

**DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE  
PLANTAS**

**ESTUDIO DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA  
EN *Coffea arabica***

**Tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias  
presenta:**

**Francisco Roberto Quiroz Figueroa**



**Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C.**

**Mérida, Yucatán, México**

**2003**



De las cosas que tienen verdadera importancia en nuestra propia existencia, apenas nos damos cuenta, y ciertamente no debería inquietar al prójimo. ¿Qué sabe un pez del agua en que nada durante toda su vida?

Lo amargo y lo dulce viene del exterior, lo duro de dentro, de nuestro propio esfuerzo. La mayor parte de las veces, hago lo que mi propia naturaleza me lleva a hacer. Da rubor ganar por ello tanto respeto y tanto amor. Flechas de odio, también se han disparado contra mí; mas nunca me alcanzaron porque, en cierto modo, pertenecían a otro mundo con el cual no tengo conexión alguna.

Vivo en esa soledad que es penosa en la juventud, pero deliciosa en los años de madurez.

**Albert Einsten**

**- De mi vida y pensamiento -**

La vida no es la que uno vivió, sino la que uno recuerda y cómo la recuerda para contarla.

**Gabriel García Márquez**

**- Vivir para contarla -**



## **Reconocimientos**

**Este trabajo se realizó en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A. C., bajo la dirección del Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas y fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (4123P-N y 31816-N) con una beca de Doctorado (116916) para Francisco Roberto Quiroz Figueroa.**



## **Agradecimientos**

La vida es como una travesía por tren, durante este viaje uno conoce a muchas pasajeros en los diferentes vagones. Con algunos de ellos entramos a un mundo espiritual al compartir su amistad, amor, alegría, paciencia, bondad, amabilidad, humildad y conocimientos. A estas personas deseo expresarles mis más sinceros agradecimientos.

Al Víctor M. Loyola Vargas por permitirme ser parte del grupo de café.

A mis amigos de vagón, Rafael Rojas Herrera y Felipe Sánchez Téyer, los cuales aportaron ideas muy interesantes durante mi formación o deformación, a Marcela Méndez Zeel por su paciencia y bondad para transmitirme sus conocimientos sobre el CTV. A Miriam Monforte Gonzalez y Rosy Galaz Ávalos por su valiosa ayuda en el laboratorio.

A los amigos que se encuentren en otros vagones, Sandra C. Kú y José Luis por permitirme compartir un parte de mis inquietudes.

A mi amigo Felipe Medina que fue llamado en alguna estación, donde quiera que se encuentre su alma, gracias por tu apoyo.

A mis amigos Blondy e Ignacio por sus consejos, ayuda y confianza durantes mis primeros años en CICY.

A mi comité tutorial compuesto por los Drs. Neftalí Ochoa, Enrique Sauri Duch, Enrique Castaño de la Serna, Teresa Hernández Sotomayor, Nancy Santana Buzzy y en especial a la Dra. María de Lourdes Miranda Ham, por sus consejos para la elaboración de mi tesis.

Un reconocimiento muy especial a los chicos de biblioteca, Sergio y Miriam por el apoyo en la búsqueda de información.





## ABREVIATURAS

<b>2,4-D:</b>	ácido 2,4 dicloro fenoxiacético
<b>AFLP:</b>	polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados.
<b>AGP:</b>	arabinogalactoproteína
<b>ASA:</b>	ácido acetilsalicílico
<b>BA:</b>	6-bencilaminopurina
<b>DD:</b>	despliegue diferencial de genes
<b>DTT:</b>	1,4 ditioneitol
<b>EC:</b>	agregado embriogénico
<b>ES o SE:</b>	embriogénesis somática
<b>ESD:</b>	embriogénesis somática directa
<b>ESI:</b>	embriogénesis somática indirecta
<b>JIM 4:</b>	anticuerpo monoclonal que reconoce un epítoto que contiene gluco-arabinosa.
<b>JIM 8:</b>	anticuerpo monoclonal que reconoce un epítoto que contiene ramnosa.
<b>kDa:</b>	kilodaltones
<b>Kin:</b>	cinetina
<b>MS:</b>	Murashige y Skoog
<b>NAA:</b>	ácido $\alpha$ -naftalenacético
<b>NEC:</b>	agregado no-embriogénico
<b>pI:</b>	punto isoeléctrico
<b>PMSF:</b>	fluoruro de fenilmetil sulfonilo
<b>PSK:</b>	fitosulfocina
<b>SA:</b>	ácido salicílico
<b>SDS-PAGE:</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturizantes
<b>2D-PAGE:</b>	electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones
<b>SERK:</b>	receptor tipo cinasa de embriogénesis somática



## CONTENIDO

	Página
<b>RESUMEN</b>	1
<b>ABSTRACT</b>	3
<b>INTRODUCCIÓN</b>	5
<b>CAPÍTULO I</b>	
Embriogénesis somática	13
Embriogénesis somática	13
Aspecto morfológico del tejido y la capacidad embriogénica	13
Características estructurales de las células embriogénicas y	
Patrón de desarrollo del embrión somático	17
Embriogénesis somática directa e indirecta	17
Origen uni- o multicelular del embrión somático	18
Características estructurales de las células embriogénicas	19
Estadios de desarrollo del embrión somático	21
Compuestos excretados por los cultivos de tejidos vegetales	23
Compuestos extracelulares de baja masa molecular	24
Proteínas extracelulares	25
Compuestos exógenos	28
Justificación	30
Objetivos	31
Diseño experimental	32
Bibliografía	33
<b>CAPÍTULO II</b>	
Differential gene expression between embryogenic and non-embryogenic clusters in cell suspension cultures of <i>Coffea arabica</i> L.	45
<b>CAPÍTULO III</b>	
Histological studies on the developmental stages and differentiation of somatic embryogenesis systems of <i>Coffea arabica</i> L.	55
<b>CAPÍTULO IV</b>	
Patrón protéico extracelular durante la embriogénesis somática en suspensiones celulares de <i>Coffea arabica</i> L.	69
<b>CAPÍTULO V</b>	
Picomolar concentrations of salicylates induce cellular growth and enhance somatic embryogenesis in <i>Coffea arabica</i> tissue culture	87
<b>CAPÍTULO VI</b>	
Discusión general y perspectivas	101



## RESUMEN

La embriogénesis somática es el proceso por el cual las células somáticas son inducidas a generar células embriogénicas, las cuales pasan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que resultan en la formación de un embrión. El desarrollo del embrión somático se asemeja al del cigótico. Sin embargo, en muchos casos las conclusiones obtenidas a partir de una especie no pueden ser aplicadas a otra.

El café es una planta de importancia agrícola. Se han reportado varios sistemas para la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea* spp. Actualmente, poco se sabe acerca de los aspectos bioquímicos y moleculares de la inducción de la embriogénesis somática y el crecimiento celular en este género. El propósito de este trabajo es sentar las bases para estudios posteriores y contribuir al conocimiento de los mecanismos básicos que conlleven a un mejor entendimiento del proceso de la embriogénesis somática en *Coffea arabica* L.

Durante la inducción de la embriogénesis somática indirecta en cultivos en medio líquido de *C. arabica*, se observó la presencia de dos tipos de agregados celulares, embriogénico (EC) y no embriogénico (NEC), que crecieron bajo las mismas condiciones. El EC presentó fenolización y los embriones emergieron a partir de éste, mientras que el NEC emergió del EC, con una coloración cremosa, pero sin capacidad para producir embriones (capítulo II). Las observaciones morfohistológicas indican una correlación entre las características celulares del agregado y la capacidad embriogénica. Esta capacidad no fue atribuida a una variación en el ADN determinada por la técnica de AFLP. Las diferencias se encontraron al nivel de la expresión de genes, utilizando la técnica de despliegue diferencial y electroforesis en geles de poliacrilamida. Estos resultados sugieren que la expresión genética puede modular la capacidad embriogénica de las células de *C. arabica* y que el número de genes que se apagan para permitir el cambio del estadio somático al embriogénico es mayor que el de aquellos genes que se encienden.

