesor dedicado que siempre apoya a los estudiantes.

A mi comité tutorial y de revisión de tesis, por sus valiosos aportes a esta investigación.

Al equipo del laboratorio 24, que acompañó todo este proceso y me apoyaron en lo que pudieron, haciendo mucho más llevadero el estrés compartiendo momentos de alegría.

A mis amigas del posgrado: Marina, que compartió este camino conmigo, escucho mis preocupaciones y ofreció su ayuda todas las veces; Brigitte, que no dejó que olvidara el objetivo final de todo este proceso ni que no recorriera este camino sola. Ambas son mujeres extraordinarias que se ganaron un lugar en mi corazón de por vida, sin su apoyo y presencia mi maestría no habría sido tan grata.

A mi amiga, compañera y maestra Laura Chanel, quien no solo compartió todo el trabajo y preocupaciones, sino las alegrías y los aprendizajes. Siempre agradeceré su apoyo en cada parte del proceso, desde los enredos de los diseños experimentales hasta las discusiones exaltadas de los resultados. Sin su guía y calma habría sido mil veces más difícil llegar hasta aquí, espero poder crecer para ser una gran profesional como ella.

A mi familia, que a pesar de estar lejos se las arreglaron para consolarme y aconsejarme en todo momento. Todo este trabajo es gracias a ellos.

A Dios.

DEDICATORIAS

A mis padres, Josefina y Ezequiel, por ser el motivo y motor de todo lo que he hecho y haré. Su amor ha nutrido mis sueños y su esfuerzo me ha traído hasta aquí, nada de esta aventura habría sido posible sin ustedes. Espero poder crecer más y hacerlos sentir orgullosos, aun arropada con el cuidado de mi madre y sostenida por la atención de mi padre.

A mi hermana Paloma, desde el día que me dijeron que debía ser un buen ejemplo para ella he querido ser mejor de lo que soy y esforzarme por ayudarla a cumplir todas sus metas. Ojalá pueda aprender un poquito de ella y llevar lo que he aprendido ahora a quienes importan.

A mis amigas, que son todas mujeres ejemplares y talentosas, que me sirven de ejemplo y motivación en muchos ámbitos. Estefanía, María Esther, Isela, Metzli, Araceli, Abigail, Marina, Laura Chanel y Brigitte Valeria, hablar con ustedes de la vida hace que esta tenga un poquito más de sentido. Nunca dejen de brillar como lo hacen ahora.

Índice

ÍNDICE	I
LISTADO DE FIGURAS	V
LISTA DE CUADROS.....	VII
INTRODUCCIÓN.....	3
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	3
1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>DAUCUS CAROTA</i>	6
1.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	8
1.4. NITRÓGENO	11
1.5. CITOCININAS.....	15
1.6. SÍNTESIS DE CITOCININAS	17
1.7. NITRÓGENO Y LA SÍNTESIS DE CITOCININAS.....	19
1.8. JUSTIFICACIÓN.....	21
1.9. OBJETIVO GENERAL.....	21
1.10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
1.11. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	22
1.12. HIPÓTESIS.....	22
1.13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	22

CAPÍTULO II.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1. INTRODUCCIÓN.....	25
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	25
2.2.1.1. <i>COFFEA CANEPHORA</i>	25
2.2.1.1.1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>COFFEA CANEPHORA</i> ...	26
2.2.1.1.2. <i>DAUCUS CAROTA</i>	27
2.2.1.1.2.1 INDUCCIÓN DE CALLO A PARTIR DE SEGMENTOS DE RAÍZ.....	27
2.2.1.1.2.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES.....	27
2.2.1.1.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES	28
2.2.1.1.2.3.2. NÚMERO DE CÉLULAS	28
2.2.1.1.2.3.3. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO	28
2.2.1.1.2.4. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>DAUCUS CAROTA</i>	29
2.2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS.....	30
2.2.2.1. EXTRACCIÓN DE LAS AUXINAS Y CITOCININAS	30
2.2.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO MEDIANTE HPLC.....	31
2.2.2.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN	31
2.2.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AUXINAS Y CITOCININAS	32
2.2.8.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO MEDIANTE HPLC.....	32

2.2.8.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN	33
2.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
CAPÍTULO III.....	35
RESULTADOS.....	35
3.1. INTRODUCCIÓN.....	35
3.2. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ EN <i>C. CANEPHORA</i>	35
3.2.1 INDUCCIÓN DE LA ES EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ A PARTIR DE PLANTAS DE 6 MESES DE EDAD.	35
3.2.2 INDUCCIÓN DE LA ES EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ A PARTIR DE PLANTAS DE 1 AÑO	37
3.2.3. CONTENIDO DE CITOCININAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	39
3.2.4. CONTENIDO DE AUXINAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	41
3.3. <i>DAUCUS CAROTA</i>	43
3.3.1. INDUCCIÓN DE CALLOS Y ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES	43
3.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE RAÍZ	44
3.3.3. INDUCCIÓN DE LA ES CON DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	46
CAPÍTULO IV.....	51
DISCUSIÓN	51

4.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ EN <i>C. CANEPHORA</i>	51
4.1.2 CONTENIDO DE CITOCININAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	52
4.1.3 CONTENIDO DE AUXINAS Y SUS CONJUGADOS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺	53
4.2 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO ₃ ⁻ /NH ₄ ⁺ EN <i>D. CAROTA</i>	55
CAPÍTULO VI	57
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	57
5.1 CONCLUSIONES	57
5.2 PERSPECTIVAS	57
BIBLIOGRAFÍA	59

Listado de figuras

Figura 1.1. Embriogénesis somática, principales rutas y factores que la afectan. Adaptado de Gulzar et al. (2020).....	5
Figura 1.2. Orígenes celulares de la embriogénesis somática (Quiroz-Figueroa <i>et al.</i> , 2006).	6
Figura 1.3. Aspectos morfológicos y fisiológicos de la embriogénesis somática de la zanahoria. TD = tiempo de duplicación. Figura tomada de Fujimura (2014).	7
Figura 1.4. Modelo hipotético del metabolismo del N y su relación con la ES.....	14
Figura 1.5. Citocininas clasificadas de acuerdo con su cadena lateral.	16
Figura 1.6. Modelo de síntesis de citocininas isoprenoides.	18
Figura 1.7. Modelo de síntesis de citocininas y el efecto del nitrato en diferentes enzimas	19
Figura 1.8. Diagrama general de la estrategia experimental.....	23
Figura 3.1. Embriogénesis somática en explantes derivados de plantas de 6 meses de edad de <i>C. canephora</i> cultivados con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	36
Figura 3.2. Conteo de embriones somáticos por matraz en explantes derivados de plantas de 6 meses de edad de <i>C. canephora</i> cultivados con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	37
Figura 3.3. Inducción de ES en explantes derivados de plantas de 1 año de edad de <i>C. canephora</i> cultivados con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	38
Figura 3.4. Conteo de embriones somáticos en en explantes derivados de plantas de 1 año de edad de <i>C. canephora</i> cultivados con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	39
Figura 3.5. Cuantificación de citocininas en explantes de <i>C. canephora</i> durante la ES con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	40

Figura 3.6. Cuantificación de AIA y 3 de sus conjugados en explantes de <i>C. canephora</i> durante la ES con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	42
Figura 3.7. Inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares de <i>D. carota</i>	44
Figura 3.8. Caracterización del ciclo de cultivo de la suspensión celular de <i>D. carota</i> durante 21 días	45
Figura 3.9. Embriogénesis somática en diferentes relaciones de nitrógeno en <i>D. carota</i>	47
Figura 3.10. Embriones somáticos en diferentes relaciones de nitrógeno en <i>D. carota</i> al día 11.	48
Figura 3.11. Embriones somáticos en diferentes relaciones de nitrógeno en <i>D. carota</i> al día 32.	49

Lista de cuadros

Cuadro 2.1. Tratamientos empleados con las diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. La relación 2:1 es el testigo.....	26
Cuadro 2.2. Tratamientos empleados con las diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. La relación 2:1 es el testigo.....	30
Cuadro 3.2. Caracterización de suspensiones celulares en <i>D. carota</i>	46

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
ES	Embriogénesis somática
CK	Citocininas
N	Nitrógeno
RCV	Reguladores del crecimiento vegetal

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) es una técnica biotecnológica útil para la propagación masiva de plantas con características elite y/o con modificaciones genéticas. A pesar de que la ES es ampliamente utilizada en la propagación de especies de interés comercial, el o los mecanismos por los que una célula somática se convierte en una célula germinativa no se conocen del todo y gran parte de los procesos moleculares que desencadenan la inducción del proceso embriogénico no se comprenden. Actualmente se sabe que el nitrógeno es un componente de los medios de cultivo vegetales que es capaz de modificar la respuesta morfogénica de las células vegetales. El nitrógeno modifica la biosíntesis de las citocininas; a su vez, estos reguladores del crecimiento modifican la homeostasis de las auxinas, lo que seguramente provoca un cambio en la respuesta morfogénica de las células vegetales. En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se ha observado que la relación entre nitrógeno oxidado y nitrógeno reducido afecta de manera importante el proceso embriogénico. Por ello, en este estudio nos propusimos determinar si los cambios en la relación de la fuente de nitrógeno modifican el contenido de citocininas endógenas durante el proceso de ES y con ello la respuesta embriogénica.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis (SE) is a biotechnological method used to mass-produce plants with elite traits and/or genetic modifications. Although SE is commonly applied to propagate species of commercial interest, the mechanisms by which a somatic cell transforms into a germ cell are not fully understood, and much of the molecular processes initiating embryogenesis remain unclear. It is now known that nitrogen in plant growth media can influence the morphogenic response of plant cells. Nitrogen affects the biosynthesis of cytokinins, which in turn regulate auxin homeostasis, likely leading to changes in the morphogenic behavior of plant cells. Previous research in our laboratory has demonstrated that the ratio of oxidized to reduced nitrogen significantly impacts embryogenic development. Therefore, this study aims to explore whether variations in the nitrogen source ratio alter the endogenous cytokinin levels during the embryogenic process and, consequently, the embryogenic response.

INTRODUCCIÓN

La ES es el proceso por el cual células somáticas llevan a cabo una reprogramación de su desarrollo que les permite formar embriones sin la participación de los gametos. Este proceso depende de un gran número de factores físicos, químicos y genéticos que aún no son comprendidos por completo y necesitan estudiarse a fondo para comprender las diferentes interacciones que dan lugar a la adquisición del potencial embriogénico por parte de las células somáticas. Entre los principales factores se tienen los reguladores del crecimiento vegetal (RCV) como las citocininas (CK) (Méndez-Hernández *et al.*, 2019). Las CK son moléculas involucradas en procesos fisiológicos como la división y proliferación celular, que a su vez están vinculadas con la fuente de nitrógeno del medio de cultivo. Hay una estrecha relación entre la fuente de nitrógeno y las CK, ya que el nitrato presente en el medio de cultivo modifica la biosíntesis de la *trans*-zeatina, la cual a su vez modifica la homeostasis de las auxinas (Márquez-López *et al.*, 2019). Además, el nitrógeno es uno de los macronutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas; por ello, las plantas han desarrollado una compleja red de regulación para adaptar estos fenómenos a la disponibilidad del nitrógeno en el suelo, lo que ha desembocado en que las rutas de biosíntesis de varios RCV estén profundamente ligadas al nitrógeno (Duarte-Aké *et al.*, 2022).

En este trabajo, el propósito principal fue estudiar el efecto de la fuente nitrogenada, específicamente la relación nitrato-amonio, en la inducción de la embriogénesis somática y elucidar si el contenido endógeno de CK está vinculado al efecto de la relación de la fuente nitrogenada.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La totipotencia es una de las características más importantes y única de las plantas. Esta propiedad permite a cada célula vegetal regenerar todos los tipos celulares necesarios para formar una planta completa mediante una extensiva reprogramación celular. Un ejemplo claro de este potencial es la ES, un proceso que es prácticamente el mismo morfológicamente hablando al proceso de embriogénesis cigótica, ya que pasa por los mismos estadios y es controlada por mecanismos moleculares y bioquímicos similares, pero que no tiene un origen sexual, ya que en lugar de ser gametos las células que le dan origen, en la ES son células somáticas las que inician el proceso. Para que este proceso tenga lugar, las células somáticas deben sufrir una extensa reprogramación, principalmente mediada por una serie de cambios en la expresión génica y otras cascadas de señalización (Elhiti and Stasolla, 2022; Loyola-Vargas and Ochoa-Alejo, 2016).

Este fenómeno sucede tanto *ex vitro* como *in vitro*; un modelo característico para observarlo *ex vitro* es el género *Kalanchoe*, en el que algunas especies están formando embriones somáticos constantemente en los bordes de sus hojas mientras que otras especies del mismo género requieren estímulos o condiciones específicas para ello, siendo casi siempre señales de estrés para la planta las que desencadenan la respuesta embriogénica (Garcês *et al.*, 2007).

Por otro lado, en el cultivo *in vitro* este proceso biológico es una herramienta de gran utilidad en varios aspectos, principalmente para estudios sobre la totipotencia, ya que al ser una de las principales demostraciones de esta capacidad, estudiar este proceso arroja nuevo conocimiento sobre las vías de señalización y factores moleculares involucrados, siendo algunos de ellos esenciales para la regeneración. Otro aspecto primordial es el proceso de embriogénesis en general, ya que, al compartir gran parte de la fisiología de los embriones cigóticos, pero sin estar

protegidos por tejido materno ni tener limitantes en cuanto a cantidad, los embriones somáticos han permitido el análisis y comprensión de varias partes del proceso con mayor detalle. También es necesario resaltar su importancia en protocolos de modificación genética y multiplicación de plantas de interés comercial, porque al tener un origen somático y frecuentemente unicelular, las plantas regeneradas por esta vía son genéticamente idénticas al explante inicial (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006b; Wójcik *et al.*, 2020)

De manera general, la ES consta de dos fases: inducción y desarrollo. En la primera, el tejido somático sufre una desdiferenciación y/o rediferenciación de las células, dependiendo si el proceso es ES indirecta (en la que el explante pasa por una fase de células desdiferenciadas o callo) o ES directa (sin fase de callo), en la cual las células somáticas adquieren potencial embriogénico y se forman masas proembrionarias o cúmulos de células que darán origen a los embriones somáticos. En la segunda fase, la de desarrollo, el tejido embriogénico o masas proembrionarias completan el desarrollo y formación de los embriones somáticos, que siguen una vía de desarrollo similar a la de los embriones cigóticos, ya que también pasan por los estadios de embrión globular, corazón, torpedo y cotiledonar (en eudicotiledóneas), con la diferencia siendo el destino final, ya que los embriones cigóticos se dirigen a un proceso bioquímico que los prepara para la dormancia previa a la germinación, mientras que los embriones somáticos comienzan directamente el desarrollo del meristemo apical y el crecimiento o germinación una vez completado su desarrollo o ES secundaria, en donde se generan más embriones somáticos a partir de los primeros embriones somáticos (Asghar *et al.*, 2023; Fehér *et al.*, 2016; Méndez-Hernández *et al.*, 2019).

El análisis molecular del proceso de ES ha permitido la identificación de varios genes claves en el proceso, varios de los cuales también se han llegado a encontrar en el proceso de embriogénesis cigótica. Algunos de los más frecuentemente mencionados y determinantes son (Fig. 1.1): *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE* (Sertel *et al.*), un receptor de membrana que está involucrado

en la adquisición de competencia embriogénica, ya que es parte de la cascada de señalización que origina el remodelamiento de la cromatina necesario para el cambio en la expresión génica, lo que se le ha catalogado como un marcador importante de la ES en varias especies (Zhang *et al.*, 2016); *LEAFY COTYLEDON (LEC)*, gen que codifica a proteínas necesarias para la maduración de los embriones, por lo que está presente también en la embriogénesis cigótica (Horstman *et al.*, 2017); *BABYBOOM (BBM)*, un factor de transcripción que está involucrado en el mantenimiento de la identidad meristemática, la proliferación y el crecimiento celular. Este factor de transcripción favorece la morfogénesis y está vinculado a otros genes considerados embriogénicos, así como a rutas de biosíntesis de auxinas (Boutilier *et al.*, 2002); *LATE EMBRYO ABUNDANT (LEA)*, codifica a proteínas necesarias para la maduración de embriones tanto cigóticos como somáticos, y también están relacionadas con la respuesta a estrés (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010). Estos y otros genes son considerados marcadores moleculares en el proceso de ES debido a que están involucrados en el proceso y a su rol significativo en la adquisición de potencial embriogénico.

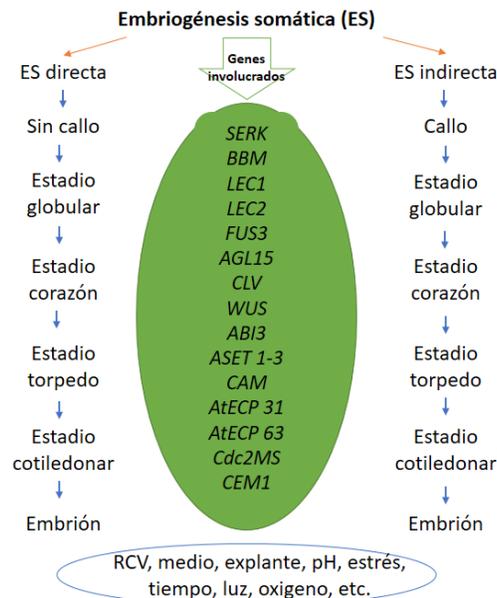


Figura 1.1. Embriogénesis somática, principales rutas y factores que la afectan.

Adaptado de Gulzar *et al.* (2020).