Durante la caracterización de la ontogenia del embrión somático (capítulo III), se pudo registrar que las divisiones iniciales para la formación del embrión se dieron

durante la primera semana de inducción. Se reconocieron seis estadios del desarrollo: globular, oblongo, corazón, alargado, torpedo y cotiledonar. Cortes histológicos de los embriones revelaron por vez primera la formación de un procambium bien definido en el estadio de tipo globular. Nuestras observaciones indican que la embriogénesis somática indirecta de *C. arabica* tiene un origen unicelular.

Se ha reportado que diversos factores modifican la respuesta embriogénica; entre éstos, se encuentran las proteínas presentes en el medio condicionado (medio de cultivo libre de células en el que previamente se han cultivado células). Los cultivos embriogénicos de *C. arabica* excretan proteínas al medio de cultivo durante las condiciones de propagación e inducción de la embriogénesis (capítulo IV). Los perfiles electroforéticos obtenidos mediante la técnica de SDS-PAGE y electroenfoque mostraron gran similitud en ambas condiciones, con excepción de una proteína de 27 kDa y otra con un pI de 5.7 detectadas exclusivamente en la condición embriogénica. En contraste, el análisis en 2D-PAGE puso de manifiesto una proteína asociada a la condición de embriogénesis con una masa de 27 kDa, pero con un pI entre 9.4-9.7. Una posibilidad es que tal proteína (27) coemigre junto con las proteínas básicas (9.4-9.7).

Un requisito para la expresión de la capacidad embriogénica en la línea celular de *C. arabica* empleada, es la presencia de un tejido con aspecto fenolizado. La coloración de los agregados embriogénicos podría deberse a la presencia de quinonas, que son producto de la oxidación de compuestos fenólicos. Las quinonas son conocidas por ser tóxicas para el crecimiento celular, como es el caso para el cultivo *in vitro* de *C. arabica*; esto ocasiona que la línea embriogénica presente velocidades de propagación muy bajas. Al evaluar la adición del ácido salicílico (SA) sobre el crecimiento y la producción de embriones somáticos (capítulo V), se observó que concentraciones del orden picomolar de SA tuvieron un efecto positivo sobre el crecimiento celular, la producción de embriones somáticos y su sincronización. El efecto promotor podría ser debido, ya sea al incremento en el número de células competentes o a la inhibición de la biosíntesis de etileno.

## ABSTRACT

Somatic embryogenesis is the process by which induced somatic cells generate embryogenic cells, which go through a series of morphological and biochemical changes that end up in the formation of an embryo. The development of somatic embryos closely resembles that of zygotic embryos. However, in many cases the conclusions obtained from one species can not be applied to another.

Coffee plants are a tropical crop of great economic importance. Several systems have been reported for somatic embryogenesis induction in coffee. However, little information is available about the biochemical and molecular aspects of somatic embryogenesis and cellular growth in that genus. The aim of this work is to contribute to the knowledge of the basic mechanisms that lead to a better understanding of the factors that drive the process of somatic embryogenesis, using *Coffea arabica* L. tissue culture as a model.

During the induction of indirect somatic embryogenesis (chapter II), two clusters, embryogenic (EC) and non-embryogenic (NEC), growing under the same conditions were observed. EC were brown and embryos emerged from it, whereas, NEC emerged from EC, being a pale-yellow and did not give rise somatic embryos. Our histological observations indicated a correlation between cell types and the embryogenic potential of clusters. This potential was not due to differences at the DNA level between EC and NEC observed by AFLP analysis. However, differences were observed at the gene expression level by RNA differential display and SDS-PAGE. Our results led us to propose that differential gene expression can modulate the embryogenic potential of coffee cells and that the number of genes turned off in somatic cells is higher than those genes that are turned on during the embryogenesis process.

Histological analysis (chapter III) revealed that the embryogenic cells can be observed during the first week of induction. During the embryogenesis, six clear developmental stages were recognized: globular-, oblong-, heart-, elongated, torpedo-, and cotyledonary shaped. Cross sections of somatic embryos showed that a well-defined procambium was observed in the globular-stage embryos. Our

histological observations indicate that somatic embryos of *C. arabica* have a unicellular origin.

Several factors have been reported that play a role in somatic embryogenesis. One such factor involves proteins secreted into the culture medium. During growth and embryogenesis induction of *Coffea arabica* tissue cultures, proteins were detected in the conditioned medium and their concentration increased along the period of culture (chapter IV). Protein patterns were analyzed by SDS-PAGE and isoelectric focusing (pH 3.5-9). Almost the same pattern was found for both growth and embryogenic conditions with the exception of one protein of 27 kDa and pI 5.7 that was exclusive of the embryogenic condition. However, when extracellular proteins were separated by 2D electrophoresis, one spot was exclusive for embryogenic condition, but that protein had a 27 kDa and pI 9.4-9.7. A possibility is that such protein (27) coemigrated together with basic proteins (9.4-9.7).

Browning of the tissue caused by a possible accumulation of phenolic compounds is necessary for the somatic embryogenesis process to take place in *Coffea arabica*. The brown color in clusters is typically due to the formation of quinones that are oxidized phenols. Quinones are well known to be toxic for plant cellular growth as is the case of the *C. arabica* cell line. The effect of salicylic acid (SA) on growth and somatic embryos production was studied (chapter V). The use of picomolar levels of SA had a positive effect on cellular growth, synchronization and somatic embryos production. The effect could be a consequence of a greater number of competent cells or to inhibition of ethylene production.



## INTRODUCCIÓN

El ciclo de vida de las plantas floríferas puede ser dividido en dos generaciones: la generación haploide o gametofítica y la diploide o esporofítica (Goldberg et al. 1994). La generación diploide inicia con un evento de doble fertilización. Brevemente, durante la polinización, el tubo polínico penetra al saco embrionario a través del micrófilo y libera las unidades espermáticas. Una unidad espermática se fusionará con la célula huevo para dar origen al cigoto e iniciar el proceso de embriogénesis que luego formará una planta. La otra unidad espermática se fusionará con la célula central para producir el tejido de reserva, el endospermo, que proporcionará nutrimentos y otros compuestos necesarios para el desarrollo del embrión y/o su geminación (Russell 1992; West y Harada 1993; Berger 1999).

En las plantas floríferas, el desarrollo del embrión cigótico puede conceptualmente ser dividido en dos etapas (Harada 2001): la morfogenética, en la que la estructura básica de la planta es establecida y la segunda fase, o de maduración, es cuando la actividad bioquímica permite preparar al embrión para entrar a un estadio de quiescencia metabólica, el cual germinará hasta que las condiciones de su entorno sean las adecuadas. Durante la etapa morfogenética, el embrión cigótico puede ser subdividido en cuatro estadios secuenciales generales con cambios morfológicos característicos, que son: globular, corazón, torpedo y cotiledonar (Lindsey y Topping 1993; Raghavan 2000). Una dificultad en el estudio de los procesos que gobiernan la inducción y el desarrollo del embrión cigótico es su localización dentro de la semilla ocasionando una inaccesibilidad relativa a la manipulación experimental, particularmente durante las etapas temprana de la embriogénesis (Goldberg et al., 1994).

El proceso de la embriogénesis puede ser recapitulado sin la fusión de los gametos. El origen de estos embriones asexuales es diverso; por ejemplo, el embrión apomíctico deriva de la célula huevo sin fertilizar o del tejido materno (Nogler 1984), también, es posible inducir embriones *in vitro* a partir de microsporas (granos de polen inmaduro) o de granos de polen, lo que se conoce como embriones

androgénicos (Raghavan 2000), a diferencia de los embriones somáticos que tienen su origen a partir de células somáticas (Street 1976; Ammirato 1983; Bhojwani y Razdan 1983; Zimmerman 1993; Raghavan 2000).