Si bien la ES parece compartir características morfológicas y anatómicas con la embriogénesis cigótica, en la ES se han encontrado variaciones en el proceso que aún no tienen una explicación clara, debido a que el modelo de estudio parece ser único, no solo en cuanto especies sino en cuanto a genotipos (Gulzar *et al.*, 2020). Algunos de los cambios que se pueden observar son el origen de los embriones, que puede ser unicelular o multicelular (de acuerdo al número de células que inician la formación del embrión), así como la sección del tejido en el que se originan, que puede ser epidérmico o subepidérmico (Fig. 1.2). Aunque no hay una única forma en la que los embriones somáticos se originan ni una regla clara que explique en qué casos ocurre una u otra, se han observado relaciones tales como un origen unicelular en donde los embriones se forman a partir de células epidérmicas superficiales y un origen multicelular en donde los embriones se forman a partir de células subepidérmicas (Yang and Zhang, 2010).

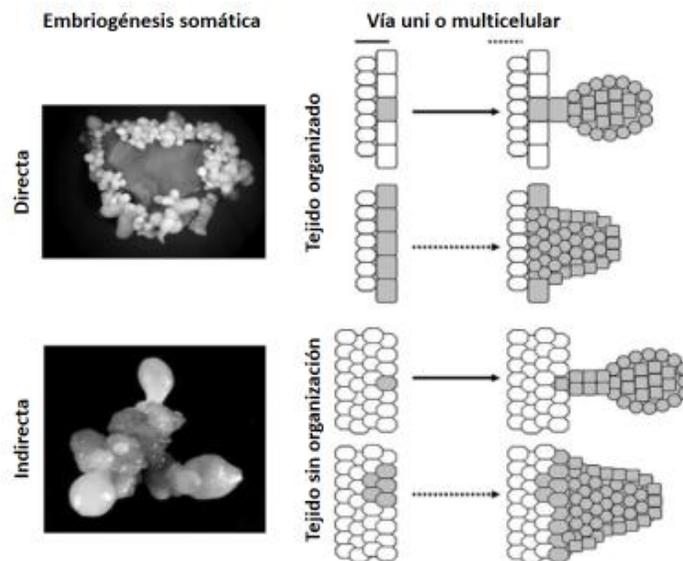


Figura 1.2. Orígenes celulares de la embriogénesis somática (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006).

1.2. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Daucus carota*

Uno de los modelos clásicos del cultivo de tejidos vegetales, en particular de la ES, ha sido *D. carota*, el protagonista de dos de los tres primeros reportes de la inducción de callos (Gautheret, 1939; Nobécourt, 1938), así como el caso de la ES (Reinert, 1959; Steward *et al.*, 1958). Desde entonces, *D. carota* ha sido un modelo de estudio para la ES (Fig. 1.3), los diversos factores que la afectan como los medioambientales (Ammirato and Steward, 1971) y las diferentes formas en las que la ES puede suceder, ya sea a partir de diferentes explantes (Kameya and Uchimiya, 1972; Nag and Street, 1973), en ausencia de gravedad (Krikorian and Steward, 1978) y con modificaciones específicas para aumentar la respuesta embriogénica (Hari, 1980).

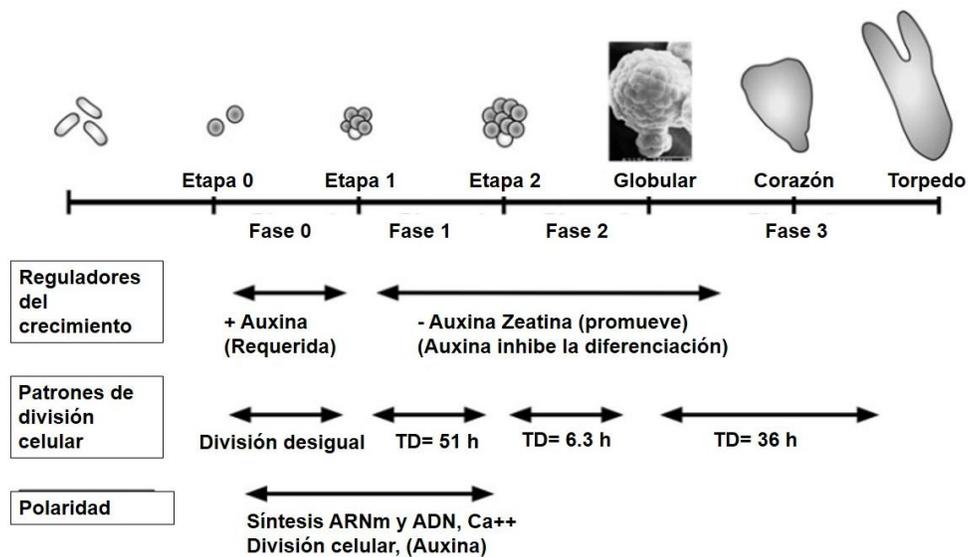


Figura 1.3. Aspectos morfológicos y fisiológicos de la embriogénesis somática de la zanahoria. TD = tiempo de duplicación. Figura tomada de Fujimura (2014).

Las principales ventajas de este modelo residen en la rapidez con la que crecen las suspensiones celulares a partir de la cual se induce la ES, ya que alcanzan la fase estacionaria en 14 días; la inducción de la ES es simple, solo requiere la disminución del número de células y eliminar el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) con el que se mantiene la suspensión celular (Fujimura, 2014; Fujimura and Komamine, 1975).

Además, la eficiencia del modelo es alta, formando hasta millones de embriones somáticos por litro de medio de cultivo y se puede manipular fácilmente la composición del medio de cultivo, así como sincronizar mediante el tamizado (Fujimura and Komamine, 1979).

Todas estas facilidades han permitido que la ES en *D. carota* pudiera ser estudiada con gran detalle, desde servir para las primeras descripciones de los estadios por los que pasa el desarrollo de los embriones somáticos (Fujimura and Komamine, 1980) hasta ser utilizado para el análisis de los aspectos moleculares del proceso (Raghavan, 2006), al grado de contar con el estudio de la ES de mutantes como la reportada por Giuliano *et al.*, (1984) variante, *ts11c*, que es sensible a la temperatura ya que no puede regenerarse a 31-33 °C (temperatura no permisiva), pero sí forma embriones a 24 °C (temperatura permisiva).

Otro de los descubrimientos importantes de la ES en *D. carota* está vinculado al efecto del nitrógeno durante la inducción de ES, que marcó el inicio del estudio del efecto de la fuente de nitrógeno en este proceso (Dougall and Verma, 1978; Halperin and Wetherell, 1965; Reinert *et al.*, 1967). En el primer estudio a cargo del grupo de Dougall (Wetherell and Dougall, 1976), se modificó la fuente inicial de nitrógeno (40 mM de nitrato de potasio y 10 mM de cloruro de amonio) añadiendo diferentes compuestos nitrogenados al medio de cultivo. Así, fue que se determinó que concentraciones tan pequeñas como 0.1 μ M de cloruro de amonio añadido a un medio que contiene solo nitrato permite la formación de embriones somáticos y 10 mM de cloruro de amonio es casi óptimo cuando el nitrato se encuentra en el rango de concentración de 12 a 40 mM. Las conclusiones más importantes de ese trabajo sugieren que se requiere una fuente de nitrógeno reducida como suplemento del nitrato para un crecimiento rápido del cultivo y la inducción de ES en cultivos de zanahoria y que el pH final del medio es influido de manera considerable por la relación nitrato-amonio suministrada al medio de cultivo.

1.3. FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Si bien la ES se reportó por primera vez a final de los años 50's, aun no se han elucidado todos los mecanismos involucrados en el proceso, incluso a pesar de haber sido abordado desde varios puntos de vista como el molecular, el químico y el fisiológico. Si bien se cuenta ya con descripciones anatómicas y morfológicas detalladas, no hay descripciones moleculares ni bioquímicas completas del respecto. Esto se debe a que la reprogramación celular requerida es altamente compleja, involucra una gran cantidad de genes y otras moléculas, casi todos ellos relacionados entre sí en complejas cascadas de señalización, eso sin tomar en cuenta que la ES puede desencadenarse de varias formas, lo que involucra señales diversas.

Otro obstáculo importante es que el proceso es esencialmente diferente para cada genotipo, dificultando el trasladar los aprendizajes del estudio de modelos clásicos como *D. carota* a otros organismos (Yang and Zhang, 2010). Este proceso depende de una gran cantidad y variedad de factores físicos (temperatura, humedad, condiciones de luz), químicos (pH, RCV, metales pesados) y genéticos. Si bien en la mayoría de los estudios sobre ES resalta el efecto de los RCV; los RCV desencadenan una serie de señales moleculares que regulan la transcripción de genes específicos que liberan el programa genético de las células y median la transición entre las fases de desarrollo embrionarias (Fehér, 2015; Kikuchi *et al.*, 2006; Nomura and Komamine, 1995). Si bien todos los RCV se encuentran en mayor o menor medida involucrados en todo el proceso de reprogramación genética y desarrollo de la ES, hay dos de ellos que resaltan de manera especial: las auxinas y las CK (Asghar *et al.*, 2023). Estos dos tipos de reguladores están involucrados en un gran número de eventos fisiológicos de las plantas, pero sus actividades principales están vinculadas al crecimiento y la proliferación celular, particularmente cuando están juntos, siendo un ejemplo de esto su uso en el cultivo de tejidos (Lee *et al.*, 2024).

Por otro lado, si bien los RCV pueden considerarse como factores clave que determinan el proceso de ES, muchas veces las señales de crecimiento y desarrollo

tienen un origen más primario, como lo pueden ser los nutrientes que componen el medio de cultivo, tan es así que se ha encontrado que los nutrientes minerales pueden afectar la sensibilidad de las células a los RCV (Ramage and Williams, 2002). Entre estos nutrientes, el nitrógeno es uno de los que influyen en la inducción de la ES, pues modifican la homeostasis de los RCV como las auxinas y las CK (Duarte-Aké *et al.*, 2022). Otro nutriente que ha demostrado tener un efecto en la ES es la fuente de carbono, con un papel importante en la histodiferenciación de los embriones somáticos y la regulación de la expresión génica, además de que la fuente de carbono frecuentemente afecta también el potencial osmótico del medio (Yaseen *et al.*, 2013).

Las condiciones del explante también son determinantes para la respuesta embriogénica, generalmente explantes de tejidos jóvenes responden mejor a la reprogramación extensiva necesaria para inducir la ES. El contenido endógeno de RCV del explante también debe ser un factor a considerar, ya que la inducción de la ES tiene como primer objetivo el terminar el programa de expresión genética del explante y reemplazarlo por un programa de expresión embriogénico (Von Arnold *et al.*, 2002; Yang and Zhang, 2010).

En la mayoría de los protocolos, infligir una herida al explante y el estrés que induce es otro factor importante para desencadenar la respuesta embriogénica, ya que al estar las células de un tejido tan habituadas a la comunicación intercelular para mantener sus respectivas condiciones fisiológicas, la interrupción de estas señales entre células genera un estrés, que de agravarse con otras condiciones estresantes, como en el caso del cultivo *in vitro*, promueve una reprogramación genética como medida adaptativa de supervivencia (Nic-Can *et al.*, 2016). Además, se ha encontrado que las heridas provocan la producción de una serie de respuestas que favorecen la formación de embriones somáticos, como las especies reactivas de oxígeno y la expresión de genes codificantes de factores de remodelación de la pared celular, lo que está ligado a la adquisición de un destino celular (Elhiti and Stasolla, 2022).

En resumen, se podría considerar al proceso de ES como una respuesta ante el estrés, una medida extrema para lidiar con el problema asegurando la sobrevivencia de la especie mediante la formación de plantas completas, que a pesar de ser estudiada desde hace tiempo es posiblemente el tipo de regeneración vegetal menos comprendido (Fehér, 2015).

1.4. NITRÓGENO

Como uno de los componentes principales de biomoléculas como los ácidos nucleicos, los aminoácidos y la clorofila, el nitrógeno (N) es uno de los macronutrientes más importantes para las plantas. Las plantas absorben el nitrógeno del suelo en formas inorgánicas, como el nitrato (NO_3^-) y el amonio (NH_4^+), o en formas orgánicas, como aminoácidos y péptidos, aunque el NO_3^- suele ser la forma de N preferida por las plantas superiores (O'Brien *et al.*, 2016).

La toma de NO_3^- , su transporte y almacenamiento esta mediada por transportadores de la familia *NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER FAMILY (NPF)*, *NITRATE TRANSPORTER 2 (NRT2)*, *CHLORIDE CHANNEL FAMILY (CLC)* y *SLOW ANION ASSOCIATED CHANNEL HOMOLOG (SLAC/SLAH)*. Una vez dentro de la célula, el NO_3^- se almacena en la vacuola para evitar efectos adversos en caso de estar presente en exceso. El primer paso en la asimilación del NO_3^- es la reducción del NO_3^- a NO_2^- por la acción de la nitrato reductasa (NR), a lo que sigue el transporte del NO_2^- al cloroplasto para ser reducido a NH_4^+ por la ferredoxin-nitrito reductasa (NiR). Una vez generado el NH_4^+ , éste se asimila por medio de la actividad de las enzimas glutamina sintetasa y la glutamato sintasa, con lo que el N se integra de manera orgánica en la célula en forma de aminoácidos (Duarte-Aké *et al.*, 2022).

Desde el inicio del cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se ha estudiado a detalle el efecto de cada nutriente mineral en el crecimiento y desarrollo de las plantas, en el caso del N se ha determinado que es un elemento necesario para la diferenciación de las células vegetales y el desarrollo de los embriones somáticos (Reinert *et al.*,

1967), incluso se ha llegado a considerar al NO_3^- , la fuente de N inorgánica más utilizada, tan influyente como un RCV en sí mismo al actuar como molécula señal (Krouk, 2016; Trewavas, 1983).

La naturaleza de la fuente de N más conveniente para la planta dependerá del pH, ya que por un lado el NH_4^+ está involucrado de manera más directa en las rutas metabólicas comparado con el NO_3^- , que requiere ser convertido en NH_4^+ antes de integrarse a las principales rutas metabólicas, pero justamente es esta rapidez en la absorción del NH_4^+ lo que lo vuelve inconveniente como única fuente de N en el cultivo *in vitro*, ya que debido a que la toma de NH_4^+ por parte de la célula provoca una salida de protones al medio que contribuye a la acidificación del mismo, afectando el crecimiento y desarrollo (Pasternak and Steinmacher, 2024; Raven, 1986). Para la eficaz absorción del N, un pH ácido es preferible, lo que depende de la presencia de ambos iones (NO_3^- y NH_4^+) en el medio, ya que tras la rápida absorción del NH_4^+ y la consecuente acidificación del medio, se estimula la absorción del NO_3^- , lo que contribuye al incremento del pH, regresando a un nivel adecuado para el cultivo (Duarte-Aké *et al.*, 2022).

De manera más detallada, se ha determinado que la naturaleza de la fuente de nitrógeno, su contenido total, disponibilidad y la relación de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ tiene un efecto importante en varios sistemas *in vitro*, incluyendo la ES (Fuentes-Cerda *et al.*, 2001; Méndez-Hernández *et al.*, 2019). Para la mayoría de los cultivos, a pesar de la variación entre las diferentes combinaciones y tipos de fuente nitrogenada, la cantidad total de N óptima ronda los 15 mM (Pasternak and Steinmacher, 2024). La fórmula que ha resultado ser más efectiva durante la ES en varias especies suele ser una mezcla de NO_3^- y NH_4^+ , o una combinación de alguna fuente de N inorgánico y N orgánico (aminoácidos); esto, debido a una serie de factores que van desde el vínculo del N con los RCV hasta el efecto del N en el pH del medio.

Aunque existen estudios en los que el correcto crecimiento celular se ha dado ante la presencia solo de NO_3^- (Neumann *et al.*, 2009; Neumann and Pauler, 1969; Ramage and Williams, 2002) o solo de NH_4^+ (Gamborg and Shyluk, 1970; Halperin

and Wetherell, 1965), también existen evidencias en las que, si bien el NO_3^- es suficiente para permitir el crecimiento y división de las células vegetales en cultivo de tejidos, no permite el desarrollo de tejidos embriogénicos, problema que se soluciona al añadir NH_4^+ al medio de cultivo (Cunha and Fernandes-Ferreira, 1999; Tazawa and Reinert, 1969). Por otro lado, el NH_4^+ parece promover la formación de embriones somáticos, pero los cultivos con NH_4^+ como única fuente de N muestran un crecimiento lento y eventualmente el pH del medio es demasiado ácido, afectando uno de los factores que influyen en procesos morfogénicos como lo es la ES (Mihaljevic *et al.*, 2011).

La fuente de N ha demostrado ser tan importante no solo en su forma inorgánica, sino también en forma orgánica, como los aminoácidos. El uso de aminoácidos y fuentes de nitrógeno orgánicas en protocolos de ES es una práctica común (Loyola-Vargas *et al.*, 2016). Por ejemplo, se ha encontrado que la adición de glutamina es crucial para el metabolismo primario de aminoácidos, así como para la proliferación de cultivos embriogénicos, resultando especialmente efectiva en medios con NO_3^- para el desarrollo de los embriones somáticos (Carlsson *et al.*, 2017; Dahrendorf *et al.*, 2018). De la misma forma, en algunas especies, la respuesta embriogénica aumenta en un medio que contiene glutamina y NH_4^+ en comparación con el medio que solo contiene NH_4^+ (Mihaljevic *et al.*, 2011), ya que el efecto de los aminoácidos en la ES también depende de la especie, el explante o la respuesta morfogénica esperada. El efecto de los aminoácidos llega a ser tan determinante en algunos casos como para dictar la competencia embriogénica de un cultivo, como en el caso de *Cryptomeria japonica*, en el que se determinó que las células no embriogénicas de las suspensiones celulares tenían una mayor producción de glutamina, lo que estimulaba y mantenía la competencia embriogénica de las células embriogénicas del cultivo, por lo que al separarlas, éstas últimas perdían la capacidad de formar embriones (Ogita *et al.*, 2001).