El hecho de que los embriones somáticos se puedan desarrollar *in vitro* a partir de células somáticas demuestra que el programa genético para la embriogénesis está totalmente contenido en ellas y que éste puede "funcionar" completamente en ausencia de los productos de los genes maternos (Zimmerman 1993). La embriogénesis somática tiene un enorme potencial para la propagación de especies de importancia económica; por ello, el conocimiento generado a partir de los estudios básicos que conlleven a un mejor entendimiento de los procesos fundamentales del fenómeno de la embriogénesis será de gran utilidad para su posible aplicación biotecnológica.

El género *Coffea* incluye por lo menos 70 especies, de las que resaltan por su valor comercial en grano para la bebida estimulante: *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. El café es uno de los productos más importantes en el mercado internacional, su cultivo se encuentra limitado a las zonas tropicales del mundo; a los países productores les aporta una fuente importante de divisas. México ocupa el quinto lugar en el ámbito mundial como productor de café, las especies que principalmente se producen son la "arabica" en un 97% y un 3% de "canephora" ([www.fonaes.gob.mx](http://www.fonaes.gob.mx)).

Se han reportado para el género *Coffea* varios protocolos de embriogénesis somática. El primero fue realizado para *Coffea canephora* por Staritsky (1970), usando como explante internodos. Herman y Haas (1975) lo realizaron para *Coffea arabica* a partir de explantes foliares. Söndahl y Sharp (1977; 1979) desarrollaron un sistema experimental de dos fases para la inducción de embriones a partir de hojas de *C. arabica*. A principios de los ochentas, Dublin (1981) reportó embriones somáticos utilizando explantes foliares en un medio suplementado con citocininas. Yasuda et al. (1985) indujeron la formación de embriones en explantes foliares de *C. arabica* usando BA. Desde entonces, se han reportado otros sistemas basándose en

las formulaciones de los medios de cultivo de los autores anteriormente mencionados.

La ES en café es muy diferente en comparación con otras especies. Por ejemplo, en *Daucus carota*, el proceso toma solo unos días (Krikorian y Smith 1991), mientras que los mejores resultados en café son obtenidos después de varias semanas (Rojas-Herrera 2002).

La embriogénesis somática es la alternativa más eficiente para la propagación masiva de plantas. Las ventajas del proceso, como son el control de las condiciones de cultivo, la facilidad observacional del proceso, la disponibilidad del tejido y los altos rendimientos en la producción de embriones hacen de la embriogénesis somática un sistema ideal para realizar estudios a nivel morfohistológico, fisiológico, bioquímico y molecular. Un porcentaje elevado de los estudios que se han realizado hasta la fecha sobre la embriogénesis somática se ha llevado a cabo en *D. carota* por la facilidad técnica en la inducción. Los datos de la literatura indican que existen diferencias significativas entre especies y en muchos casos, los resultados que se obtienen no pueden ser aplicados a otras especies e inclusive entre variedades. Por lo que es recomendable realizar estudios en la especie de interés.

En la presente tesis, el objetivo principal fue contribuir al entendimiento de los aspectos morfo-histológico, bioquímico y molecular durante la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*. Para esto, se utilizó una línea celular embriogénica en medio líquido obtenida a partir de callos embriogénicos provenientes de explantes foliares.

En el Capítulo I se presenta una revisión bibliográfica con especial atención sobre los aspectos morfo-histológicos del desarrollo de los embriones somáticos, la posible función de los compuestos excretados por los cultivos *in vitro* durante la inducción de la ES, y el efecto de la aplicación exógena de algunos compuestos sobre la respuesta embriogénica. Aunque la información disponible es muy variada, se vislumbra una posible intersección entre la ruta de la embriogénesis somática y los mecanismos de defensa a condiciones ambientales adversas.

El propósito inicial de la investigación presentada en el Capítulo II fue el establecimiento de una línea celular en medio líquido con capacidad embriogénica. Durante la inducción de la embriogénesis se observó la presencia de dos tipos de agregados celulares que presentaron diferencias en coloración y su capacidad embriogénica. Por ello, se analizaron las posibles diferencias existentes a nivel morfohistológico, molecular y bioquímico entre los agregados embriogénicos y no embriogénicos. El estudio histológico indicó una correlación entre el tipo celular observado y la capacidad embriogénica en el agregado. El análisis, empleando la técnica de AFLP's, indicó que la diferencia en la capacidad embriogénica no se debe a variaciones a nivel del ADN. Esta diferencia residió en la expresión diferencial de los genes, ya que usando la técnica del despliegue diferencial (DD) se observó que un mayor porcentaje de genes se apagan cuando la respuesta embriogénica es inducida en ambos agregados, siendo mayor el número de los genes que se encuentran regulados en los agregados embriogénicos en comparación de los no embriogénicos. Cuando se analizaron los perfiles proteicos intracelulares por electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE), se encontraron similitudes, con excepción de la presencia de proteínas agregado-específicas. Dos proteínas de 13.3 y 32 kDa en el agregado embriogénico y otras dos de 100 y 130 kDa en el agregados no embriogénico. Los resultados indicaron que la diferencia en el programa genético moduló la respuesta embriogénica y el tipo celular en los agregados.

En el Capítulo III se reportó un estudio sobre la ontogenia del embrión somático desde los aspectos micro- y macroscópico usando técnicas histológicas. El desarrollo del embrión fue observado a partir de la célula embriogénica hasta los estadios tardíos del proceso. Se reconocieron por primera vez para *C. arabica* seis estadios de desarrollo: globular, oblongo, corazón, alargado, torpedo y cotiledonar. Un procambium bien definido fue visto por primera vez en el estadio de tipo globular. Las observaciones realizadas indicaron que el proceso de formación del embrión siguió una ruta de origen unicelular, lo cual constituye el primer reporte de un estudio detallado de la ontogénia del embrión somático.

La investigación presentada en el Capítulo IV, consistió del análisis de los perfiles proteicos extracelulares de los cultivos embriogénicos en medio líquido, mediante técnicas electroforéticas en geles de poliacrilamida. Los patrones protéicos obtenidos por SDS-PAGE y electroenfoque mostraron gran similitud, con excepción de una proteína de 27 kDa y otra con un pI de 5.7, respectivamente, detectadas exclusivamente en la condición embriogénica. En contraste, en el análisis en 2D-PAGE se puso de manifiesto una proteína asociada a la condición de embriogénesis con una masa de 27 kDa, pero con un pI entre 9.4-9.7. Una posibilidad es que tal proteína esté coemigrando junto con otras proteínas básicas, enmascarando así su detección.

En el Capítulo V se reporta la evaluación del efecto de un compuesto de tipo fenólico; el ácido salicílico (SA), en la capacidad de crecimiento e inducción de la embriogénesis somática, ya que una condición para la expresión de la capacidad embriogénica en los agregados celulares en *C. arabica* es la presencia de un tejido con aspecto fenolizado. La adición de SA en concentraciones picomolares incrementó el crecimiento celular, la producción de embriones somáticos y su sincronización. El crecimiento celular fue estimulado en aproximadamente el 70 % con respecto al testigo y fue dependiente de la dosis de SA. En general, se observó que altas concentraciones de SA no tuvieron un efecto significativo en el crecimiento. Por otro lado, cuando las suspensiones celulares son propagadas en medio de cultivo suplementado con  $10^{-12}$  M de SA y posteriormente transferidas a un medio de inducción de la embriogénesis sin SA, los agregados produjeron un mayor número de embriones somáticos en comparación con cultivos testigo. Es importante hacer notar el hallazgo de que concentraciones tan bajas de un compuesto tenga la capacidad de modular un proceso fisiológico, lo cual apoyaría su función como una señal morforregulatoria.