Para lidiar con la variante disponibilidad de NO_3^- en el suelo, las plantas han desarrollado mecanismos que balancean la asimilación de NO_3^- con los

requerimientos de crecimiento, principalmente regulando componentes de las redes de regulación de los RCV a nivel molecular, cuya función es coordinar casi todos los aspectos del crecimiento; también son importantes integradores endógenos y traductores del estado del N a respuestas adaptativas de la planta (Abualia *et al.*, 2023). Es así como el N puede regular la biosíntesis, conjugación, degradación y transporte de diferentes RCV, ajustando el crecimiento y desarrollo vegetal de procesos como la ES a la disponibilidad de N (Kiba *et al.*, 2011; Krouk, 2016).

Si bien no se ha identificado con precisión el papel del N en todo el proceso de ES a nivel molecular, existen varias hipótesis al respecto (Fig. 1.4). Una de estas hipótesis está vinculada al estrés como factor de cambio del programa celular (Nic-Can *et al.*, 2016), mientras que otras de las hipótesis atribuyen su efecto a la relación que existe entre el N y los RCV, principalmente aquellos involucrados en el proceso de reprogramación celular de la ES: auxinas y CK.

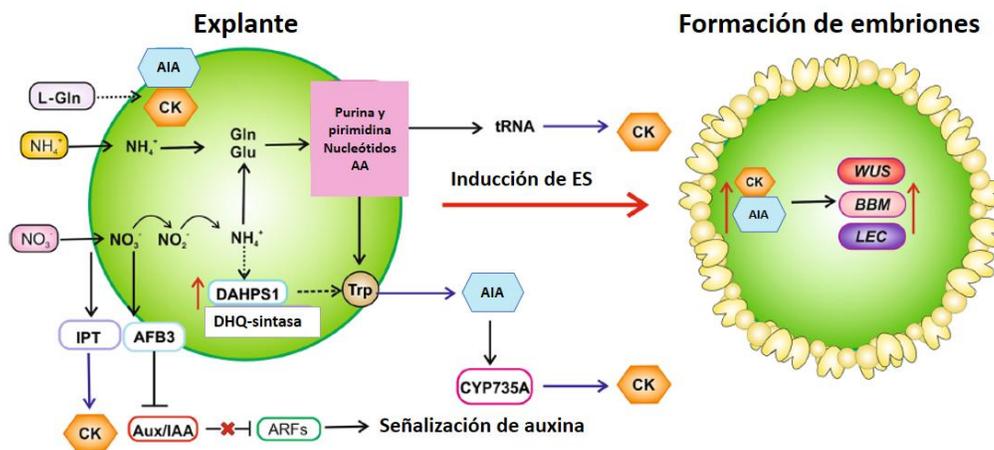


Figura 1.4. Modelo hipotético del metabolismo del N y su relación con la ES (Duarte-Aké *et al.*, 2022). L-Gln: L-glutamina; AIA: ácido indol-3-acético; CK: citoquinina; IPT: isopentenil transferasa; AFB3: auxin-signaling F-box 3; Aux/IAA: reguladores de la respuesta a auxina; ARFs: factores de respuesta a auxina; DAHPS1: primera enzima en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos; DHQ-sintasa: 3-deshidroquinato sintasa; Gln: glutamina; Glu: glutamato; Trp: triptófano; WUS, BBM y LEC: genes vinculados a la respuesta embriogénica.

En el caso de las auxinas, el N puede no solo afectar la biosíntesis de las mismas al afectar genes clave como *PIN-FORMED (PIN)* o *TRYPTOPHAN AMINO-TRANSFERASE RELATED 2 (TAR2)* o debido al efecto de aminoácidos como el triptofano que están íntimamente ligados a la síntesis de auxinas, sino que también se ha observado un papel importante del NO_3^- en cuanto al transporte de auxinas desde los brotes hacia las raíces, siendo esta relación tan estrecha que se han reportado transportadores de NO_3^- que pueden transportar auxinas (Krouk, 2016; Ma *et al.*, 2014). Del lado del NH_4^+ , se han encontrado casos en los que usar NH_4^+ como fuente de N estimula la síntesis de auxinas (Pencik *et al.*, 2015), así como la relación auxina/CK (Endres *et al.*, 2002; Fei and Vessey, 2003).

En otros casos, el NH_4^+ provoca una disminución en el contenido de CK (Rahayu *et al.*, 2005), lo que aunado a las evidencias en las que añadir CK al medio de cultivo compensaba la falta de NH_4^+ en el medio (Halperin and Wetherell, 1965), sugiere que tienen una función similar en la formación de los embriones somáticos. Otro efecto que se ha encontrado de la fuente de N sobre las CK es la inducción de su biosíntesis, al incrementar los niveles de CK (Garnica *et al.*, 2010; Poitout *et al.*, 2018), lo cual se vincula a una señal necesaria para el crecimiento radicular, ya que hay evidencia de que las CK actúan como moléculas mensajeras de larga distancia del NO_3^- (Vega *et al.*, 2019) y modulan la respuesta y asimilación del N, al reprimir la expresión de genes de proteínas relacionadas al transporte del N (Kiba *et al.*, 2011).

1.5. CITOCININAS

De manera general, las CK se han definido como sustancias que promueven la división celular de manera similar a la kinetina, la primera CK identificada, si bien esta CK no es natural (Skoog and Armstrong, 1970). Las CK son uno de los principales grupos de RCV, ya que controlan cambios en la diferenciación celular y regulan procesos del crecimiento junto a las auxinas, por lo que se puede decir que son un grupo esencial y determinante para modelar los diferentes destinos celulares a lo largo del ciclo de vida de las plantas (Hluska *et al.*, 2021; Li *et al.*, 2021).

Además, las CK están involucradas en una amplia gama de procesos fisiológicos como el desarrollo vascular y floral, la homeostasis de nutrientes, y las respuestas al estrés abiótico, apertura de los estomas, desarrollo de las raíces laterales, regulación del transporte de auxinas polares y el crecimiento de las raíces (Márquez-López *et al.*, 2019).

Las CK son un grupo de RCV derivados de la adenina con distintas sustituciones en la posición N^6 del anillo de la adenina (Fig. 1.5). Hay dos grupos de CK por el tipo de cadena lateral que contienen, el primer grupo y mejor caracterizado tiene una cadena lateral isoprenoide; estas CK comprenden a la zeatina (en sus configuraciones *cis* (*cZ*) y *trans* (*tZ*)), la dihidrozeatina (DZ) y la N^6 -(Δ^2 -isopentenil) adenina (iP). Si bien están agrupadas por su cadena lateral, estas CK resultan tener actividades y efectos muy diferentes en las plantas (Kamada-Nobusada and Sakakibara, 2009).

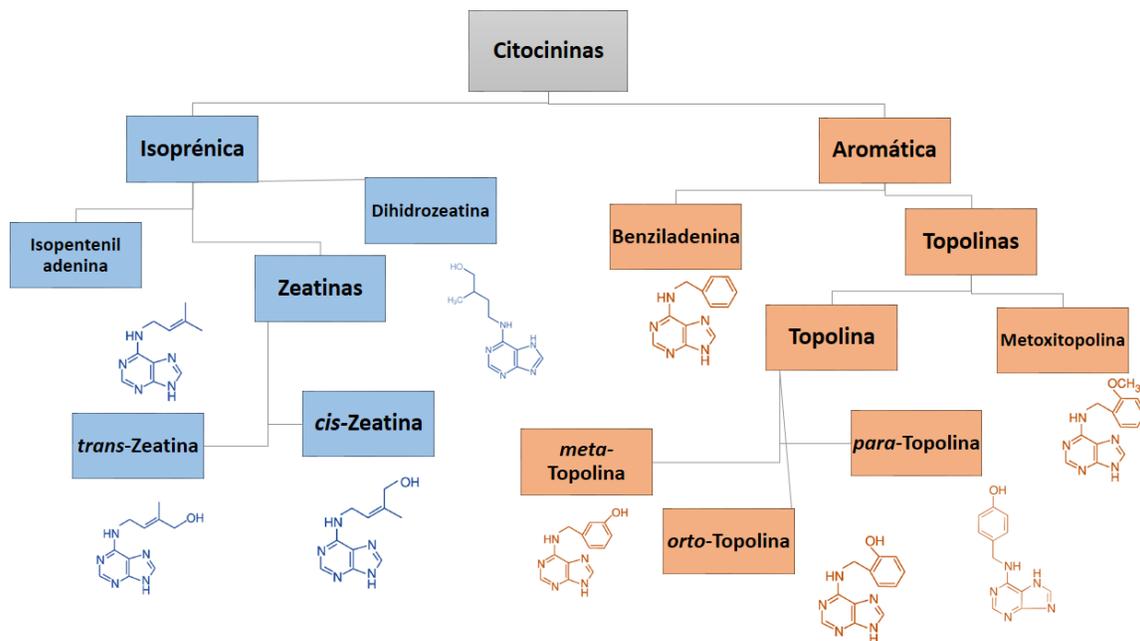


Figura 1.5. Citocininas clasificadas de acuerdo con su cadena lateral.

Las CK aromáticas tienen un grupo bencilo o hidroxibencilo aromático en la posición N^6 , siendo las principales CK aromáticas presentes en los tejidos vegetales la metatopolina (*mT*), la ortotopolina (*oT*), la 6-benciladenina (BA) y derivados de 6-BA (Fig. 1.5) (Sáenz *et al.*, 2003). A diferencia de las CK isoprenicas, no se conoce mucho sobre su metabolismo, especialmente su biosíntesis, debido a que son las CK menos frecuentes en plantas y se carece de un modelo de estudio apropiado. El único estudio al respecto fue un acercamiento desde la IPT, se quería averiguar si esa enzima sería la clave de la síntesis de CK aromáticas, pero las plantas de *Arabidopsis* transformadas con IPT de álamo (especie donde se inició la caracterización de las CK aromáticas debido a su predominancia) no mostraron ningún contenido de CK aromáticas, aunque no es evidencia suficiente para descartar la importancia de las IPT en la síntesis de CK aromáticas, ya que tal vez éstas necesitaban un sustrato diferente (Jaworek *et al.*, 2019). Una de las pocas cosas que se saben de estas CK, es que tienen la capacidad de unirse tanto a los receptores de CK como a la CKX, aunque no activan a los receptores ni son sustratos de la enzima.

Las CK se presentan en las plantas como nucleótidos, nucleósidos, como bases libres y como conjugados; estos últimos son de dos tipos distintos: glucosilación y alanilación. Estas modificaciones se dan principalmente en la posición O y en las posiciones N^3 , N^6 o N^7 , siendo parte importante de la homeostasis de las CK, ya que las glucosilaciones provocan que las CK sean almacenadas, siendo este un cambio reversible, mientras que la alanilación es irreversible y marca a las CK para su degradación (Márquez-López *et al.*, 2019; Sakakibara, 2006).

1.6. SÍNTESIS DE CITOCININAS

La síntesis de CK isoprenoides tiene dos rutas dependiendo de su sustrato principal; la primera utiliza una molécula de adenosín difosfato o trifosfato (ADP o ATP) y al dimetilalil pirofosfato (DMAPP) proveniente de la vía del metileritriol fosfato (Cheng *et al.*) o de la ruta del mevalonato (MVA), siendo la primera la más frecuente para la

reportadas: en la primera, los nucleótidos inactivos se transforman directamente en bases libres por la acción de LONELY GUY (LOG) que exhibe una actividad de citocinina ribósido 5'-monofosforribohidrolasa.

La segunda, la independiente de LOG, permaneció desconocida por muchos años hasta que se encontró a la enzima GY3, que actúa como 5'-ribonucleótido fosfohidrolasa, convirtiendo los nucleótidos de CK inactivos en ribósidos y finalmente la citocinina/purina ribosido nucleosidasa 1 (CPN1) forma las bases libres biológicamente activas (Kojima *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2023).

1.7. NITRÓGENO Y LA SÍNTESIS DE CITOCININAS

Al tratar de elucidar el mecanismo por el cual el contenido de N afecta la concentración endógena de CK, se ha encontrado evidencia que sugiere que la fuente nitrogenada puede afectar la síntesis de CK, principalmente al modificar la expresión de genes que codifican a enzimas que participan en este proceso (Fig. 1.7), siendo los principales genes afectados los que codifican a la IPT (Duarte-Aké *et al.*, 2022; Krouk, 2016).

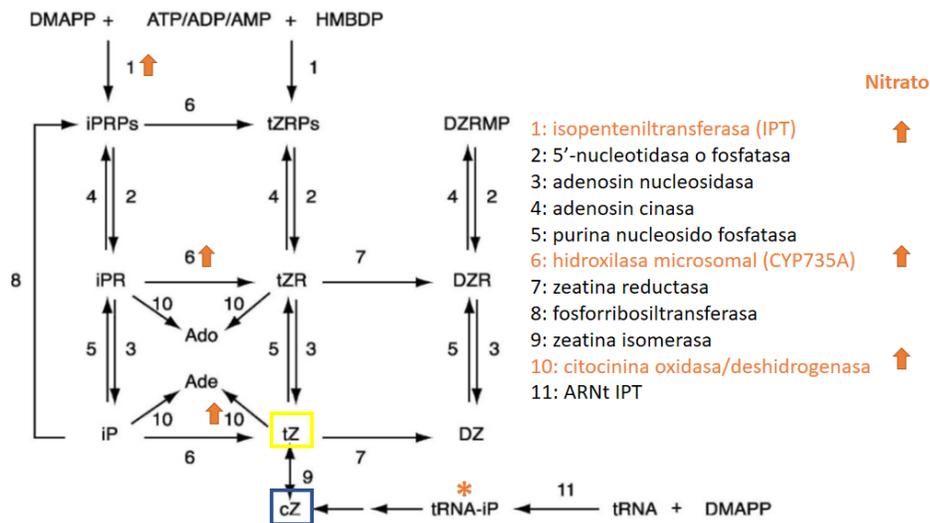


Figura 1.7. Modelo de síntesis de citocininas y el efecto del nitrato en diferentes enzimas. Adaptado de Sakakibara *et al.* (2021). DMAPP: dimetilalil pirofosfato;

ATP/ADP/AMP: tri/di/mono fosfato de adenosina; HMBDP: (E)-4-hidroxi-3-metil-but-2-enil pirofosfato; iPRPs/tZRP/DZRMP: nucleótidos; iPR/tZR/DZR: nucleósidos; iP: isopenteniladenina; tZ: *trans*-zeatina; DZ: dihidrozeatina.

El primer paso de la biosíntesis de la CK está catalizado por las isopenteniltransferasas (IPT). Su nombre es dimetilaliltransferasas, ya que el sustrato es el dimetilalil pirofosfato (DMAPP), y no el Δ^3 -isopentenil difosfato (IPP); aun así, este es el nombre que se ha generalizado para la primera enzima de la ruta (Márquez-López *et al.*, 2019).

Actualmente se reconocen tres clases de isopenteniltransferasas implicadas en la biosíntesis de las CK: la adenilato dimetilaliltransferasa (dependiente de AMP; EC 2.5.1.27), la ARNt dimetilaliltransferasa (EC 2.5.1.75) y la adenilato dimetilaliltransferasa (dependiente de ADP/ATP; EC 2.5.1.112). De éstas, la única que ha demostrado tener restricciones por el sustrato, es la ARNt dimetilaliltransferasa teniendo actividad únicamente sobre la adenina 37 del ARNt, mientras que las otras dos adenilato IPT pueden utilizar varias moléculas (Sakakibara, 2010).

Arabidopsis tiene nueve miembros en la familia *IPT*, mientras que el arroz tiene diez genes. Los genes *IPT* están mejor caracterizados en *Arabidopsis*, en donde se identificó una división en grupos de *IPT2* y *IPT9*, que codifican a ARNt *IPTs*, mientras que los demás genes muestran una relación más cercana al gen *IPT/TMR* bacteriano, con lo que *AtIPT1* y *AtIPT3-8* son los principales genes involucrados en la síntesis de CK como la iP y la zeatina (Argueso and Kieber, 2024).

En numerosos estudios y modelos se ha encontrado que la fuente nitrogenada influye en la expresión de los genes *IPT*, concretamente en *IPT3* e *IPT5*, si bien de manera diferente: mientras que *IPT3* tiene una respuesta rápida y específica al NO_3^- , *IPT5* presenta una respuesta a más largo plazo que se activa tanto con NO_3^- como con NH_4^+ (Hluska *et al.*, 2021; Sakakibara, 2005). Esta respuesta es clave en la señalización del N, ya que las CK se vuelven mensajeras a larga distancia sobre la disponibilidad de N, regulando una amplia gama de genes involucrados en el

metabolismo y desarrollo, así como en la adquisición de otros nutrientes (Sakakibara, 2006).

Después de la acción de la IPT en la biosíntesis de CK, la cadena isoprénica del producto obtenido, un nucleótido N^6 -(Δ^2 -isopentenil) adenina (iP), debe ser hidroxilado por una citocromo P450 monoxigenasa (CYP735A1 o CYP735A2) para generar CK del tipo ζ . La expresión de CYP735A2 es inducida por CK, lo que apunta a que estos genes también son sensibles al NO_3^- ; en este caso, CYP735A responde a la CK sintetizada por IPT3 (Sakakibara *et al.*, 2006).

A pesar de contarse con evidencias de la relación entre el N y las CK, la integración de la ruta de señalización completa y todas las implicaciones que tiene durante el crecimiento y desarrollo vegetal aún no se comprende (Krouk *et al.*, 2011).

1.8. JUSTIFICACIÓN

La ES es un proceso, que además de ser una poderosa herramienta biotecnológica, es un ejemplo de la totipotencialidad de las células vegetales. Desafortunadamente, no se entiende del todo y no se tiene certeza de las señales que llevan a las células somáticas a la adquisición y desarrollo del potencial embriogénico. A la fecha se sabe que las auxinas y las CK juegan un papel clave e interrelacionado en el inicio de la ES, principalmente mediante la expresión de genes como los de la familia de la isopentenil transferasa, primera enzima de la biosíntesis de CK. Por todo lo anterior, comprender cómo estas señales regulan el proceso de ES representaría un avance importante en los protocolos de multiplicación de especies de interés comercial y en el conocimiento científico de la ES.