Finalmente, en el Capítulo VI, se presenta una discusión general de los resultados obtenidos en la presente tesis, las posibles áreas que pueden abordarse para estudios posteriores y su posible interrelación.

## Bibliografía

- Ammirato P. V. (1983) Embryogenesis, in: Handbook of Plant Cell Culture., Vol. I. Techniques for Propagation and Breeding, (Evans D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada, eds.), Macmillan, New York, 82-123.
- Berger F. (1999) Endosperm development. Curr. Opin. Plant. Biol., 2: 28-32.
- Bhojwani S. S., M. K. Razdan (1983) Somatic embryogenesis, in: Plant Tissue Culture: Theory and Practice, (Bhojwani S. S., M. K. Razdan, eds.), Elsevier, Amsterdam, 91-112.
- Dublin P. (1981) Embryogènèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. Café Cacao Thé, 25: 237-242.
- Goldberg R. B., G. De Paiva, R. Yadegari (1994) Plant embryogenesis: zygote to seed. Science, 266: 605-614.
- Harada J. J. (2001) Role of Arabidopsis *Leafy cotyledon* genes in seed development. J. Plant Physiol., 158: 405-409.
- Herman E. B., G. J. Haas (1975) Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. HortScience, 10: 588-589.
- Krikorian A. D. , D. L. Smith (1991) Somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota*), in: Plant Tissue Culture Manual. Supplement 3, (Lindsey K., ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1-32.
- Lindsey K., J. F. Topping (1993) Embryogenesis: A question of pattern. J. Exp. Bot., 44: 359-374.
- Nogler G. A. (1984) Gametophytic apomixis, in: Embryology of Angiosperms, (Johri B. M., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 475-518.
- Raghavan V. (2000) Embryogenic development of somatic cells and pollen grains, in: Developmental Biology of Flowering Plants, Springer-Verlag, New York, 309-322.
- Rojas-Herrera, R., 2002 Estudios moleculares durante la embriogénesis somática en *Coffea arabica*, PhD, Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México, 1-78.
- Russell S. D. (1992) Double fertilization. Int. Rev. Cytology, 140: 357-388.

- Söndahl M. R., W. R. Sharp (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol., 81: 395-408.
- Söndahl M. R., D. Spahlinger, W. R. Sharp (1979) A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol., 94: 101-108.
- Staritsky G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Neod., 19: 509-514.
- Street H. E. (1976) Experimental embryogenesis -the totipotency of cultured plant cells, in: The Developmental Biology of Plants and Animals, (Graham C. F. and P. F. Wareing, eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73-91.
- West M. A. L., J. J. Harada (1993) Embryogenesis in higher plants: An overview. Plant Cell, 5: 1361-1369.
- Yasuda T., Y. Fujii, T. Yamaguchi (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. Plant Cell Physiol., 26: 595-597.
- Zimmerman J. L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. Plant Cell, 5: 1411-1423.





## CAPÍTULO I

### EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

F. R. Quiroz-Figueroa y V. M. Loyola-Vargas

Este capítulo está en preparación para ser sometido a publicación

#### **Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática (ES) es el proceso por el cual las células somáticas son inducidas a generar células embriogénicas, las cuales pasan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que resultan en la formación de un embrión. La habilidad para producir embriones morfológicamente bien formados y desarrollarse en una planta a partir de células somáticas en cultivo sin organización reside hasta este momento únicamente dentro del reino vegetal. A diferencia de los embriones cigóticos, los somáticos pueden ser observados fácilmente, las condiciones del cultivo pueden ser controladas y se pueden obtener en grandes cantidades (Kawahara y Komamine 1995). Por lo anterior, la embriogénesis somática puede servir como un sistema modelo y como una fuente de material para estudios en los niveles morfológico y molecular de los eventos que ocurren durante el proceso de inducción de la embriogénesis en plantas superiores.

#### **Aspecto morfológico del tejido y la capacidad embriogénica**

La totipotencialidad celular es un importante atributo de las células vegetales, sin embargo no todas ellas tienen la capacidad de manifestar esta característica al mismo tiempo bajo una condición determinada. Si se asume que todas las células son totipotentes, el número de embriones formados es pequeño en comparación con el número total de células en el agregado. La capacidad para generar embriones somáticos en un tejido cultivado *in vitro* es a menudo una característica confinada, ya sea a una porción limitada de la población celular o a una zona discreta en el agregado.

Con respecto al primer caso, Nomura y Komamine (1985), utilizando células individuales provenientes de suspensiones de *Daucus carota* obtenidas por tamizado y centrifugación en gradientes de densidad e induciéndolas hacia la embriogénesis, encontraron que la respuesta embriogénica se presentó en células con aspecto esférico (85-90%) y ovalado (<10%), mientras que en aquellas con apariencia alargada no produjeron embriones, sugiriendo una correlación entre el tipo celular y la capacidad embriogénica. Por el contrario, Toonen et al. (1994) utilizando la misma especie vegetal, al igual que células individuales, clasificaron cinco grupos celulares con base en su morfología y en todos observaron la formación de embriones somáticos, lo que les permitió concluir que la capacidad individual de las células para formar embriones no está restringida a un tipo celular particular distinguible con base en su aspecto morfológico. La discrepancia observada en los dos estudios anteriores podría deberse a que cada tipo celular requiere un tiempo determinado de exposición a la auxina para que su nivel endógeno pueda variar y este tiempo dependerá del estadio fisiológico de cada célula. Otro factor involucrado en la inducción de la embriogénesis somática es el uso de diferentes reguladores del crecimiento, ya que el grupo del Dr. Atsushi Komamine utilizó el par 2,4-D/zeatina (Nomura y Komamine 1985), mientras que el grupo del Dr. Sacco de Vries usó únicamente 2,4-D (Toonen et al. 1994), lo que podría hacer la diferencia en la activación de las rutas para inducirla, así como que la manifestación de la capacidad embriogénica en los tipos celulares se encuentra ligada al tipo de compuesto utilizado. Otro factor podría ser el uso de diferentes cultivares, que daría lugar a respuestas diferentes a un mismo estímulo.

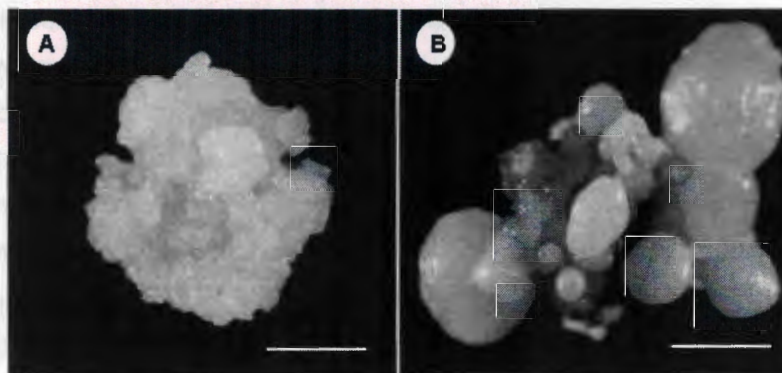
Por otro lado, en referencia al segundo caso mencionado, Nabors et al. (1983) utilizando cinco especies de gramíneas, notaron que los callos embriogénicos pueden distinguirse visualmente de los no embriogénicos. En todas las especies, los callos embriogénicos presentaron un aspecto nodular con una superficie lisa, mientras que los no embriogénicos exhibieron un aspecto rugoso, friable, de coloración translúcida. Características similares fueron observadas en callos embriogénicos y no embriogénicos de *D. carota* (Jiménez y Bangerth 2001a).