1.9. OBJETIVO GENERAL

Elucidar si la síntesis de CK es afectada por la fuente de nitrógeno durante el proceso de ES.

1.10. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el proceso de inducción de la ES.
- Analizar el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el contenido de CK durante el proceso de inducción de la ES.

1.11. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los cambios en la relación de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo modifican la síntesis de CK durante la inducción de la ES?

1.12. HIPÓTESIS

Si el cambio en la relación de la fuente nitrogenada afecta la expresión de los genes de la biosíntesis de CK, modificando el contenido endógeno de CK, entonces la respuesta embriogénica cambiará.

1.13. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

De manera general, se llevó a cabo la inducción del proceso de ES en explantes obtenidos de plantas de *Coffea canephora* cultivadas *in vitro* y en suspensiones celulares de *D. carota* utilizando diferentes relaciones en la fuente de nitrógeno ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$), manteniendo la concentración de nitrógeno total en 15 mM para *C. canephora* y 60 mM para *D. carota*. Se utilizaron cinco relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, sólo nitrato, sólo amonio, 2:1, 1:1 y 1:2. Finalmente, se evaluó el contenido de CK. (Figura 1.8).

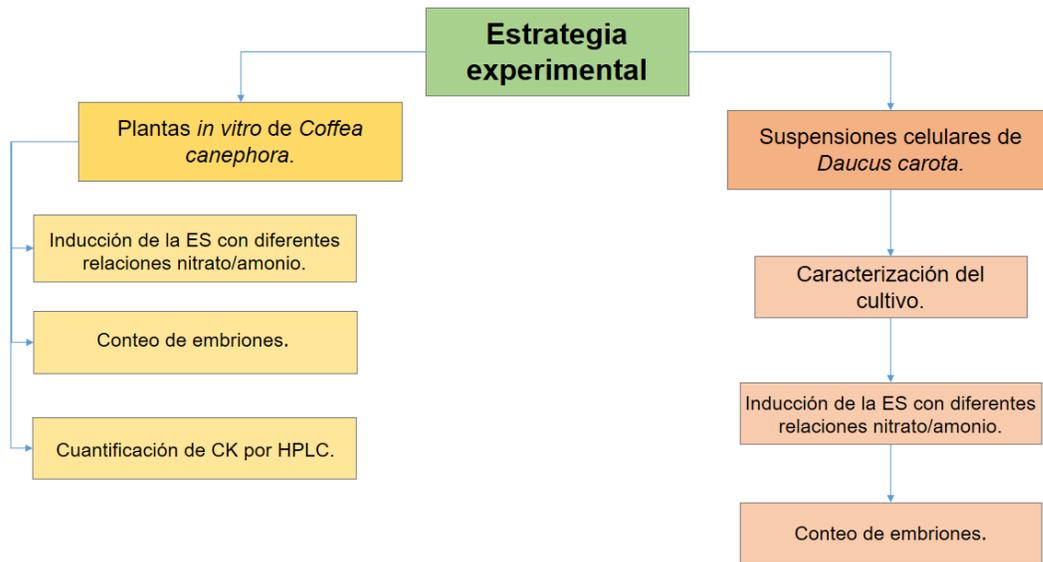


Figura 1.8. Diagrama general de la estrategia experimental.

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. INTRODUCCIÓN

El proceso de ES ha sido estudiado por décadas debido a lo complejo y multifactorial que es, particularmente en cuanto a genotipo se refiere. Aunque se han encontrado factores comunes, como la participación de los RCV en el proceso (principalmente auxinas y CK), la influencia de éstos no es idéntica para cada caso.

En este caso, se utilizaron dos modelos para el estudio del efecto de la fuente nitrogenada en la ES: *C. canephora* y *D. carota*. La primera es una especie de gran interés comercial alrededor del mundo, lo que ha impulsado el establecimiento de protocolos de propagación eficientes como el de Quiroz-Figueroa (2006a). Por otro lado, *D. carota* es un modelo para el cultivo de tejidos desde sus comienzos, incluida la ES.

Si bien estos dos modelos son muy diferentes entre sí, siendo uno ES directa y el otro ES indirecta, se probaron de maneras similares los efectos de la relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, en ambos casos manteniendo la cantidad de N total igual.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

2.2.1.1. *Coffea canephora*

Se utilizaron plántulas cultivadas *in vitro* de *C. canephora* que contaban con al menos tres pares de hojas. Las plántulas fueron colocadas en condiciones de preacondicionamiento por 14 días en un medio formado por las sales del medio de Murashige y Skoog (Murashige and Skoog, 1962) (MS, Phyto Technology Laboratories, M524), suplementado con tiamina-HCl 29.6 μM (Sigma, T3902), mio-inositol 550 μM (Sigma, I5125), cisteína 0.15 μM (Sigma, C121800), ácido nicotínico 16.24 μM (Sigma, N4126), piridoxina-HCl 9.72 μM (Sigma, P9755), sacarosa 87.64 μM (Sigma, S539) y Gellan gum 0.285% (p/v) (Phyto Technology Laboratories,

G434), ácido naftalenacético (ANA) 0.44 μM (Sigma, N1145) y kinetina (KIN) 2.32 μM (Sigma, K0753) ajustado a pH 5.8 e incubadas en condiciones de fotoperiodo ($150 \mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$) 16 h luz/ 8 h oscuridad a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.2.1.1.1. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Coffea canephora*

La inducción de la ES se llevó a cabo como se ha sido descrito previamente por Quiroz-Figueroa et al. (2006a). Brevemente, tras los 14 d de preacondicionamiento, se tomaron explantes del segundo y tercer par de hojas con un sacabocados de 0.8 cm de diámetro y se colocaron 5 explantes en 50 mL de medio de Yasuda modificado (Yasuda *et al.*, 1985) adicionado de benciladenina 5 μM (Phyto Technology Laboratories, B800), contenido en matraces de 250 mL.

Para evaluar el efecto de la relación de las fuentes nitrogenadas, se usaron cuatro tratamientos adicionales al testigo. El medio de cultivo fue el mismo, excepto por la cantidad de NH_4^+ y NO_3^- . Las relaciones entre las dos fuentes de nitrógeno se muestran en el Cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Tratamientos empleados con las diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. La relación 2:1 es el testigo.

Relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	Concentración $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	KNO_3	NH_4NO_3	KCl	NH_4Cl
1:0	15 mM: 0 mM	15 mM			
0:1	0 mM: 15 mM			5 mM	15 mM
2:1	10 mM: 5 mM	5 mM	5 mM		
1:2	5 mM: 10 mM		5 mM	5 mM	5 mM
1:1	7.5 mM: 7.5 mM		7.5 mM	7.5 mM	

Los matraces se mantuvieron en la oscuridad a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ y una agitación de 55 rpm durante 56 d. Para los análisis posteriores se tomaron muestras durante la inducción de la ES (7, 14, y 21 d). Los embriones somáticos derivados de los explantes se

examinaron, documentaron y cuantificaron bajo un estereomicroscopio (SMZ745T; Nikon, Tokio, Japón) con una cámara adaptada (EOS Rebel T3i; Canon, Melville, NY, EE. UU.).

2.2.1.2. *Daucus carota*

2.2.1.2.1 INDUCCIÓN DE CALLO A PARTIR DE SEGMENTOS DE RAÍZ

Para la inducción de callos a partir de la raíz de zanahoria (*Daucus carota*; variedad Emperor, marca: Daily salad) se seleccionaron zanahorias sin daños visibles, con un diámetro de entre 3 y 5 cm. Las zanahorias se lavaron con agua de grifo y jabón para eliminar cualquier suciedad o contaminante en su superficie. Posteriormente, se eliminó 1 cm de la parte superior y 2 cm de la parte inferior desechando ambos cortes. Con un pelador se retiró la cubierta exterior de la raíz y se cortó transversalmente en segmentos entre 5 y 7 cm, aproximadamente. A partir de ese momento, se trabajó en una campana de flujo laminar bajo condiciones asépticas para prevenir la contaminación. Los cortes de la raíz de zanahoria se sumergieron en 400 mL de etanol al 70% por un minuto y se enjuagaron con agua estéril tres veces. A continuación, se sumergieron en 400 mL de una solución de hipoclorito de sodio al 10% (v/v) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo los cortes de zanahoria se enjuagaron tres veces. Una vez enjuagados los cortes, se transfirieron a un papel filtro para cortar todas las orillas con un bisturí estéril con el objeto de eliminar el tejido muerto. Se cortaron transversalmente rodajas de 1 mm de espesor, transfiriendo de 2 a 3 explantes por frasco con medio MS. El medio MS contenía 4.5 μM de 2,4-D y 87.64 mM de sacarosa y se gelificó con 0.285% (p/v) Gellan gum, a pH de 5.8 y esterilizado a 121 °C (1 kg cm⁻²) durante 20 min. Los explantes se incubaron en la oscuridad a 25 \pm 2 °C. La formación de callo se evaluó con ayuda de un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ 745T). A los 30 días de cultivo el callo formado se transfirió a medio fresco para su proliferación.

2.2.1.2.2. ESTABLECIMIENTO DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

Para la generación de las líneas en suspensión se usaron callos de 8 semanas de edad. Se pesaron 2 g de callo y se colocaron en un matraz de 250 mL que contenía 50 mL de medio MS basal (Murashige and Skoog, 1962), suplementado con 4.5 μM de 2,4-D y 87.64 mM de sacarosa. Los cultivos se llevaron a un orbitador y se incubaron en la oscuridad con una agitación de 100 rpm. Las suspensiones celulares se subcultivaron cada dos semanas por dos meses.

2.2.1.2.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES

Para la caracterización de las suspensiones celulares se utilizaron suspensiones celulares de 14 días de cultivo. Las células se tamizaron a través de una malla de 200 μm y 100 μm para obtener un tamaño homogéneo del cultivo; de las células recuperadas con la malla se pesaron 250 mg y se depositaron en 25 mL de medio MS suplementado con 2,4-D 4.5 μM en matraces de 50 mL. Las suspensiones se incubaron bajo condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C durante 21 días, en un orbitador a 100 rpm. Se realizaron tres muestreos tomando tres matraces Erlenmeyer por cada día de muestreo. El medio de cultivo recolectado fue filtrado en mallas de 40 μm ; una vez filtrado el medio de cada matraz, se tomaron parámetros de crecimiento como peso fresco y peso seco de las suspensiones celulares. Además, se determinó el volumen final del medio de cultivo al cual se le midió el pH y la conductividad.

2.2.1.2.3.2. NÚMERO DE CÉLULAS

Para poder contabilizar las células se requiere la separación de los agregados celulares. Por lo cual, se tomó 1 mL de la suspensión celular en un tubo, se mezcló con 2 mL de trióxido de cromo al 8% y se calentó por 15 minutos a 75 °C. A continuación, el tubo se agitó vigorosamente durante 10 minutos para separar los agregados celulares. Seguidamente, 10 μL de la muestra se colocaron en una cámara de Neubauer y se contabilizó el número de células en los campos correspondientes. El muestreo se realizó por triplicado.

2.2.1.2.3.3. PARÁMETROS DE CRECIMIENTO

Para tener una mejor estimación del crecimiento de las suspensiones, con los datos recopilados durante la caracterización se calculó la velocidad de crecimiento (μ), el tiempo de duplicación (Td) y el índice de crecimiento (I) siguiendo las siguientes formulas:

$$\mu = \frac{\ln X_f - \ln X_o}{t_f - t_o} \quad Td = \frac{\ln 2}{\mu} \quad I = \frac{X_f - X_o}{X_o}$$

Donde X_f es peso final, X_o es peso inicial, t_f es tiempo final y t_o es tiempo inicial.

2.2.1.2.4. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Daucus carota*

Para la inducción de ES se usaron suspensiones celulares del día 14 del ciclo de cultivo. Esta suspensión celular se pasó a través de una malla de 200 μm , se desechó la parte mayor a 200 μm y la suspensión se volvió a pasar por una malla de 100 μm . Se desechó la parte mayor a 100 μm y la suspensión se pasó por una malla de 40 μm . Se desechó la parte de la suspensión que pasó la malla y la parte mayor a 40 μm se resuspendió en 5 mL de medio MS sin reguladores del crecimiento en un tubo que fue centrifugado a 3,000 rpm por 5 min para después eliminar el líquido y repetir el proceso con medio MS nuevo por tres veces. Esta suspensión se resuspendió por un periodo de 4 horas en 5 mL de medio MS sin reguladores del crecimiento para eliminar todo rastro del 2,4-D (Lee *et al.*, 2023). Al final de las cuatro horas, la suspensión se centrifugó y la pastilla se resuspendió en 5 mL de medio MS.

Para el estudio del efecto de la fuente de nitrógeno se tomaron 50 μL de inóculo para cada matraz de 250 mL con 50 mL de medio MS sin 2,4-D, haciendo las variaciones en la relación de la fuente nitrogenada de acuerdo con el cuadro 2.2. Los cultivos permanecieron en agitación en condiciones de oscuridad a 25 ± 2 °C en un orbitador a 100 rpm. Los embriones somáticos obtenidos se examinaron y cuantificaron bajo un estereomicroscopio (SMZ745T; Nikon, Tokio, Japón) con una cámara adaptada (EOS Rebel T3i; Canon, Melville, NY, EE. UU.).

Cuadro 2.2. Tratamientos empleados con las diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. La relación 2:1 es el testigo.

Relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	Concentración $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$	KNO_3	NH_4NO_3	KCl	NH_4Cl
1:0	60 mM: 0 mM	60 mM			
0:1	0 mM: 60 mM			20 mM	60 mM
2:1	40 mM: 20 mM	20 mM	20 mM		
1:2	20 mM: 40 mM		20 mM	20 mM	20 mM
1:1	30 mM: 30 mM		30 mM	30 mM	

2.2.2. MÉTODOS ANALÍTICOS

2.2.2.1. EXTRACCIÓN DE LAS AUXINAS Y CITOCININAS

La extracción y cuantificación de RCV se realizó siguiendo el método de Dobrev *et al.* (2017). Se utilizaron 50 mg de tejido (peso fresco) de *C. canephora*, obtenido durante los muestreos y se congelaron a $-80\text{ }^\circ\text{C}$. El tejido fue liofilizado antes de agregarle 1 mg de 2,6-Di-tert-butil-4-metilfenol (HTB) (disuelto en 100 μL de acetato de etilo) hasta obtener un polvo fino, que fue transferido a un tubo de microcentrífuga de 2 mL con 1 mL de amortiguador de extracción (metanol: agua: ácido fórmico; 15/4/1 v/v/v). El homogenado se centrifugó a $20,000 \times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. A continuación, el sobrenadante se transfirió a otro tubo, y se añadieron 500 μL de amortiguador de extracción a la pastilla, se resuspendió y se dejó reposar 30 min en hielo, posteriormente se volvió a centrifugar a $20,000 \times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ por 20 min. Los dos sobrenadantes de 0.5 mL se juntaron para tener un volumen final de 1 mL. Este sobrenadante se evaporó en SpeedVac (CentriVap microIR, LABCONCO) a 10 mBar y $40\text{ }^\circ\text{C}$ hasta un volumen de 250 μL .

La muestra se diluyó con 500 μL de solución de carga (3.8 mL de ácido fórmico al 98% y 96.2 mL de agua). Los 750 μL se cargaron en una columna Oasis MCX (30

μm ; 1 mL/30 mg capacidad de retención; Waters 186000252, Wexford, Irlanda) la cual se equilibró previamente con 1 mL de metanol, seguido de 1 mL de solución de carga. Una vez cargada la columna, se lavó con 1 mL de solución de carga y 1 mL de agua grado HPLC, y todo el lavado se desechó.

Una vez que la columna se lavó, los reguladores del crecimiento que estaban atrapados en ella se eluyeron. Primero, se aplicaron 500 μL de metanol para extraer las auxinas (fracción A). A continuación, sin lavar la columna, se aplicaron 500 μL de 0.35 M de hidróxido de amonio en metanol al 70% para eluir a las CK (fracción B).

La fracción A se evaporó hasta sequedad y la fracción B a un cuarto de su volumen en SpeedVac a 10 mBar y 40 °C y se almacenaron a -80 °C hasta su determinación.

2.2.2.2. ANÁLISIS CUANTITATIVO MEDIANTE HPLC

La fracción que contenía las CK se resuspendió en un mL del Sistema de la fase móvil para el HPLC (30% acetonitrilo grado HPLC y 70% agua grado HPLC conteniendo 0.5% de ácido acético). La solución se filtró a través de un filtro Millipore (0.22 μm). La separación cromatográfica de las CK se llevó a cabo inyectando 20 μL de la muestra en una columna Kromasil C₁₈ de fase reversa (5 μm , 100 Å, 250 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). La detección se llevó a cabo a 280 nm con un detector de arreglo de diodos 3000RS como parte de un Sistema cromatográfico Ultimate 3000 UHPLC series con bomba (Thermo Scientific Dionex, Waltham, MA, USA) y un automuestreador WPS-3000. La columna se empleó a temperatura ambiente (25 °C). El flujo de 1.0 mL min⁻¹ fue aplicado con un sistema isocrático.

Para controlar el instrumento, en ambos casos, se utilizó el Chromeleon Chromatography Data System software v7 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.2.3. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se realizaron diferentes curvas de calibración para los estándares *trans*-zeatina (tZ), isopenteniladenina (iP) y benciladenina (BA) para cuantificar las CK presentes en los tejidos.