El criterio de coloración para la selección de un tejido con capacidad embriogénica ha sido también aplicado exitosamente en cultivos *in vitro* de *Picea abies* (Hakman et al. 1985), *Oryza sativa* (Oinam y Kothari 1995), y *Pisum sativum* (Stirn y Jacobsen 1987). Otra especie de importancia económica en la cual se han detectado diferencias entre el tejido embriogénico y el no embriogénico es *Coffea arabica* (Menéndez-Yuffá y de Garcia 1997): los agregados embriogénicos presentaron un aspecto fenolizado y una estructura rígida, mientras que los no embriogénicos presentaron una coloración blanquizca y textura friable (Figura 1.1).

Se tienen antecedentes acerca de que no todas las células en los agregados embriogénicos presentan la capacidad de formar embriones. Tsukahara y Komamine (1997), utilizando marcaje radiactivo, demostraron que existe síntesis polarizada de ADN en ciertas zonas del agregado y que son estas zonas las que se dividen y forman embriones somáticos. Ibaraki et al. (2000), utilizando un sistema de inmovilización de los agregados embriogénicos, clasificaron las células en dos tipos, con base en el número de embriones producidos. En el agregado de tipo 1 sólo se produce un embrión, observándose dos zonas, una que presentó crecimiento celular que daba lugar al embrión, mientras que en la otra no se observó crecimiento celular ni formación de embriones. La síntesis polarizada del ADN observada por Tsukahara y Komamine (1997) podría explicarse con base en que estos agregados fueron del tipo 1. La presencia de células no-embriogénicas en el agregado embriogénico podrían funcionar como nodrizas, proporcionando el estímulo para inducir o activar el programa embriogénico o que los componentes de la pared celular de las no-embriogénicas determinen la identidad de la célula vecina -célula competente- (Berger et al. 1994) para entrar en la ruta de embriogénesis.

En relación con la idea de la determinación del tipo celular por los componentes de pared. Estudios de histoquímica realizados en cultivos *in vitro* de maíz (Samaj et al. 1999) con el colorante específico,  $\beta$ -D-glucosil Yariv fenilglucósido que se enlaza específicamente a residuos de ramnosa en las arabinogalactoproteínas (AGP's), revelaron que la pared celular de los tejidos embriogénicos contienen AGP's; por el contrario, las células que forman parte de los tejidos no embriogénicos no dieron tinción positiva con el reactivo de Yariv. Utilizando el anticuerpo monoclonal JIM4

(reconoce un epítipo que contiene gluco-arabinosa), se observó que los tejidos embriogénicos contienen el epítipo JIM4, en tanto que los tejidos no embriogénicos carecen del mismo. Este hecho también se ha observado en células embriogénicas de suspensiones celulares de *D. carota* (Kreuger y Van Holst 1996). Por otro lado, la adición del reactivo de Yariv al medio de cultivo de células de *Cichorium* (Chapman et al. 2000) bloqueó la inducción de la embriogénesis somática. La transferencia del tejido tratado a un medio fresco restauró el proceso de inducción, sugiriendo que los AGP's tienen una función importante durante la inducción de la ES, al igual que en otros procesos morfogénicos (Nothnagel 1997; Majewska-Sawka y Nothnagel 2000).



**Figura 1.1.** Aspecto morfológico de un agregado no embriogénico (A) y embriogénico (B) de *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo. Las barras representan 2 mm.

El hecho de que en un sistema se obtengan agregados con el mismo origen, crezcan en el mismo medio de cultivo y presenten capacidad embriogénica diferencial representa una ventaja para su estudio, sobre los sistemas en los que la obtención de líneas celulares embriogénicas y no-embriogénicas se realiza usualmente a partir de explantes con diferente origen (Carlberg et al. 1984; Jiménez y Bangerth 2001b) o cultivados bajo diferentes condiciones (Wilde et al. 1988; Grotkass et al. 1995; Cvikrová et al. 1996; Cuadrado et al. 2001). Consecuentemente, el éxito para establecer una línea celular con capacidad para

generar plántulas en especies vegetales de interés comercial puede depender de la habilidad para reconocer y seleccionar el tipo celular adecuado. Aunque en muchos casos, las características físicas pueden ser suficientes para distinguir entre agregados embriogénicos y no embriogénicos, ello no proporciona suficiente información para estudiar los mecanismos del proceso de inducción de la embriogénesis somática. El criterio morfológico para el etiquetado de un tejido como no embriogénico puede ser marginal, ya que este tejido podría manifestar la capacidad embriogénica bajo condiciones de cultivo diferentes. Las posibles diferencias podrían atribuirse a: 1) receptores para reguladores del crecimiento, 2) alteración en el balance endógeno de los reguladores del crecimiento, y 3) a nivel del ADN -mutación, cortes, rearrreglos cromosómicos o metilación (Bhojwani y Razdan 1983).

## **Características estructurales de las células embriogénicas y patrón de desarrollo del embrión somático**

### **Embriogénesis somática directa e indirecta**

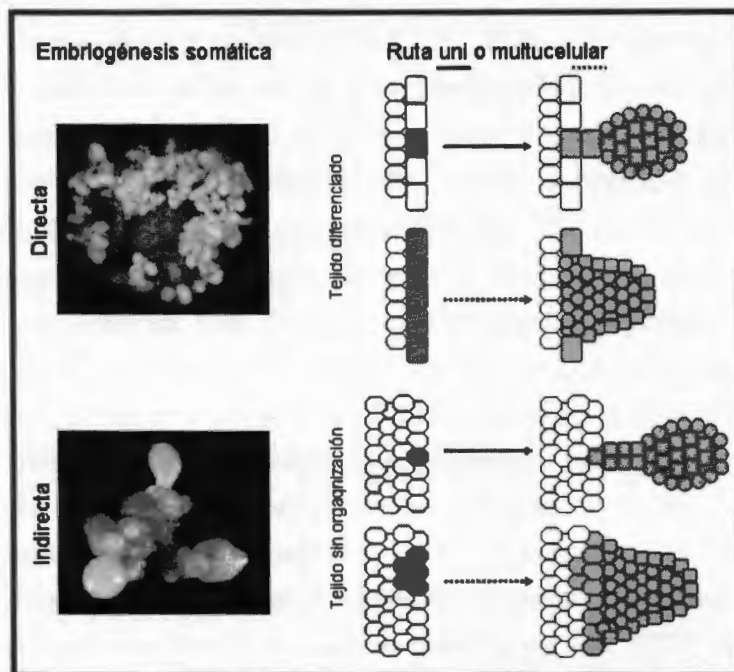
En general se acepta que existen dos tipos básicos de inducción de la embriogénesis: la embriogénesis somática directa (ESD), y la indirecta (ESI). El término "directa" se aplica al explante que presenta una proliferación celular desorganizada mínima (proliferación inducida por la herida) antes de formar los embriones somáticos, mientras que la "indirecta" se refiere a explantes en los que hay una abundante proliferación celular sin organización -callo- (Sharp et al. 1980). Se ha sugerido que en la ESD, las células pre-embriogénicas (células competentes) ya están presentes y sólo requieren condiciones favorables para la expresión del programa embriogénico, mientras que en la ESI, se precisa de la redeterminación de las células desdiferenciadas y la adquisición del estadio embriogénico antes de iniciar el desarrollo del embrión (Williams y Maheswaran 1986). Los principales factores involucrados para un determinado tipo de respuesta dependerán de la naturaleza del regulador del crecimiento utilizado, el origen del explante, el estadio fisiológico y la especie utilizada. Sin embargo, el término "directa" e "indirecta" es útil

para describir aquellos casos en los que hay poca o abundante proliferación celular sin organización, previa a la formación de embriones somáticos, pero no necesariamente podría indicar diferencias fundamentales en las células involucradas (Halperin 1995).