2.2.8. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE AUXINAS Y CITOCININAS

2.2.8.1. ANÁLISIS CUANTITATIVO MEDIANTE HPLC

La fracción conteniendo las auxinas se disolvió en 1 mL del sistema de fase móvil de HPLC para auxinas, 60% de acetonitrilo grado HPLC y 40% agua grado HPLC que contenía 0.5% de ácido acético, filtrado a través de un filtro Millipore (0.22 μm). La separación cromatográfica de las auxinas se llevó a cabo inyectando 20 μL de la muestra en una columna Kromasil C₁₈ (5 μm , 100 Å, 250 × 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, EE. UU.). Su detección se llevó a cabo con un detector de fluorescencia FLD-3400RS como parte de una bomba de la serie Ultimate 3000 UHPLC (Thermo Scientific Dionex, Waltham, MA, EE. UU.) y un muestreador automático WPS-3000 con una excitación de 280 nm y una emisión de 340 nm. La columna se corrió a temperatura ambiente (25 °C). Se aplicó un flujo de 0.6 mL min⁻¹ con un sistema isocrático.

La fracción que contenía las CK se resuspendió en 1 mL del sistema de la fase móvil para el HPLC (30% acetonitrilo grado HPLC y 70% agua grado HPLC conteniendo 0.5% ácido acético). La solución se filtró a través de una filtro Millipore (0.22 μm). La separación cromatográfica de las CK se llevó a cabo inyectando 20 μL de la muestra en una columna Kromasil C₁₈ de fase reversa (5 μm , 100 Å, 250 × 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). La detección se realizó a 280 nm con un detector de arreglo de diodos 3000RS como parte de un sistema cromatográfico Ultimate 3000 UHPLC series con bomba (Thermo Scientific Dionex, Waltham, MA, USA) y un automuestreador WPS-3000. La columna se empleó a temperatura ambiente (25 °C). El flujo de 1.0 mL min⁻¹ fue aplicado con un sistema isocrático. Para controlar el instrumento, en ambos casos, se utilizó el software v7 Chromeleon Chromatography Data System (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

2.2.8.2. CURVAS DE CALIBRACIÓN

Se realizaron diferentes curvas de calibración para los estándares de ácido indolacético (AIA), *trans*-zeatina (tZ), isopenteniladenina (iP) y benciladenina (BA) para cuantificar las CK presentes en los tejidos.

2.2.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El procesamiento de los datos para realizar las gráficas y los análisis estadísticos se realizó con el programa de análisis de varianza ANOVA utilizando el software Origin Pro 2021 de 64 bits, ver. 94E (software de análisis de datos y gráficos). Los valores de significancia se determinaron mediante la prueba de Tukey. Las diferencias se consideraron significativas a $P < 0.05$.

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1. INTRODUCCIÓN

La fuente de N es un elemento clave en el cultivo de tejidos, ya que es indispensable para la morfogénesis. Es aún más complejo cuando se observa que no solo el contenido de N es determinante, sino que la relación entre una fuente oxidada y reducida de N puede afectar en gran medida el programa de desarrollo de las plantas.

El efecto del NO_3^- es tan poderoso que hay quienes sostienen que debería ser considerado un RCV a la par de las auxinas y CK, por ejemplo, con los cuales tiene una estrecha relación afectando procesos como la biosíntesis, transporte y almacenamiento.

Desde los inicios del estudio de la ES, la fuente de N ha demostrado ser de gran relevancia, aunque a la fecha no se ha logrado elucidar por completo su papel en la compleja red de señalización que desencadena este proceso.

3.2. INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ EN *C. canephora*

3.2.1 INDUCCIÓN DE LA ES EN DIFERENTES RELACIONES DE $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ A PARTIR DE PLANTAS DE 6 MESES DE EDAD.

Siguiendo el protocolo establecido para la ES directa en *C. canephora*, se realizó la inducción de la ES con cinco diferentes variaciones en la relación de la fuente nitrogenada $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$, siempre manteniendo la concentración total de N en 15 mM: la primera contenía solo NO_3^- , la segunda solo NH_4^+ , la tercera (o testigo para este protocolo) una relación 2:1, la cuarta una relación 1:2 y la última una relación 1:1. De manera general, se observaron cambios significativos entre los cinco tratamientos (Fig. 3.1), siendo el segundo (que contenía solo NH_4^+) en el que no llegó a formar embriones somáticos, mientras que en el resto de tratamientos se

formaron tanto masa proembriogénica como embriones somáticos, a partir del día 28 para el tratamiento testigo y el día 42 para todos los demás tratamientos.

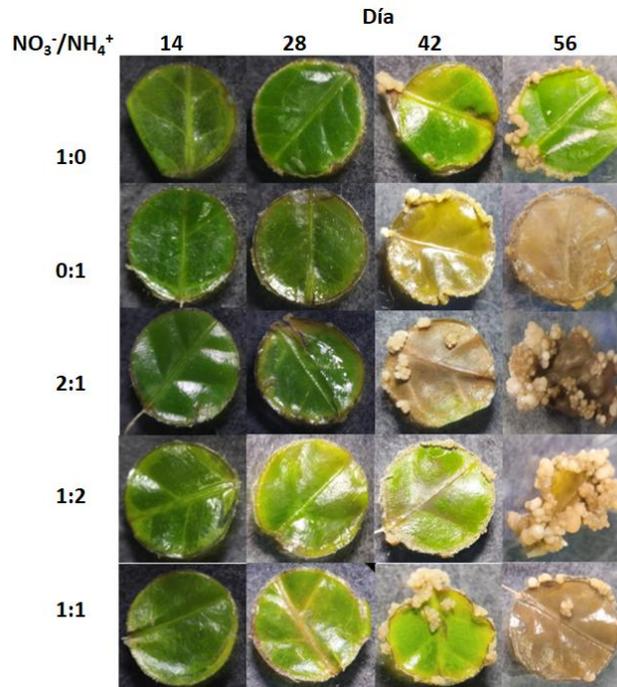


Figura 3.1. Embriogénesis somática en explantes derivados de plantas de 6 meses de edad de *C. canephora* cultivados con diferentes relaciones de NO₃⁻/NH₄⁺. Primera fila, relación 1:0 NO₃⁻/NH₄⁺ o tratamiento A; segunda fila, relación 0:1 o tratamiento B; tercera, relación 2:1 o tratamiento C; cuarta, relación 1:2 o tratamiento D; última fila, relación 1:1 o tratamiento E. Se colocaron cinco explantes en cada matraz de 50 mL y cada tratamiento se realizó por triplicado.

De entre los cuatro tratamientos que mostraron respuesta embriogénica, se destacan el tercero con relación 2:1 (testigo) y el quinto con relación 1:1, al ser los que tuvieron un mayor número de embriones somáticos por matraz, en promedio 70.6 embriones en el caso del testigo y 50.6 embriones para la relación 1:1 (Fig. 3.2), mientras que los tratamientos con solo NO₃⁻ y una relación 1:2 formaron un número de embriones menor.

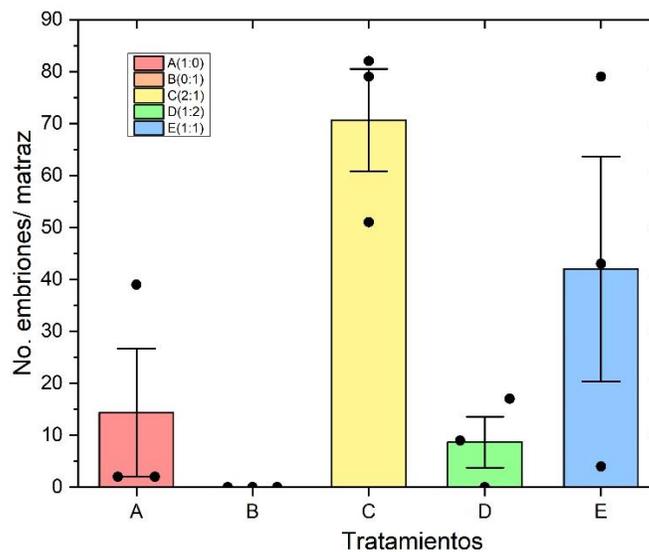


Figura 3.2. Conteo de embriones somáticos por matraz en explantes derivados de plantas de 6 meses de edad de *C. canephora* cultivados con diferentes relaciones de NO₃⁻/NH₄⁺. Se muestran, de izquierda a derecha, la relación 1:0 NO₃⁻/NH₄⁺ (tratamiento A), 0:1 NO₃⁻/NH₄⁺ (tratamiento B), 2:1 NO₃⁻/NH₄⁺ (tratamiento C), 1:2 NO₃⁻/NH₄⁺ (tratamiento D) y 1:1 NO₃⁻/NH₄⁺ (tratamiento E). Se colocaron 5 explantes por matraz y se contabilizaron 3 matraces por tratamiento 56 d después de la inducción.

Se contabilizó el número de embriones para cada estadio. En todos los tratamientos el número de embriones globulares fue el predominante, con una presencia reducida de los tres estadios restantes en el tratamiento testigo y el de relación 1:1, mientras que en la relación 1:2 solo se encontraron embriones en estadio globular y corazón, y en el tratamiento con solo NO₃⁻ solo se encontraron globulares y torpedos.

3.2.2 INDUCCIÓN DE LA ES EN DIFERENTES RELACIONES DE NO₃⁻/NH₄⁺ A PARTIR DE PLANTAS DE 1 AÑO

De la misma forma que en el experimento con plantas de 6 meses de edad, se realizó la inducción de la ES con cinco diferentes variaciones en la relación de la fuente nitrogenada (NO₃⁻/NH₄⁺), manteniendo siempre la concentración total de N en 15 mM: la primera contenía solo NO₃⁻, la segunda solo NH₄⁺, la tercera (o testigo para este protocolo) una relación 2:1, la cuarta una relación 1:2 y la última una relación 1:1. Se observaron resultados similares a los del primer experimento en lo

referente al efecto de la relación en la fuente nitrogenada (Fig. 3.3), si bien en este experimento la formación de masa proembriónica en los bordes del explante fue visible en casi todos los tratamientos que formaron embriones desde el día 28.

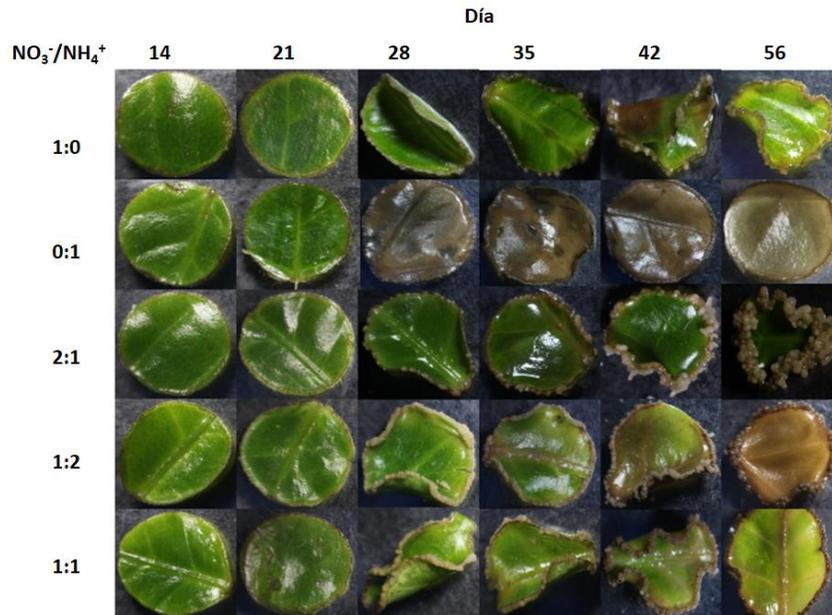


Figura 3.3. Inducción de ES en explantes derivados de plantas de 1 año de edad de *C. canephora* cultivados con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Primera fila, relación 1:0 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ o tratamiento A; segunda fila, relación 0:1 o tratamiento B; tercera, relación 2:1 o tratamiento C; cuarta, relación 1:2 o tratamiento D; última fila, relación 1:1 o tratamiento E. Se colocaron cinco explantes en cada matraz de 50 mL y cada tratamiento se realizó por triplicado.

Si bien la tendencia general fue muy similar a la del primer experimento, el número de embriones fue mayor en todos los tratamientos (Fig. 3.4). En el caso del mejor tratamiento, el de la relación 2:1, el promedio de embriones por matraz fue de 602, más de 8 veces el número de embriones obtenidos en el primer experimento. En el caso de la relación 1:1 el número de embriones obtenido por matraz fue de 155, tres veces más comparado con el primer experimento.

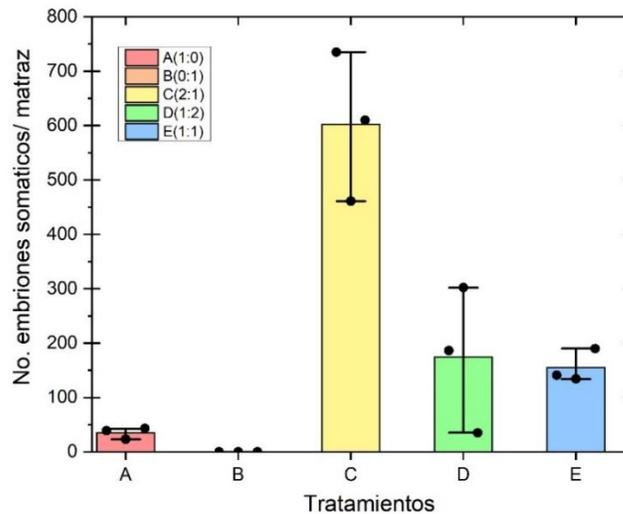


Figura 3.4. Conteo de embriones somáticos en explantes derivados de plantas de 1 año de edad de *C. canephora* cultivados con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Se muestran, de izquierda a derecha, la relación 1:0 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (tratamiento A), 0:1 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (tratamiento B), 2:1 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (tratamiento C), 1:2 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (tratamiento D) y 1:1 $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ (tratamiento E). Se colocaron 5 explantes por matraz y se contabilizaron 3 matraces por tratamiento 56 d después de la inducción

3.2.3. CONTENIDO DE CITOCININAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Al evaluar el contenido de tres diferentes CK naturales en el proceso de ES, se encontraron variaciones entre los diferentes tratamientos y puntos de muestreo. La diferencia más notoria fue la observada entre las tres CK, siendo la iP la que se encontró en mayor abundancia a lo largo de casi todo el proceso, excepto en el día 21, mientras que la cantidad de BA no llegó a la mitad del contenido de iP en la gran mayoría de los puntos de muestreo y tratamientos. En el caso de la iZ, se detectó en muy baja cantidad en prácticamente todos los puntos y tratamientos (Fig. 3.5).

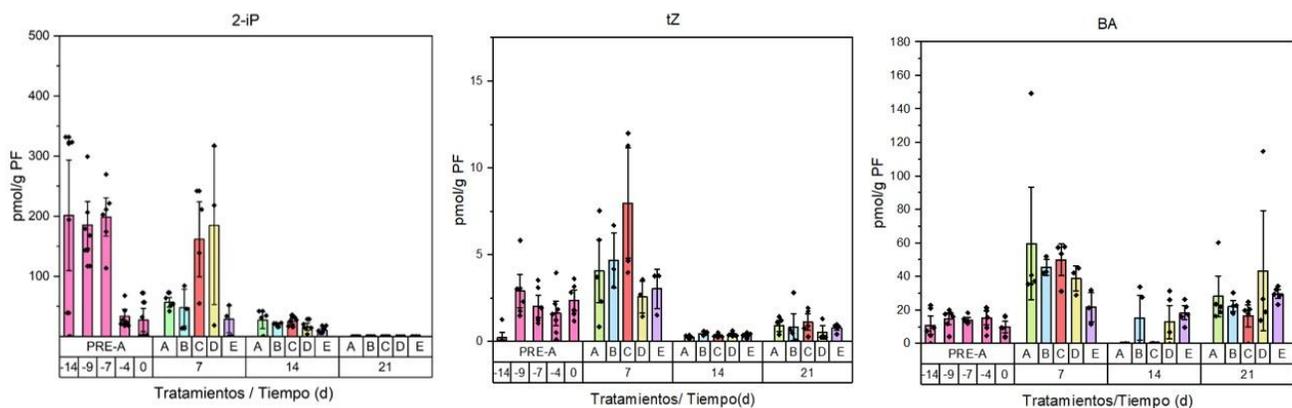


Figura 3.5. Cuantificación de citocininas en explantes de *C. canephora* durante la ES con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Se cuantificaron tres CK distintas (iP, BA y tZ) a lo largo del proceso. De izquierda a derecha se muestran los 5 puntos del preacondicionamiento (días -14, -9, -7, -4 y 0), seguidos del día 7, 14 y 21 para los 5 tratamientos de variación de la fuente nitrogenada $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. A, relación 1:0; B, relación 0:1; C, relación 2:1; D, relación 1:2; E, relación 1:1. Se cuantificaron 3 réplicas de 50 mg de peso fresco distintas para cada punto en cada tratamiento.

La iP se encontró en forma abundante durante el preacondicionamiento, oscilando entre 185.4 y 201.4 pmol g⁻¹ PF hasta el día -4, momento en el que disminuyó casi seis veces, para posteriormente aumentar ya durante la inducción de ES en todos los tratamientos, siendo los tratamientos de las relaciones 1:0 y 0:1 los que menos aumentaron, y el de la relación 1:2 el que más aumentó. Para el día 14 hubo una reducción importante en todos los tratamientos, alcanzando valores de entre 10.2 y 28.3 pmol g⁻¹ PF, siendo el tratamiento de relación 1:1 en el que más se redujo. Para el día 21, ya no se detectó iP en ningún tratamiento.

La tZ se mantuvo en un contenido bajo a lo largo del proceso; durante el preacondicionamiento su contenido varió entre 0.22 y 2.92 pmol g⁻¹ PF, los mayores contenidos se dieron en el día 7 en todos los tratamientos en un rango de entre 2.58 (relación 1:2) y 7.99 (relación 2:1) pmol g⁻¹ PF, tras lo cual se redujeron nuevamente

a valores de 0.27 y 0.47 pmol g⁻¹ PF en el día 14, y para el día 21 de 0.5 y 1.13 pmol g⁻¹ PF.

Finalmente, la BA mantuvo una baja concentración durante el preacondicionamiento, siendo su punto más alto de 15.3 pmol g⁻¹ PF en el día -4. Una vez iniciado el proceso de inducción de ES, su contenido aumentó en todos los tratamientos en un rango de entre 21.7 y 59.7 pmol g⁻¹ PF, siendo el aumento más importante en el tratamiento con una relación 1:0 y el menor en la relación 1:1. En el día 14 no se detectó BA para los tratamientos con relación 1:0, 0:1 y 2:1, y en los tratamientos restantes hubo una reducción que alcanzó hasta los 12.9 pmol g⁻¹ PF, situación que se revirtió en el día 21, aumentando el contenido de BA en todos los tratamientos, especialmente en el de relación 1:2 (43.5 pmol g⁻¹ PF) y en menor medida en la relación 2:1 (16.6 pmol g⁻¹ PF).

3.2.4. CONTENIDO DE AUXINAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO₃⁻/NH₄⁺

El contenido de AIA y sus conjugados AIA-Leu, AIA-Glu y AIA-Asp también sufrió alteraciones notables en cada una de las relaciones de variación de la fuente nitrogenada NO₃⁻/NH₄⁺ (Fig. 3.6). En el caso del AIA, en el preacondicionamiento solo tuvo un par de aumentos en los días -9 y 0 (inicio de la inducción), ambos con 0.002 pmol g⁻¹ PF. Los valores para los tratamientos A-D se mantuvieron bajos en el día 7, entre 0.0014 y 0.0025 pmol g⁻¹ PF, destacándose así el tratamiento E con 0.013 pmol g⁻¹ PF. Conforme avanzó el proceso, el contenido de AIA disminuyó de manera general, aunque el tratamiento C (relación testigo) tuvo un aumento en el día 14 al llegar a los 0.006 pmol g⁻¹ PF.

En el caso del conjugado de almacenamiento AIA-Leu, no hubo grandes fluctuaciones durante el preacondicionamiento y se notaron diferencias para los 5 tratamientos en el día 7: en los tratamientos A (1:0) y B (0:1) el contenido disminuyó, pasando de 0.009 pmol g⁻¹ PF a 0.001 y 0.0006 pmol g⁻¹ PF, respectivamente. En los tratamientos C (2:1) y E (1:1) también hubo una disminución, aunque menos notoria, pasando a 0.004 y 0.006 pmol g⁻¹ PF. El único aumento se vio en el

tratamiento D (1:2), en el que se alcanzaron los 0.02 pmol g^{-1} PF. Para el día 14, el AIA-Leu no fue detectado en los tratamientos A y B, y en el C prácticamente permaneció sin cambios, en el D se redujo cuatro veces al llegar a $0.005 \text{ pmol g}^{-1}$ PF y en el E aumentó drásticamente a $0.097 \text{ pmol g}^{-1}$ PF. Hacia el final de la inducción, el contenido disminuyó en todos los tratamientos, alcanzando valores entre 0.0001 y $0.004 \text{ pmol g}^{-1}$ PF.

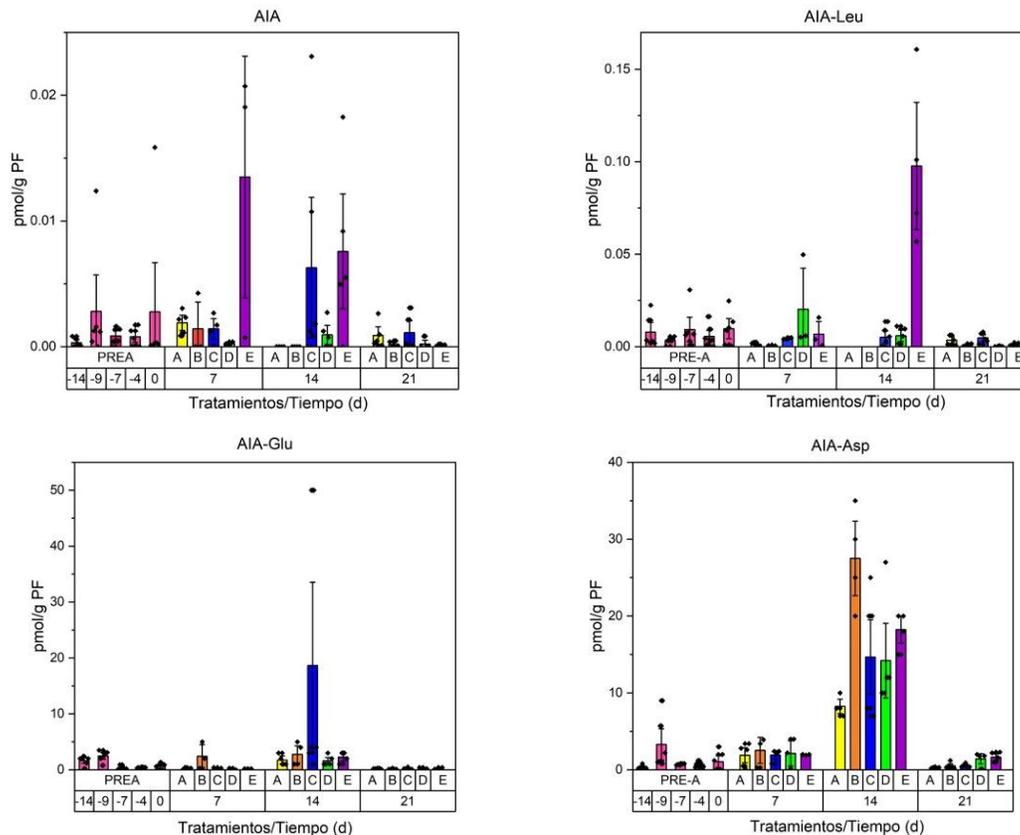


Figura 3.6. Cuantificación de AIA y 3 de sus conjugados en explantes de *C. canephora* durante la ES con diferentes relaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. Se cuantificaron tres conjugados distintos (AIA-Leu, AIA-Glu y AIA-Asp) a lo largo del proceso. De izquierda a derecha se muestran los 5 puntos del precondicionamiento (días -14, -9, -7, -4 y 0), seguidos del día 7, 14 y 21 para los 5 tratamientos de variación de la fuente nitrogenada $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$. A, relación 1:0; B, relación 0:1; C, relación 2:1; D, relación 1:2; E, relación 1:1. Se cuantificaron 3 réplicas de 50 mg de peso fresco distintas para cada punto en cada tratamiento.

El contenido de AIA-Glu disminuyó durante los últimos días de preacondicionamiento, bajando desde el punto más alto en el día 9 (2.48 pmol g^{-1}) hasta 0.63 pmol g^{-1} PF en el día 0. En el día 7 de la inducción el contenido bajó aún más para todos los tratamientos excepto en el de solo amonio (B), donde alcanzó los 2.43 pmol g^{-1} PF, mientras que en el resto de los tratamientos los niveles se mantuvieron en un rango de 0.1 a 0.25 pmol g^{-1} PF. En el día 14, todos los tratamientos mostraron un aumento importante, especialmente en el C, en el que se alcanzaron los 18.6 pmol g^{-1} PF. Al final de la inducción, en todos los tratamientos se disminuyeron notablemente los niveles, teniendo valores de entre 0.14 pmol g^{-1} PF (tratamiento B) y 0.27 pmol g^{-1} PF (tratamiento D).

Finalmente, el conjugado del que se encontró un mayor contenido fue del AIA-Asp. Comenzó con valores bajos durante el preacondicionamiento, solo aumentando en el día -9 (0.71 pmol g^{-1} PF). En el día 7, en los 5 tratamientos se mostraron contenidos similares con 1.9 pmol g^{-1} como mínimo (tratamientos A, C y E) y 2.52 pmol g^{-1} PF como máximo (tratamiento B). En todos los casos, la cantidad de AIA-Asp aumentó en el día 14, especialmente en el tratamiento B, donde alcanzó los 27.5 pmol g^{-1} PF. Durante el final de la inducción, en el día 21, todos los tratamientos disminuyeron el contenido del conjugado, alcanzando valores de entre 0.28 y 1.64 pmol g^{-1} PF (tratamientos A y E, respectivamente).

3.3. *Daucus carota*

3.3.1. INDUCCIÓN DE CALLOS Y ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES

Tras cuatro semanas de cultivo en medio suplementado con 2,4-D se inició la formación de callo en las secciones de raíz, principalmente en la zona del procambium (Fig. 3.7C). Para establecer las suspensiones celulares, después de ocho semanas de cultivo de los callos friables obtenidos, con un subcultivo a las cuatro semanas (Fig. 3.7D), se tomaron 2 g de callo y se colocaron en matraces de 250 mL con 50 mL del mismo medio empleado para la inducción de los callos. El establecimiento de las suspensiones celulares, a partir de los callos de raíz de

zanahoria, se obtuvo después de cuatro transferencias, cada dos semanas, de la suspensión inicial (Fig. 3.7E-F).

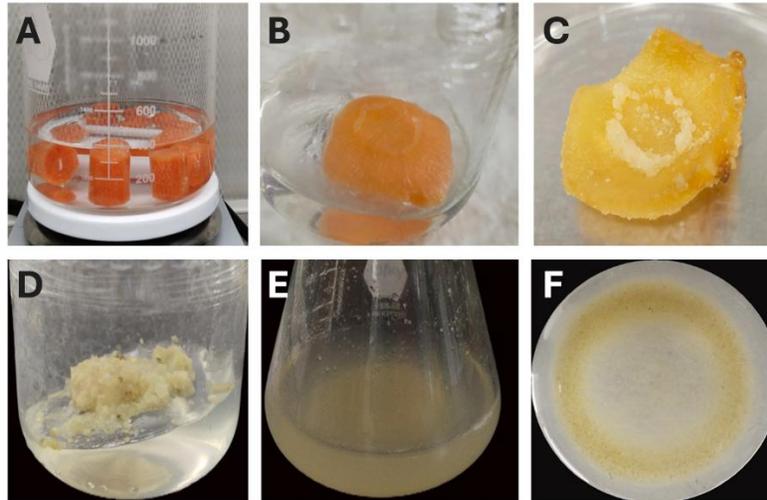


Figura 3.7. Inducción de callos y establecimiento de suspensiones celulares de *D. carota*. *A*, segmentos de raíz desinfectados; *B*, establecimiento en el medio de inducción de callo con 2,4-D; *C*, inicio de la formación de callo a los 30 días de cultivo; *D*, callo de 8 semanas utilizado para el establecimiento de suspensiones celulares; *E* y *F*, suspensiones celulares de 14 días.

3.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS SUSPENSIONES CELULARES DE RAÍZ

La toma de muestra para evaluar el crecimiento de las suspensiones celulares se llevó a cabo durante 21 días de cultivo y se evaluaron los parámetros de peso fresco, conductividad, número de células y pH. En el caso de la determinación del peso seco se evaluaron solamente los días pares (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14). Los resultados obtenidos en la determinación de los pesos seco y fresco, el número de células y la conductividad del medio de cultivo, así como el cambio en el pH se muestran en la Fig. 3.8.

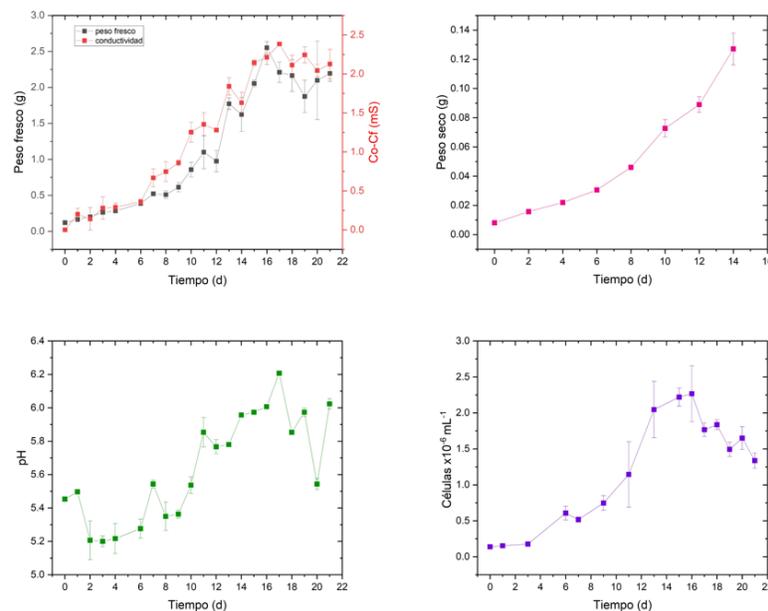


Figura 3.8. Caracterización del ciclo de cultivo de la suspensión celular de *D. carota* durante 21 días. De izquierda a derecha y de arriba abajo, se presentan el peso fresco y conductividad, y el peso seco durante 14 d (rosa) en los paneles superiores, mientras el pH del medio (verde), y el número de células (morado) en los paneles inferiores.

El peso fresco se mantuvo en una tendencia a aumentar durante los 21 días, siendo el peso real inicial de 0.1 g, llegando a 2.5 g en el día 16 y descendiendo a 2.2 g en el día 21. El peso seco mostró el mismo comportamiento, iniciando en 0.01 g y terminando en 0.13 g. Las células al crecer toman los nutrientes del medio de cultivo, lo que provoca una disminución en su conductividad. Si se resta la conductividad de cada día a la conductividad inicial el resultado muestra el crecimiento de las células (Fig. 3.8).

Cuando el crecimiento se midió como el aumento en el número de células se puede apreciar un aumento importante desde el día 8 (0.45×10^6 células mL^{-1}), comenzando una fase de crecimiento exponencial hasta el día 13 (2.04×10^6 células mL^{-1}), manteniéndose brevemente para empezar a decaer el día 17 (Fig. 3.8).

El pH es un parámetro indispensable para monitorear el crecimiento del cultivo, ya que nos otorga información sobre los elementos presentes en el medio de cultivo,

como el NO_3^- y el NH_4^+ . El pH sufrió una caída considerable en los primeros dos días, para aumentar durante el resto del ciclo, un comportamiento esperado en este caso, donde las suspensiones toman primero el NH_4^+ del medio, acidificándolo, para tomar después el NO_3^- , lo que produce la alcalinización al final.

Estos parámetros sugieren que las suspensiones están creciendo de manera adecuada, así como los valores de la velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y el índice de crecimiento (Cuadro 3.2), para cuyo cálculo se consideró el número de células por mililitro durante la fase exponencial (día 8-13).

Cuadro 3.2. Caracterización de suspensiones celulares en *D. carota*

Velocidad de crecimiento	Tiempo de duplicación	Índice de crecimiento
$0.36 \text{ células} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ / d	2.293 d	$3.53 \text{ células} \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$

3.3.3. INDUCCIÓN DE LA ES CON DIFERENTES RELACIONES DE $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$

Para estudiar el efecto de la fuente de nitrógeno en la inducción de la ES, ésta se realizó con cinco diferentes variaciones en la relación de la fuente nitrogenada ($\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$), manteniendo siempre la concentración total de N en 60 mM: la primera relación contenía solo NO_3^- , la segunda solo NH_4^+ , la tercera (o testigo para este protocolo) una relación 2:1, la cuarta una relación 1:2 y la última una relación 1:1.

En los primeros 8 d de la inducción se pudieron observar en el microscopio óptico los primeros embriones y el crecimiento de las células para los tratamientos C (relación 2:1) y E (relación 1:1). En el resto de los tratamientos no se observó crecimiento. Para el día 11 después de la inducción de la ES, los embriones somáticos eran visibles para los dos tratamientos que respondieron y se consideró una respuesta nula para los tres restantes (Fig. 3.9).

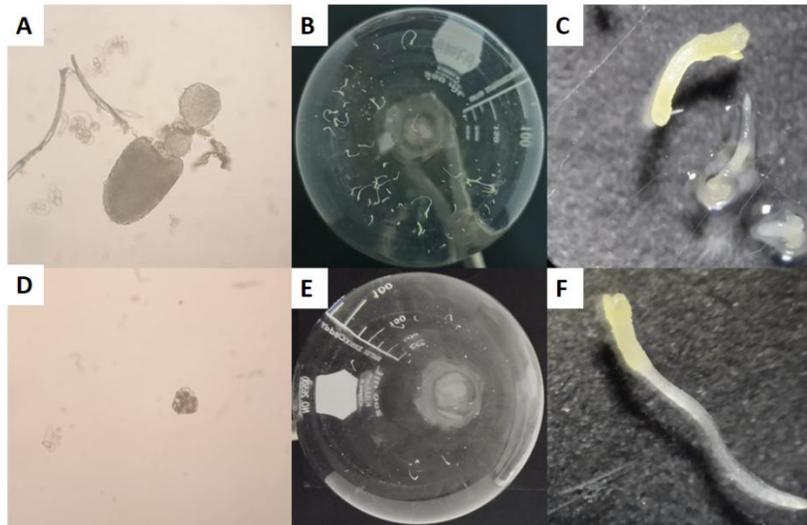


Figura 3.9. Embriogénesis somática en diferentes relaciones de nitrógeno en *D. carota*. A-C. Relación nitrato-amonio 2:1, D-F, Relación nitrato-amonio 1:2. A. Embriones en estadios tempranos de desarrollo a los 8 d de la inducción, B-C. Embriones somáticos obtenidos tras 11 días. D. Células a los 8 d de la inducción, E-F. Embriones somáticos obtenidos tras 11 días.