### **Origen uni- o multicelular del embrión somático**

Generalmente se acepta que al inicio de la ESI se dá la formación de un agregado compacto, compuesto principalmente de células de tipo meristemático (masa proembrionígenica), a partir del cual se desarrollan los embriones. Estos embriones pueden tener un origen unicelular (Halperin y Wetherell 1965; Botti y Vasil 1984), en el que se observa una serie de divisiones coordinadas, o multicelular (Taylor y Vasil 1996) donde no se observa un patrón seriado de divisiones, sino por el contrario, el embrión se distingue como una protuberancia. Para la ESD, se han observado ambas rutas de desarrollo: unicelular (Conger et al. 1983; Trigiano et al. 1989) o multicelular (Gill et al. 1998). Aún más en una misma especie vegetal, se pueden observar ambas rutas durante la ESI (Fernandez et al. 1999) y la ESD (Maheswaran y Williams 1985). La ruta unicelular se ha observado tanto en un sistema de ESI (Faure et al. 1996), como en la ESD (Choi et al. 1999). En resumen, ambas rutas de desarrollo logran observarse en los dos tipos de inducción de la ES (Figura I.2). En general, un origen multicelular parece producir embriones fusionados con el explante sobre el área basal del embrión, mientras que en la embriogénesis somática de origen unicelular es más probable que el embrión se encuentre unido a éste por una estructura similar al suspensor (Williams y Maheswaran 1986).

El conocimiento del origen del embrión somático en un sistema de cultivo *in vitro*, aparte del interés científico, es de importancia biotecnológica, pues un origen unicelular podría facilitar el uso de técnicas de modificación genética como la mutagénesis o la transformación, evitándose la obtención de plantas quiméricas (Trigiano et al., 1989).



**Figura I.2.** Representación simplificada del proceso de embriogénesis somática. Un origen multicelular (—) parece generar embriones fusionados con el tejido origen sobre el área basal del embrión, mientras que un origen unicelular (---) es más probable que el embrión se encuentre unido con el tejido de origen por una estructura similar al suspensor. Las fotografías corresponden a sistemas embriogénicos de *Coffea canephora* (embriogénesis somática directa) y *Coffea arabica* (embriogénesis somática indirecta).

### **Características estructurales de las células embriogénicas**

Las características morfológicas de las células que conforman los agregados embriogénicos en varias especies vegetales presentan un aspecto muy similar, observándose células de tipo meristemático. No todas las células somáticas logran completar la transición hacia células competentes y luego a células embriogénicas, que eventualmente formarán embriones somáticos.

En la mayoría de los sistemas embriogénicos, las células que dan origen a los embriones muestran un número de características comunes propias de las células

del tipo meristemático: poseen una división rápida, son de tamaño pequeño, isodiamétricas, con contenido citoplásmico denso, tienen pequeños gránulos de almidón, núcleo grande con nucleolo prominente, vacuolas pequeñas, y pared celular gruesa (Halperin y Jensen 1967; Williams y Maheswaran 1986). Estas células se tiñen intensamente con colorantes para proteínas, como la nigrosina y el azul de Coomassie (Bajaj 1995) o de amplio espectro, como el azul de toluidina. Cuando un agregado embriogénico se tiñe con azul de toluidina, las células embriogénicas se distinguen de las células meristemáticas al presentar una coloración más intensa, indicando posiblemente una mayor actividad metabólica.

Se ha sugerido el uso de marcadores específicos para distinguir entre las células competentes y las no competentes para la formación de embriones. En *Cichorium* (Dubois et al. 1990; Dubois et al. 1991) y *Trifolium repens* (Maheswaran y Williams 1985), la deposición de callosa en la pared celular y la presencia de  $Ca^{2+}$  vacuolar (Verdus et al. 1993) son las primeras señales en el reconocimiento de la célula embriogénica. McCabe et al. (1997), utilizando células individuales provenientes de suspensiones celulares de *D. carota* y el anticuerpo monoclonal JIM8 (reconoce un epítipo que contiene ramnosa), observaron que la población de células individuales positivas a JIM8 ( $JIM8^+$ ) desarrolló embriones somáticos, contrastando con las poblaciones negativas ( $JIM8^-$ ); sin embargo, las células  $JIM8^+$  se dividieron asimétricamente, dando lugar a una célula hija que fue  $JIM8^+$  y positiva al reactivo de Yariv ( $Y^+$ ). Esta célula entró en la ruta de muerte celular. La otra célula  $JIM8^-$  y Yariv negativa ( $Y^-$ ) formó embriones somáticos. La habilidad de las células  $JIM8^-$  para producir embriones podría deberse a una señal secretada hacia el medio de cultivo por las células  $JIM8^+$ , producto de la degradación de los AGP's de la pared celular por parte de las quitinasas extracelulares (Domon et al. 2000). El proceso de muerte celular programada es un evento involucrado en una amplia gama de procesos morfogénicos (Pennell y Lamb 1997), incluyendo la embriogénesis somática, ya sea para producir la degradación de las células que conforman el suspensor o para la correcta formación del patrón embriogénico a partir de masas proembriogénicas (Filonova et al. 2000).



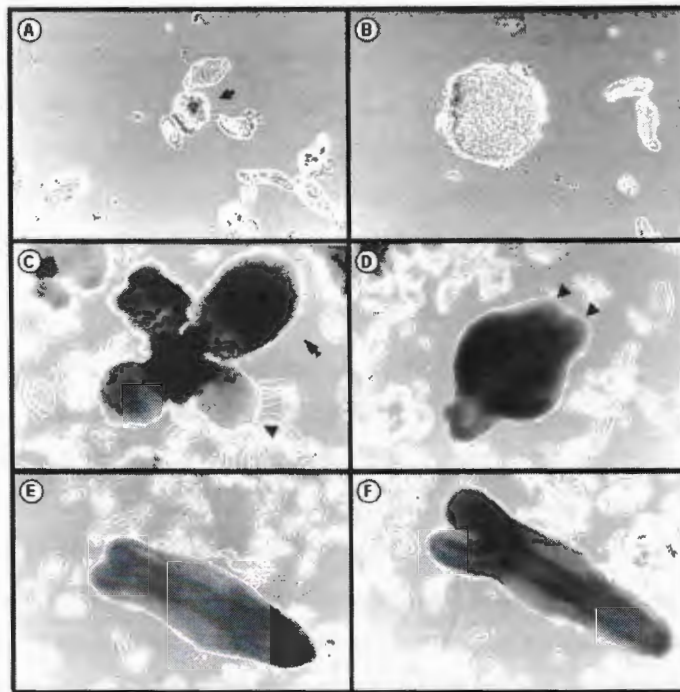
Schmidt et al. (1997) empleando *D. carota* determinaron varios genes como marcadores potenciales de las células competentes. Uno de estos genes, el SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase) se utilizó para identificar células individuales provenientes de suspensiones celulares que son competentes para formar embriones somáticos. Las células positivas tenían un aspecto ligeramente alargado y vacuolado, pudiéndose detectar la expresión de SERK hasta el estadio globular temprano (ca. 100 células). Por el contrario, en *Dactylis glomerata* (Somleva et al. 2000) se observó que las células que adquirieron la competencia embriogénica eran pequeñas, isodiamétricas, de citoplasma denso y expresaban el gen SERK. En un trabajo reciente, usando como modelo de estudio a *Arabidopsis thaliana*, se aisló un gen con homología a SERK (AtSERK1), cuya expresión estaba restringida a las células que adquirieron competencia embriogénica, células embriogénicas y embriones somáticos en sus diferentes estadios de desarrollo. La expresión ectópica de AtSERK1 incrementó la eficiencia para iniciar la embriogénesis somática (Hecht et al. 2001).

### **Estadios de desarrollo del embrión somático**

Los primeros estudios que reportaron la obtención de embriones somáticos se realizaron a finales de los años 50, empleando como modelo cultivos de *Daucus carota* (Steward et al. 1958; Reinert 1959) y *Oenanth aquatica* (Waris 1957; Krikorian y Simola 1999). Desde entonces, se han obtenido embriones somáticos de muchas especies vegetales (Ammirato 1983; Williams y Maheswaran 1986; Canhoto et al. 1999; Ikeda-Iwai et al. 2002).

El modelo más ampliamente estudiado, por la facilidad en la inducción, la rapidez de respuesta y los altos rendimientos en la obtención de embriones somáticos ha sido *D. carota*. De manera similar a su contraparte cigótica, los embriones somáticos en las plantas floríferas pasan a través de estadios morfológicos característicos (Figura I.3), que pueden ser: globular, oblongo, corazón, alargado, torpedo y cotiledonar (Kato y Takeuchi 1963; Halperin 1966; Schiavone y Cooke 1985; Nakamura et al. 1992). El embrión en estadio globular (Figura I.3 C, cabezas de flecha) señala el comienzo de la diferenciación para el establecimiento de la estructura básica de la

planta. La primera estructura que puede observarse en este estadio es el protoderma –precursor de la epidermis de la planta–. Una correcta formación del protoderma permitirá al embrión desarrollarse más allá del estadio globular. Esto ha sido observado en una línea celular sensible a temperatura en *D. carota*, la cual puede desarrollar el proceso de la embriogénesis somática en forma normal a 24°C, pero a 32°C el proceso no va más allá del estadio globular, produciéndose embriones deformes. La adición de una proteína extracelular purificada del medio de cultivo restaura el protoderma dañado y le permite avanzar en su desarrollo, es decir del estadio globular en adelante (Lo Schiavo et al. 1990; De Jong et al. 1992; Baldan et al. 1997). También, en este estadio se han observado células que podrían dar origen al procambium –precursor del sistema vascular– (Halperin y Wetherell 1965). El estadio de tipo oblongo (Figura I.3 C, flecha) fue observado por vez primera en *D. carota*, en el que un procambium bien definido no se ha detectado hasta el estadio de tipo-corazón (Schiavone y Cooke 1985) como puede observarse en la Figura I.3. En *D. carota* las células que conforman la parte interna del procambium presentan un aspecto alargado, mientras que en *C. arabica* estas células presentan un aspecto circular y no fue hasta los estadios tardíos de la embriogénesis cuando se observaron células alargadas. La formación de los cotiledones denota el comienzo del estadio de tipo corazón; estos se observan como pequeñas protuberancias en el extremo apical del embrión (Figura I.3 D, cabezas de flecha), y simultáneamente se presenta la formación del primordio cotiledonar, derivado de la bifurcación del procambium hacia los cotiledones. El primordio cotiledonar está conformado por células isodiamétricas (Yeung 1995). Entre las anomalías observadas durante la ES (Ammirato 1987), se encuentran los cotiledones, tanto en número (Dos Santos y Machado 1989) como en estructura (Buchheim et al. 1989). La presencia de un solo cotiledón en *Vitis vinifera* no tiene efecto significativo en el porcentaje del establecimiento y desarrollo de las plántulas (Jayasankar et al. 2002), sugiriendo que en esta especie vegetal la morfología “perfecta” del embrión somático puede no ser necesaria para su germinación.



**Figura 1.3.** Estadios del desarrollo de la embriogénesis somática en *Daucus carota* cv. Nantes Tree. **A** Agregado proembriogénico. **B** Embrión en estadio de tipo globular. **C** Embriones somáticos en estadio globular (cabeza flecha) y oblongo (flecha) unidos a un agregado celular. **D** Embrión en estadio corazón; las cabezas de flecha indican los cotiledones. **E** Embrión en estadio alargado. **F** Embrión en estadio torpedo.

### **Compuestos excretados por los cultivos de tejidos vegetales**

Entre las primeras observaciones bioquímicas que se realizaron en relación a la embriogénesis somática, se encuentran aquellas sobre la necesidad de un "factor embriogénico" para coordinar la división celular y la morfogénesis. Este factor se encontró en el medio de cultivo (Warren y Fowler 1981). Desde entonces se ha hecho un importante esfuerzo para determinar el tipo de sustancias que las suspensiones celulares liberan al medio de cultivo. Entre éstas se encuentra una amplia y compleja variedad de moléculas, tales como: polisacáridos, aminoácidos,

reguladores del crecimiento, vitaminas, otros compuestos de bajo peso molecular, y polipéptidos (Chung et al. 1992). Algunos de estos compuestos se derivan de la pared celular, en tanto que otros provienen del interior de las células. Se ha observado que los compuestos excretados al medio de cultivo, juegan un importante papel en el desarrollo del proceso de la embriogénesis somática (Van Engelen y De Vries 1992; Quiroz-Figueroa et al. 2000), ya sea promoviéndola o inhibiéndola.

### **Compuestos extracelulares de baja masa molecular**

Los compuestos excretados al medio de cultivo pueden inhibir (Higashi et al. 1998) o estimular (Yang et al. 2000) el proceso de la embriogénesis somática. En suspensiones celulares de *D. carota*, la embriogénesis somática no se lleva a cabo a alta densidad celular (Osuga et al. 1993). Higashi et al. (1998) demostraron que este efecto inhibitorio no es causado por el agotamiento de los nutrimentos del medio de cultivo o por un posible daño físico ocasionado por la fricción celular. Estos se encontraron en el medio de cultivo y su masa molecular estaba por debajo de los 3.5 kDa. Posteriormente, el mismo grupo (Kobayashi et al. 2000), publicó la purificación e identificación de uno de los factores inhibitorios presentes en el medio de cultivo de *D. carota*. Este factor fue identificado como el alcohol, 4-hidroxibencílico, el cual se acumula e inhibe la embriogénesis somática a alta densidad celular.

Las células de las plantas cultivadas *in vitro* a baja densidad celular, usualmente tienen baja actividad mitótica, que no puede ser mejorada por la adición de reguladores del crecimiento o por algún otro nutrimento del medio de cultivo. Sin embargo, la adición de medio condicionado<sup>1</sup> proveniente de un cultivo celular con alta actividad mitótica induce la división celular (Stuart y Street 1969). Por otro lado, la adición de medio condicionado proveniente de cultivos inducidos hacia la embriogénesis fue capaz de promover el desarrollo de los embriones de *D. carota* (Hari 1980; Warren y Fowler 1981) y *Brassica napus* (Huang et al. 1990). Resultados similares han sido publicados recientemente empleando *Triticum aestivum* (Zheng et

---

<sup>1</sup> El medio condicionado es aquel medio de cultivo en el que se han cultivado previamente células.

al. 2002), al adicionar medio condicionado de cultivo de ovarios a los cultivos de microsporas.

La  $\alpha$ -fitosulfocina, un pentapéptido sulfatado en su residuo de tirosina - H-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Ile-Tyr(SO<sub>3</sub>H)-Thr-Gln-OH -, previamente aislado e identificado de medio condicionado de suspensiones celulares de *Asparagus officinalis* (Matsubayashi y Sakagami 1996), fue el primer factor del crecimiento de tipo peptídico determinado en plantas superiores. A éste se han unido la sistemina, ENOD40, CLAVATA3 y SCR(SP1) (Matsubayashi et al. 2001). Kobayashi et al. (1999) demostraron que cuando se adiciona este compuesto al medio de inducción para la embriogénesis somática, se produce un aumento en el número de embriones. Recientemente, Hanai et al. (2000) mostraron que la liberación de  $\alpha$ -fitosulfocina, la cual se sintetiza como un precursor más grande y tiene un péptido señal en el amino terminal para ser excretada, podría estar relacionada con el crecimiento de las células, más que con el desarrollo de los embriones somáticos. Recientemente se identificó que el blanco de la fitosulfocina, es un receptor para cinasas con secuencias ricas en leucina (Matsubayashi et al. 2002). La sobre-expresión de este receptor en células de *D. carota* provocó un incremento en el crecimiento en respuesta a la presencia de la  $\alpha$ -fitosulfocina.