Al día 11 se realizó el conteo de embriones somáticos (Fig. 3.10). El promedio para la relación 2:1 fue de 39 embriones por matraz, mientras que el promedio para la relación 1:1 fue de 10 embriones por matraz. El desarrollo de los embriones somáticos no mostró una diferencia entre estos dos tratamientos, ya que ambos tenían para ese momento mayor número de embriones cotiledonares. No se reportaron embriones en estadio globular debido a que el conteo se realizó en un estereomicroscopio, lo que no permite contabilizar embriones de ese tamaño (aproximadamente 80 μm).

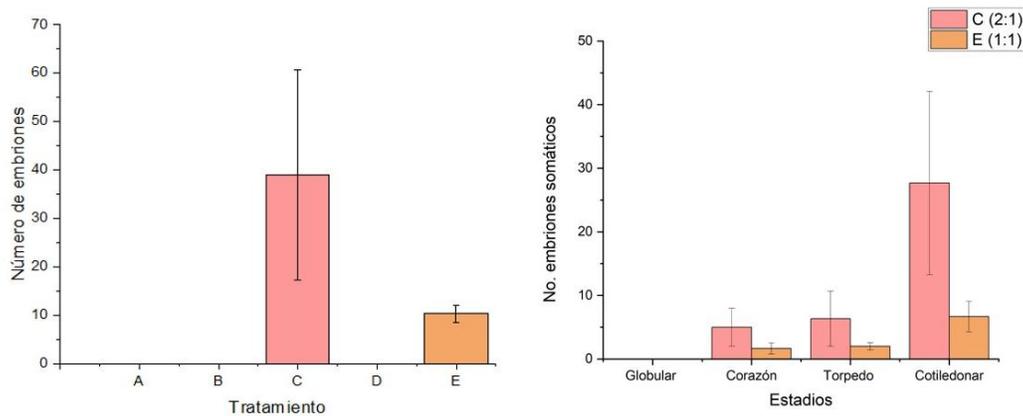


Figura 3.10. Embriones somáticos en diferentes relaciones de nitrógeno en *D. carota* al día 11. Izquierda, conteo total de embriones somáticos en todas las relaciones nitrato-amonio. Derecha, Conteo de embriones somáticos por estadios de desarrollo en los dos únicos tratamientos exitosos, en la relación nitrato-amonio 2:1 (tratamiento C) y en la relación nitrato-amonio 1:1 (tratamiento E). Se contabilizaron 3 embriones por tratamiento.

Se realizó un segundo conteo tras 32 d de cultivo, en el que se observó un número mayor de embriones germinados en los tratamientos C, D y E, así como la formación de embriones somáticos en el tratamiento A. Sin embargo, los embriones en el tratamiento A mostraban un desarrollo menor y aparente formación de callo, además de que los embriones en los tratamientos D y E formaron embriones somáticos secundarios (Fig. 3.11). Para este día, se contabilizaron más embriones somáticos en el tratamiento A, seguido por el C, D y E, mientras que en el B solo se logró formar un embrión.

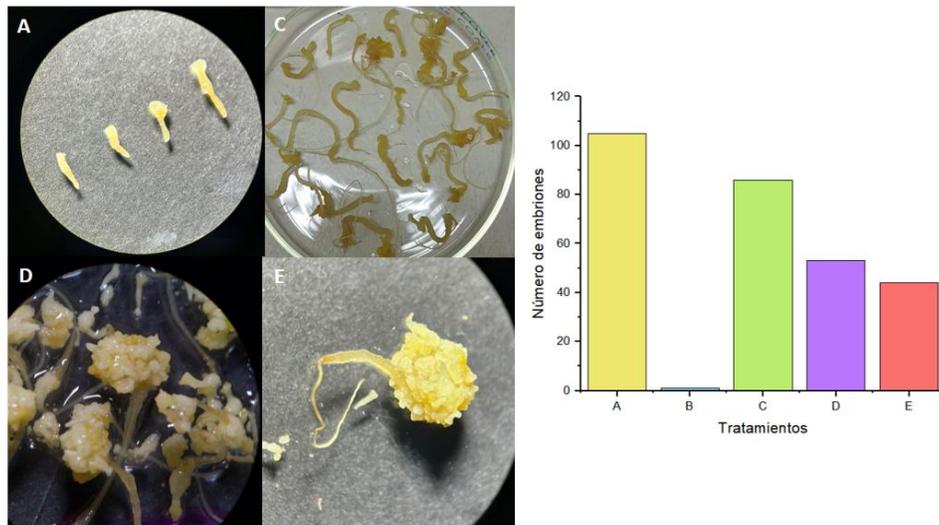


Figura 3.11. Embriones somáticos en diferentes relaciones de nitrógeno en *D. carota* al día 32. Panel de la izquierda, embriones somáticos en los tratamientos A, C, D y E. Panel de la derecha, conteo de embriones para cada tratamiento.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

4.1 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ EN *C. canephora*

Los resultados obtenidos muestran una diferencia clara en la respuesta embriogénica dependiendo de la relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ que se use, lo que evidencia que no es solo la cantidad de N total la que determina el efecto sobre el cultivo, sino que es la relación entre la fuente de N oxidada y reducida la que determina la señalización necesaria para la inducción de la ES, ya que el contenido total de N en todos los experimentos fue la misma, 15 mM, ya reportada como óptima para varios modelos incluyendo *C. canephora* (Pasternak and Steinmacher, 2024).

En el tratamiento testigo fue la relación 2:1, en la que obtuvo el mayor número de embriones por explante, seguido por la relación 1:1. El que los dos tratamientos más exitosos sean aquellos donde predomina el NO_3^- o exista una combinación de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en la que el NH_4^+ no predomine sugiere que, si bien el NO_3^- sea la fuente de N principal de las células vegetales, el NH_4^+ sigue siendo clave en la inducción de la ES. Esto coincide con reportes para otras especies como *D.carota* , *Linum usitatissimum* (Cunha and Fernandes-Ferreira, 1999) y *Cucurbita pepo* (Leljak-Levanic *et al.*, 2004) en los que la presencia de iones de amonio en el medio de cultivo fue necesaria para la formación de embriones somáticos o su correcto desarrollo. Este efecto está posiblemente vinculado a RCV, como las auxinas y CK, ya que en estudios previos se ha encontrado cambios en los contenidos endógenos de estos y otros RCV debido a la concentración de amonio en el medio de cultivo (Dziewit *et al.*, 2024; Li *et al.*, 2024; Pencik *et al.*, 2015).

Por otro lado, el único tratamiento en el que no se logró la inducción de la ES o formación de masa proembriogénica fue el que contenía solo NH_4^+ sugiere que ésta no es la fuente de N más idónea en el cultivo de tejidos, debido a una serie de

efectos adversos como lo son: la inhibición de la absorción de cationes (K^+ , Mg^{2+} o Ca^{2+}) y los consiguientes cambios en el equilibrio iónico de la planta; alcalinización intracelular y acidificación extracelular; e interferencia con la actividad fotosintética (Esteban *et al.*, 2016).

Otro aspecto a resaltar es que estos resultados se obtuvieron en ambos experimentos, tanto en el de plantas de seis meses de edad como en el de plantas de un año, en el que a pesar de tener eficiencias muy dispares a causa de la edad del explante, el efecto de la relación NO_3^-/NH_4^+ fue prácticamente idéntico, por lo que podemos asumir que para *C. canephora* el efecto de la relación en la fuente nitrogenada es independiente de la edad del explante y una relación con mayor N oxidado pero con presencia de N reducido es necesaria para la mejor respuesta en la inducción de la ES.

4.1.2 CONTENIDO DE CITOCININAS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO_3^-/NH_4^+

De manera general, la dinámica de la concentración de CK durante el proceso de inducción de la ES podría ser descrita como una disminución inicial durante el preacondicionamiento teniendo sus puntos más bajos en el día 0 o inicio de la inducción, seguido de un aumento considerable durante la primera semana (en diferentes medidas para cada tratamiento) para finalmente reducirse hasta llegar a ser indetectable en algunos casos para el día 21. Este patrón es consistente con lo reportado previamente para *C. canephora* (Avilez-Montalvo *et al.*, 2022).

En cuanto a las diferencias en los tratamientos, el contenido de CK parece ser afectado en mayor medida por la combinación entre NO_3^-/NH_4^+ , ya que los tratamientos con relaciones 2:1, 1:2 y 1:1 presentaron las variaciones más notables con respecto al tiempo, además de tener un mayor contenido de CK isoprénicas en general, mientras que en los tratamientos que contenían solo una de las dos fuentes de N presentaron menos cambios en su contenido de CK a pesar de seguir las mismas dinámicas.

En el caso de las CK isoprénicas la tendencia fue igual, hubo un aumento importante en los primeros 7 días para disminuir durante el resto de la inducción, especialmente para los tratamientos más exitosos (relación 2:1 y 1:1) en el contenido de *tZ*, y para el testigo y la relación 1:2 en el contenido de 2-iP, donde se observó el mayor contenido de estas CK comparado con el de los otros tratamientos. La única diferencia para estos casos estuvo en el día 21, en el que la 2-iP no fue detectada en ningún tratamiento mientras que la *tZ* aún estuvo presente, aunque en niveles bajos. Estos resultados apuntan a que el contenido de CK en el día 7 posiblemente esté vinculado a la diferencia en las respuestas embriogénicas en los tratamientos, especialmente en cuanto al testigo (relación 2:1), que fue en el que se detectaron los contenidos más elevados.

Es importante señalar que para el modelo de *C. canephora*, se han encontrado cambios notables en el contenido de CK durante las primeras horas de la inducción (Avilez-Montalvo *et al.*, 2022), así que es necesario ampliar el análisis a esa ventana de tiempo para los 5 tratamientos, ya que seguramente hay cambios importantes que pudieran explicar mejor los resultados obtenidos.

En el caso de la única CK aromática cuantificada (BA), se observó un aumento importante en los primeros 7 días debido a que es la CK adicionada en el medio de cultivo, aunque hubo un aumento en el día 21 después de una disminución drástica en el día 14, lo que sugiere una biosíntesis durante el proceso, y aunque no se observaron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos, ni se tienen antecedentes de que la fuente nitrogenada afecte la biosíntesis de CK aromáticas (debido a que esta se desconoce por completo), en el caso de *C. canephora* ya se ha comprobado que la inducción de ES es totalmente dependiente de la BA agregada en el medio de cultivo (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2006a).

4.1.3 CONTENIDO DE AUXINAS Y SUS CONJUGADOS DURANTE LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE NO₃⁻/NH₄⁺

La auxina AIA es uno de los RCV más importantes en el proceso de inducción de la ES, en el caso de *C. canephora* es indispensable, como ya se ha demostrado el hecho de que al inhibir la biosíntesis de AIA se inhibe la inducción de la ES (Uc-Chuc *et al.*, 2020). El aumento inicial durante el preacondicionamiento estuvo provocado por la adición de auxinas exógenas, mientras que los contenidos variaron en gran medida en todos los tratamientos a lo largo de la inducción. Dada la edad de las plantas usadas para el experimento de cuantificación, hay diferencias importantes a lo reportado previamente para este modelo, donde tras una drástica disminución en las primeras 24 h, el contenido de AIA aumentaba en el día 7 para disminuir nuevamente durante el resto del proceso (Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013).

En este experimento, la fuente de N tuvo un efecto importante sobre el contenido de AIA; los tratamientos con una sola fuente de N reducen el contenido de auxina en la inducción de la ES, algo necesario para la formación de embriones, aunque los resultados finales sugieren que no es solo el contenido de AIA lo que dicta la formación de embriones somáticos y que es el balance $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ lo que permite el correcto desarrollo de la ES. En los tratamientos C y D (2:1 y 1:2) se observaron comportamientos similares, pues en ellos disminuyó el contenido de AIA en el día 7 y aumentó hacia el día 14, mientras que en el tratamiento E (1:1) hubo un aumento en el día 7 y una drástica disminución en los demás días. En estos casos se podría asumir lo contrario a los primeros dos, a pesar de no seguir la disminución necesaria en el contenido de AIA, las señales que coordinan el NO_3^- y el NH_4^+ parecen pesar más para lograr la formación de embriones somáticos.

Los conjugados de auxinas son un elemento importante para la homeostasis de las células, ya que formas como AIA-Leu permiten almacenar auxinas y otras como AIA-Glu o AIA-Asp participan en el proceso de degradación de las auxinas, ayudando a mantener bajo control las respuestas desencadenadas por la auxina. En cuanto al AIA-Leu, el aumento de este conjugado en los tratamientos C-E durante el proceso de inducción de la ES posiblemente se vincula con el aumento

en el contenido de AIA en estos tratamientos, siendo la estrategia para regular el contenido de la auxina libre.

En el caso de los conjugados para la degradación, también se puede suponer un vínculo con el contenido de AIA libre, ya que el AIA-Glu mantuvo valores bajos excepto en el tratamiento C al día 14, justo en donde tuvo el mayor contenido de AIA libre. Por otro lado, el AIA-Asp tuvo una dinámica más uniforme entre los diferentes tratamientos, solo se distinguió un aumento en el día 14, muy especialmente en el tratamiento B (solo NH_4^+), en el que el aumento drástico de este conjugado podría explicar la ausencia de AIA libre.

4.2 INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN DIFERENTES RELACIONES DE $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ EN *D. carota*

Tras 11 d de cultivo, solo en dos tratamientos (relación 2:1 y 1:1) se formaron embriones somáticos, lo que apunta a una preferencia por la fuente nitrogenada oxidada durante el proceso de ES, si bien el NH_4^+ sigue siendo necesario para la morfogénesis, ya que tanto en el tratamiento donde predominó el NO_3^- como en aquel con NO_3^- como única fuente de N no se formaron embriones en el tiempo señalado.

En este caso, comparativamente con los primeros experimentos con *C. canephora*, la diferencia no solo estuvo en el número de embriones formados, sino principalmente en el tiempo que tomó la formación de embriones somáticos para cada tratamiento, ya que al pasar 20 d más los tratamientos A y D formaron embriones somáticos. Sin embargo, debido al largo tiempo que permanecieron en esas condiciones, también se pudieron observar diferencias en el desarrollo de dichos embriones. En el caso del tratamiento A, los embriones no continuaron con el desarrollo normal a germinación y presentaron tejido adherido a la parte apical de los embriones; mientras que en el tratamiento D y E se formaron plántulas pero también con un gran número de embriones más pequeños adheridos, posiblemente por ES secundaria, mientras que en el tratamiento testigo C fue el único en el que los embriones germinaron en su totalidad sin presentar ninguna alteración.

CAPÍTULO VI

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES

El proceso de ES es uno de los desarrollos fisiológicos más complejos del desarrollo vegetal y es afectado por una gran diversidad de factores. Su comprensión total aun está lejos. La fuente nitrogenada, como uno de estos factores, parece producir una respuesta tan compleja como el proceso mismo, al estar vinculada a otros elementos como RCV tales como auxinas y CK. Los resultados aquí expuestos apuntan no solo al efecto determinante del NO_3^- y el NH_4^+ , sino a su vínculo con el contenido endógeno de AIA y CK isoprénicas durante el proceso de inducción de la ES.

Para los modelos utilizados en este estudio, ambas fuentes nitrogenadas son indispensables, apuntando a que la fuente de nitrógeno oxidada es la predominante en la inducción de la respuesta embriogénica, pero no única. El efecto positivo de una combinación de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en la ES parece estar vinculado de alguna forma al contenido de CK durante los primeros días de la inducción, ya que en las diferentes combinaciones de $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ se mostraron cambios importantes en el contenido de CK en *C. canephora*.

Si bien se observó que el proceso de ES es diferente para cada especie, las similitudes en la respuesta morfológica a las relaciones $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ entre los dos modelos no descartan la posibilidad de que las CK también sean afectadas durante la ES de *D. carota*.

5.2 PERSPECTIVAS

- Averiguar cómo es que la relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ afecta el contenido endógeno de auxinas y CK en *C. canephora*.
- Analizar los contenidos de auxinas y CK durante la inducción de ES en *D. carota*.

- Evaluar si CK exógenas pueden igualar la respuesta embriogénica de la combinación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ en los tratamientos menos exitosos (una sola fuente de N).

BIBLIOGRAFÍA

Abualia R, Riegler S y Benková E. 2023. Nitrate, auxin and cytokinin - A trio to tango. *Cells* 12, 1613.

Ammirato PV y Steward FC. 1971. Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. *Botanical Gazette* 132, 149-158.

Argueso CT y Kieber JJ. 2024. Cytokinin: From autoclaved DNA to two-component signaling. *The Plant Cell*.

Asghar S, Ghori N, Hyat F, Li Y y Chen C. 2023. Use of auxin and cytokinin for somatic embryogenesis in plant: a story from competence towards completion. *Plant Growth Regulation* 99, 413-428.

Avilez-Montalvo J, Quintana-Escobar AO, Méndez-Hernández HA, Uc-Chuc MÁ, Brito-Argáez L, Aguilar-Hernández V, Galaz-Ávalos RM y Loyola-Vargas VM. 2022. Auxin-cytokinin cross talk in somatic embryogenesis of *Coffea canephora*. *Plants* 11, 2013.

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.

Boutillier K, Offringa R, Sharma VK, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C-m, Van Lammeren AAM, Miki BLA, Custers JBM y Van Lookeren-Campagne MM. 2002. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. *The Plant Cell* 14, 1737-1749.

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

Cheng S, Altmeyden G, So C, Welp LM, Penir S, Ruhwedel T, Menelaou K, Harasimov K, Stützer A, Blayney M, Elder K, Möbius W, Urlaub H y Schuh M. 2022. Mammalian oocytes store mRNAs in a mitochondria-associated membraneless compartment. *Science*, Vol. 378, eabq4835.

Cunha A y Fernandes-Ferreira M. 1999. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.). *Journal of Plant Physiology* 155, 591-597.

Dahrendorf J, Clapham D y Egertsdotter U. 2018. Analysis of nitrogen utilization capability during the proliferation and maturation phases of Norway spruce (*Picea abies* (L.) H. Karst.) somatic embryogenesis. *Forests* 9, 288.

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.

- Dougall DK y Verma DC. 1978. Growth and embryo formation in wild carrot suspension cultures with ammonium ion as a sole nitrogen source. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 14, 180-182.
- Duarte-Aké F, Monroy-González Z, Borbolla-Pérez V y Loyola-Vargas VM. 2022. The source, level, and balance of nitrogen during the somatic embryogenesis process drive cellular differentiation. *Planta* 256, 113.
- Dziewit K, Amakorová P, Novák O, Szal B y Podgórska A. 2024. Systemic strategies for cytokinin biosynthesis and catabolism in *Arabidopsis* roots and leaves under prolonged ammonium nutrition. *Plant Physiology and Biochemistry* 213, 108858.
- Elhiti M y Stasolla C. 2022. Transduction of signals during somatic embryogenesis. *Plants* 11, 178.
- Endres L, Souza BM y Mercier H. 2002. *In vitro* nitrogen nutrition and hormonal pattern in bromeliads. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38, 481-486.
- Esteban R, Ariz I, Cruz C y Moran JF. 2016. Review: Mechanisms of ammonium toxicity and the quest for tolerance. *Plant Science* 248, 92-101.
- Fehér A. 2015. Somatic embryogenesis - Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1849, 385-402.
- Fehér A, Bernula D y Gémes K. 2016. The many ways of somatic embryo initiation. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Cham: Springer International Publishing, 23-37.
- Fei H y Vessey JK. 2003. Involvement of cytokinin in the stimulation of nodulation by low concentration of ammonium in *Pisum sativum*. *Physiologia Plantarum* 118, 447-455.
- 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.
- Fujimura T. 2014. Carrot somatic embryogenesis. A dream come true? *Plant Biotechnology Reports* 8, 23-28.
- Fujimura T y Komamine A. 1975. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Science Letters* 5, 359-364.
- Fujimura T y Komamine A. 1979. Synchronization of somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Physiology* 64, 162-164.
- Fujimura T y Komamine A. 1980. The serial observation of embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *New Phytologist* 86, 213-218.
- Gamborg OL y Shyluk JP. 1970. The culture of plant cells with ammonium salts as the sole nitrogen source. *Plant Physiology* 45, 598-600.

- 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.
- Garnica M, Houdusse F, Zamarreño AM y Garcia-Mina JM. 2010. The signal effect of nitrate supply enhances active forms of cytokinins and indole acetic content and reduces abscisic acid in wheat plants grown with ammonium. Journal of Plant Physiology 167, 1264-1272.
- Gautheret RJ. 1939. Sur le repiquage des cultures de tissue cambial de *Salix capraea*. CR Acad. Sci. III-Vie 206, 125-127.
- Giuliano G, Lo Schiavo F y Terzi M. 1984. Isolation and developmental characterization of temperature-sensitive carrot cell variants. Theoretical and Applied Genetics 67, 179-183.
- Gulzar B, Mujib A, Malik MQ, Sayeed R, Mamgain J y Ejaz B. 2020. Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology 18, 31.
- Halperin W y Wetherell DF. 1965. Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*. Nature 205, 519-520.
- Hari V. 1980. Effect of cell density changes and conditioned media on carrot cell embryogenesis. Z. Pflanzenphysiol 96, 227-231.
- Hluska T, Hlusková L y Emery RJ. 2021. The hulks and the deadpools of the cytokinin universe: A dual strategy for cytokinin production, Translocation, and signal transduction. Biomolecules 11, 209.
- Horstman A, Li M, Heidmann I, Weemen M, Chen B, Muiño JM, Angenent GC y Boutilier K. 2017. The BABY BOOM transcription factor activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 network to induce somatic embryogenesis. Plant Physiology 175, 848-857.
- Jaworek P, KopeCiný D, Zalabák D, Šebela M, Kouril Š, Hluska T, Koncítíková R, Podlesáková K y Tarkowski P. 2019. Occurrence and biosynthesis of cytokinins in poplar. Planta 250, 229-244.
- Kamada-Nobusada T y Sakakibara H. 2009. Molecular basis for cytokinin biosynthesis. Phytochemistry 70, 444-449.
- Kameya T y Uchimiya H. 1972. Embryoids derived from isolated protoplasts of carrot. Planta 103, 356-360.
- Kiba T, Kudo T, Kojima M y Sakakibara H. 2011. Hormonal control of nitrogen acquisition: roles of auxin, abscisic acid, and cytokinin. Journal of Experimental Botany 62, 1399-1409.

- Kikuchi A, Sanuki N, Higashi K, Koshiba T y Kamada H. 2006. Abscisic acid and stress treatment are essential for the acquisition of embryogenic competence by carrot somatic cells. *Planta* 223, 637-645.
- Kojima M, Makita N, Miyata K, Yoshino M, Iwase A, Ohashi M, Surjana A, Kudo T, Takeda-Kamiya N, Toyooka K, Miyao A, Hirochika H, Ando T, Shomura A, Yano M, Yamamoto T, Hobo T y Sakakibara H. 2023. A cell wall-localized cytokinin/purine riboside nucleosidase is involved in apoplastic cytokinin metabolism in *Oryza sativa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120, e2217708120.
- Krikorian AD y Steward FC. 1978. Morphogenetic responses of cultured totipotent cells of carrot (*Daucus carota* var. *caroto*) at zero gravity. *Science* 200, 67-68.
- Krouk G. 2016. Hormones and nitrate: a two-way connection. *Plant Molecular Biology* 91, 599-606.
- Krouk G, Ruffel S, Gutiérrez RA, Gojon A, Crawford NM, Coruzzi GM y Lacombe B. 2011. A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends in Plant Science* 16, 178-182.
- Lee S, Park YS, Rhee JH, Chu H, Frost JM y Choi Y. 2024. Insights into plant regeneration: cellular pathways and DNA methylation dynamics. *Plant Cell Reports* 43, 120.
- Lee YJ, Hwang KS y Choi PS. 2023. Effect of carbon sources on somatic embryogenesis and cotyledon number variations in carrot (*Daucus carota* L.). *Journal of Plant Biotechnology* 50, 89-95.
- Leljak-Levanic D, Bauer N, Mihaljevic S y Jelaska S. 2004. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *Journal of Plant Physiology* 161, 229-236.
- Li L, Jia L, Duan X, Lv Y, Ye C, Ding C, Zhang Y, Qi W, Motte H, Beeckman T, Luo L y Xuan W. 2024. A nitrogen-responsive cytokinin oxidase/dehydrogenase regulates root response to high ammonium in rice. *New Phytologist* 244, 1391-1407.
- Li SM, Zheng HX, Zhang XS y Sui N. 2021. Cytokinins as central regulators during plant growth and stress response. *Plant Cell Reports* 40, 271-282.
- 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 y Ochoa-Alejo N. 2016. Somatic embryogenesis. An overview. In: Loyola-Vargas VM, Ochoa-Alejo N, eds. *Somatic Embryogenesis. Fundamental Aspects and Applications*. Switzerland: Springer, 1-10.

- Ma W, Li J, Qu B, He X, Zhao X, Li B, Fu X y Tong Y. 2014. Auxin biosynthetic gene TAR2 is involved in low nitrogen-mediated reprogramming of root architecture in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 78, 70-79.
- Márquez-López RE, Quintana-Escobar AO y Loyola-Vargas VM. 2019. Cytokinins, the Cinderella of plant growth regulators. *Phytochemistry Reviews* 18, 1387-1408.
- 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.
- Mihaljevic S, Radic S, Bauer N, Garic R, Mihaljevic B, Horvat G, Leljck-Levanic D y Jelaska S. 2011. Ammonium-related metabolic changes affect somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.). *Journal of Plant Physiology* 168, 1943-1951.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473-497.
- Nag KK y Street HE. 1973. Carrot embryogenesis from frozen cultured cell. *Nature* 245, 270-272.
- Neumann KH, Imani J y Kumar A. 2009. Phytohormones and growth regulators. In: Imani J, Kumar A, Neumann KH, eds. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application*. Berlin, Heidelberg: Springer, 227-233.
- Neumann KH y Pauler B. 1969. Untersuchungen über Beziehungen zwischen der Differenzierung und der Zusammensetzung der löslichen Proteinfraction von Gewebekulturen und Blättern von *Daucus carota*. *Planta* 87, 347-359.
- 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.
- Nobécourt P. 1938. Sur les proliférations spontanées de fragments de tubercules de carotte et leur culture sur milieu synthétique. *Bulletin de la Société Botanique de France* 85, 182-187.
- Nomura K y Komamine A. 1995. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe TA, ed. *In vitro embryogenesis in plants*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 249-265.
- O'Brien José A, Vega A, Bouguyon E, Krouk G, Gojon A, Coruzzi G y Gutiérrez Rodrigo A. 2016. Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular Plant* 9, 837-856.

- Ogita S, Sasamoto H, Yeung EC y Thorpe TA. 2001. The effects of glutamine on the maintenance of embryogenic cultures of *Cryptomeria japonica*. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37, 268-273.
- Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes JL, Garciarrubio A y Covarrubias AA. 2010. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*.
- Pasternak TP y Steinmacher D. 2024. Plant Growth Regulation in Cell and Tissue Culture In Vitro. *Plants* 13, 327.
- Pencik A, Tureková V, Paulisiç S, Rolcìk J, Strnad M y Mihaljevic S. 2015. Ammonium regulates embryogenic potential in *Cucurbita pepo* through pH-mediated changes in endogenous auxin and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 122, 89-100.
- Poitout A, Crabos A, Petrick I, Novák O, Krouk G, Lacombe B y Ruffel S. 2018. Responses to systemic nitrogen signaling in *Arabidopsis* roots involve *trans*-zeatin in shoots. *The Plant Cell* 30, 1243-1257.
- 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.
- Raghavan V. 2006. Can carrot and *Arabidopsis* serve as model systems to study the molecular biology of somatic embryogenesis? *Current Science* 90, 1336-1343.
- Rahayu YS, Walch-Liu P, Neumann G, Römheld V, von Wirén N y Bangerth F. 2005. Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃⁻ induced stimulation of leaf growth. *Journal of Experimental Botany* 56, 1143-1152.
- Ramage CM y Williams RR. 2002. Mineral nutrition and plant morphogenesis. In *Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 38, 116-124.
- Raven JA. 1986. Biochemical disposal of excess H⁺ in growing plants? *New Phytologist* 104, 175-206.
- Reinert J. 1959. Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta* 53, 318-333.
- Reinert J, Tazawa M y Semenov S. 1967. Nitrogen compounds as factors of the embryogenesis *in vitro*. *Nature* 216, 1215-1216.
- Sáenz L, Jones LH, Oropeza C, Vlácil D y Strnad M. 2003. Endogenous isoprenoid and aromatic cytokinins in different plant parts of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Growth Regulation* 39, 205-215.

-
- Sakakibara H. 2005. Cytokinin biosynthesis and regulation. In: Litwack G, ed. Vitamins & Hormones Plant Hormones: Academic Press, 271-287.
- Sakakibara H. 2006. Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annual Review of Plant Biology 57, 431-449.
- Sakakibara H. 2010. Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: Davies PJ, ed. Plant Hormones. Netherlands: Springer, 95-114.
- Sakakibara H. 2021. Cytokinin biosynthesis and transport for systemic nitrogen signaling. The Plant Journal 105, 421-430.
- Sakakibara H. 2024. Five unaddressed questions about cytokinin biosynthesis. Journal of Experimental Botany 76, 1941-1949.
- Sakakibara H, Takei K y Hirose N. 2006. Interactions between nitrogen and cytokinin in the regulation of metabolism and development. Trends in Plant Science 11, 440-448.
- Sertel S, Fu Y, Zu Y, Rebacz B, Konkimalla B, Plinkert PK, Krämer A, Gertsch J y Efferth T. 2011. Molecular docking and pharmacogenomics of Vinca alkaloids and their monomeric precursors, vindoline and catharanthine. Biochemical Pharmacology.
- Skoog F y Armstrong DJ. 1970. Cytokinins. Annual Review of Plant Physiology 21, 359-384.
- Steward FC, Mapes MO y Smith J. 1958. Growth and organized development of cultured cells. I. Growth and division of freely suspended cells. American Journal of Botany 45, 693-703.
- Tazawa M y Reinert J. 1969. Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. Protoplasma 68, 157-173.
- Trewavas AJ. 1983. Plant growth substances - metabolic flywheels for plant development. Cell Biology International Reports 7, 569-575.
- 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.
- Vega A, O'Brien JA y Gutiérrez RA. 2019. Nitrate and hormonal signaling crosstalk for plant growth and development. Current Opinion in Plant Biology 52, 155-163.
- Von Arnold S, Sabala I, Bozhkov P, Dyachok J y Filonova L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 69, 233-249.
- Wetherell DF y Dougall DK. 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiologia Plantarum 37, 97-103.

Wójcik AM, Wójcikowska B y Gaj MD. 2020. Current perspectives on the auxin-mediated genetic network that controls the induction of somatic embryogenesis in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 21, 1333.

Wu B, Meng J, Liu H, Mao D, Yin H, Zhang Z, Zhou X, Zhang B, Sherif A, Liu H, Li X, Xiao J, Yan W, Wang L, Li X, Chen W, Xie W, Yin P, Zhang Q y Xing Y. 2023. Suppressing a phosphohydrolase of cytokinin nucleotide enhances grain yield in rice. *Nature Genetics* 55, 1381-1389.

Yang X y Zhang X. 2010. Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29, 36-57.

Yaseen M, Ahmad T, Sablok G, Standardi A y Hafiz IA. 2013. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Reports* 40, 2837-2849.

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.

Zhang H, Lin X, Han Z, Wang J, Qu L-J y Chai J. 2016. SERK Family Receptor-like Kinases Function as Co-receptors with PXY for Plant Vascular Development. *Molecular Plant* 9, 1406-1414.

Anexo 1. Tabla de recursos.

Equipo	Compañía	Modelo
Agitador Vortex	Scientific Industries	Vortez Genie 2
Balanza	AND	HR-60
Centrífuga	Thermo Scientific	Sorvall ST16R
Conductímetro	Hanna HI Series	HI 8733
Espectrofotómetro	Halo	Halo XB-10
Estereoscopio	Nikon	SMZ 745T
HPLC	Thermo Scientific	Ultimate 3000
Liofilizadora	Labconco	FreeZone 4.5
Microscopio óptico	Zeiken	
Parrilla de agitación y calentamiento	Corning	PC-620D
Potenciómetro	Hanna Instruments	pH 210
Speedvac	Labconco	CentriVap micro IR
Termociclador	Techne	5 Prime
Ultracongelador	Thermo Scientific	8922
Reactivo	Marca	Identificador
2,6-di-ter-butil-4-metilfenol, 99% (C ₁₅ H ₂₄ O)	Agros Organics	
Acetato de etilo (C ₄ H ₈ O ₂)	MERCK	506188N
Acetonitrilo HPLC (CH ₃ CN)	MEYER	75-05-8
Ácido acético HPLC (CH ₃ COOH)	TEDIA (High Purity Solvents)	AS1102-002

Ácido bórico H_3BO_3	Sigma-Aldrich	B6768
Ácido diclorofenoxiacético (2,4-D)	Sigma-Aldrich	D6679
Ácido fórmico (HCOOH)	Sigma - Aldrich	#STBH6997
Ácido nicotínico ($C_6H_5NO_2$)		
Agua HPLC (H_2O)	J.T.Baker	4218-03
Azul de Evans	Sigma-Aldrich	E21129
Cisteína ($C_3H_7NO_2S$)	Sigma-Aldrich	C121800
Cloruro de amonio NH_4Cl	Sigma-Aldrich	A9434
Cloruro de calcio dihidratado ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)	Sigma-Aldrich	C8106
Cloruro de potasio KCl	Jalmek	P4825
Fosfato monopotásico KH_2PO_4	Sigma-Aldrich	P-0662
Gellan Gum	PhytoTechnology Laboratories	G434
Hidróxido de amonio (NH_4OH)	BAKER ANALYZED	9721-03
Kinetina ($C_{10}H_9N_5O$)	Sigma-Aldrich	K0763
Metanol ACS(CH_3OH)	Fermont	67-56-1
Molibdato de sodio dihidratado $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich	M1651
Murashige y Skoog (medio MS)	PhytoTech	M524
Myo-inositol ($C_6H_{12}O_6$)	Sigma-Aldrich	I5125
N6-benciladenina (BA, $C_{12}H_{11}N_5$)	Phyto Technology Laboratories	B800
Nitrato de amonio NH_4NO_3	Sigma-Aldrich	A-9642

Nitrato de potasio KNO ₃	Fermont	41842
Sacarosa grado II (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Sigma-Aldrich	S-5391
Sal disódica- Dihidratada (Na ₂ EDTA · 2H ₂ O)	J.T. Baker	8993-01 (CAS6381-92-6)
Sal potásica del ácido 1-naftalenacético (C ₁₂ H ₉ KO ₂)	Sigma-Aldrich	N1145
Sulfato de cobre pentahidratado (CuSO ₄ · 5H ₂ O)	J. T. Baker	1843
Sulfato de magnesio heptahidratado (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	J. T. Baker	2500-01
Sulfato de manganeso heptahidratado (MnSO ₄ · 7H ₂ O)		
Sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO ₄ · 7H ₂ O)	Sigma-Aldrich	Z-0501
Sulfato ferroso heptahidratado (FeSO ₄ · 7H ₂ O)	Sigma-Aldrich	F-7002
Trióxido de cromo	Merck	
Materiales		
Columnas de extracción	OASIS MCX	186000252
Filtros de 40 µm y 100 µm		
Unidad de filtro accionada por jeringa HPLC	MILLEX-GN	SLGNX13NK
Modelos experimentales		
<i>Coffea canephora</i>		
<i>Daucus carota</i>		
Software		

Origin Pro 2021		
-----------------	--	--