### **Proteínas extracelulares**

La mayoría de las especies vegetales cultivadas *in vitro* excretan proteínas al medio de cultivo, las cuales pertenecen principalmente al grupo de proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa. Las peroxidasas son las proteínas extracelulares que más se han estudiado. Se desconoce cuál es la función de las proteínas en el medio de cultivo; sin embargo, se ha observado que algunas de éstas juegan un importante papel en el desarrollo del proceso de embriogénesis somática, ya sea promoviéndolo o inhibiéndolo (Van Engelen y De Vries 1992; Quiroz-Figueroa et al. 2000).

Desde las primeras observaciones que se realizaron, en relación a la naturaleza de las proteínas secretadas al medio de cultivo, se determinó que la gran mayoría pertenecen al grupo de las glucoproteínas (Sato et al. 1986). La tunicamicina, un

antibiótico de origen fúngico que inhibe la glucosilación de proteínas, inhibe la embriogénesis somática, más no la proliferación de células en cultivo de zanahoria (Cordewener et al. 1991). El proceso de embriogénesis inhibido por este compuesto, pudo restablecerse al adicionarse al sistema medio condicionado concentrado de células sin tratar con tunicamicina. Al purificar el factor del medio condicionante que era capaz de restaurar la embriogénesis somática, se determinó que era una peroxidasa de 38 kDa de masa molecular (Cordewener et al., 1991).

Otras evidencias que apoyan la hipótesis de que las proteínas extracelulares tienen un papel relevante en la inducción o en el desarrollo de la embriogénesis somática provienen del uso de la mutante *ts11* de zanahoria. Esta mutante puede desarrollar el proceso de la embriogénesis somática en forma normal a 24°C, pero a 32°C el proceso no va más allá del estadio globular y se producen embriones deformes, a menos que el sistema sea complementado con medio condicionado de cultivos silvestres o del mismo cultivo a 24°C (Lo Schiavo et al., 1990). Esta mutante no es capaz de llevar a cabo apropiadamente la glucosilación de algunas proteínas a la temperatura no permisible (Lo Schiavo et al., 1990). Los embriones *ts11* responden a la adición de algunas moléculas, tales como la quitinasa ácida EP3 de 32 kDa (De Jong et al., 1992; De Jong et al. 1995) que aumenta el número de embriones globulares (Kragh et al. 1996) y restaura su sistema endomembranal (Baldan et al., 1997).

Kreuger y van Holst (1993; 1995), han observado que las líneas celulares de *D. carota* excretan un grupo característico de AGPs al medio de cultivo, cuya composición cambia con la edad del cultivo (Kreuger y Van Holst 1993) y que al adicionarse a las líneas celulares no embriogénicas promueve la inducción del potencial embriogénico (Kreuger y Van Holst 1993; Toonen et al. 1997). Estos resultados sugieren que estas proteínas son esenciales en la embriogénesis somática y capaces de dirigir el desarrollo de las células. Egertsdotter et al. (1993) y Egertsdotter y Von Arnold (1995), usando como modelo de estudio al abeto (*Picea abies*), han determinado que la adición de proteínas extracelulares, entre ellas las AGPs, de una línea embriogénica normal a una línea embriogénica anormal restaura la morfología de los embriones.

Toonen et al. (1997) han propuesto la existencia de células de tipo nodriza que podrían producir factores que promueven la embriogénesis, y que el desarrollo de dichas células se promueve por las AGPs. Pennell et al. (1992) y McCabe et al. (1997) localizaron un epítotope, reconocido por el anticuerpo mAb JIM8, en las paredes celulares de cierto tipo de células embriogénicas, el cual no se encontró en las células no embriogénicas, y que podría ser empleado como un marcador temprano de la embriogénesis somática. Además, demostraron que determinado tipo celular fue competente para formar embriones somáticos y que al adicionar el medio condicionado de cultivos compuestos por células positivas al JIM8, a los cultivos de células JIM8<sup>-</sup>, éstos últimos formaron y desarrollaron embriones somáticos. Lo interesante en dicho trabajo es que únicamente un sólo tipo de células hizo la diferencia entre los dos grupos. Domon et al. (2000) reportaron que las AGPs podrían generar alguna molécula señal de tipo oligosacárido vía la acción de alguna quitinasa.

En el caso de las proteínas extracelulares que inhiben la embriogénesis somática, Gavish et al. (1991; 1992) utilizando como modelo cultivos de *Citrus aurantium*; determinaron que el desarrollo normal de la embriogénesis somática depende, de manera obligatoria, de la ausencia de proteínas glucosiladas de masa molecular entre 53 y 57 kDa. Por otro lado, Coutos-Thevenot et al. (1992), trabajando con suspensiones celulares de un híbrido de uva (*Vitis vinifera* cv. Chasselas x *V. berlandie*), determinaron el mismo efecto inhibitorio en la embriogénesis somática, concluyendo que son las macromoléculas extracelulares (mayores de 10 kDa) las involucradas en este efecto. El mismo grupo (Maës et al. 1997) demostró que las proteínas extracelulares modulan la embriogénesis somática y que es un mecanismo proteolítico extracelular el que se encuentra implicado en su inhibición. Carlberg et al. (1987) determinaron la presencia de un inhibidor de tripsina que se sintetiza por igual en células embriogénicas y no embriogénicas; sin embargo, sólo es excretado al medio de cultivo por los cultivos embriogénicos, sugiriendo que su liberación al medio de cultivo puede inhibir la acción de la tripsina, evitando así la hidrólisis de proteínas que son esenciales para que se lleve a cabo la embriogénesis somática.

## Compuestos exógenos

En diversos sistemas *in vitro*, las células propagadas en un medio de cultivo en presencia de un regulador del crecimiento, principalmente auxina, y luego transferidas a un medio en el que ésta se encuentre en baja concentración o ausente, pueden desarrollarse a embriones somáticos. Sin embargo, los componentes del medio de cultivo y los reguladores del crecimiento no son los únicos factores que controlan la embriogénesis (Herman 1991; Herman 1995). Se ha demostrado que diversos estímulos pueden inducir el direccionamiento hacia la expresión de la embriogénesis somática. Por ejemplo, en *D. carota* los embriones somáticos pueden ser obtenidos mediante un choque osmótico, empleando sacarosa o sorbitol (Wetherell 1984). También pueden inducir la embriogénesis somática mediante el uso de metales pesados como el cobalto, níquel, zinc y cadmio (Kamada et al. 1989; Kiyosue et al. 1990), el ayuno de nutrimentos (Lee et al. 2001), y el daño por herida (Smith y Krikorian 1989). El grupo de investigación del Dr. Hiroshi Kamada (Tan y Kamada 2000) aisló una fosfoproteína (ECPP44, 44 kDa) en todos los tratamientos de estrés que promovieron la embriogénesis. Esta proteína tiene una homología parcial con dos “dehidrininas” de *Arabidopsis*, proteínas de la familia LEA (Late Embryogenesis Abundant Proteins). La ECPP44 podría tener alguna función embriogénica vía señalización de estrés, al igual que la fosforilación pudiera ser importante para la adquisición de la competencia embriogénica. Sin embargo, la inducción de la respuesta embriogénica por estímulos relacionados con estrés no se da sólo en *D. carota*. Por ejemplo, en suspensiones celulares de *Carica papaya*, el pre-acondicionamiento con estrés osmótico aumenta la eficiencia en la respuesta embriogénica (Litz 1986). El uso de soluciones salinas en cultivos de *Triticum* spp. aumenta la formación de embriones somáticos y su efecto es dependiente del genotipo (Galiba y Yamada 1988). La aplicación de diversas condiciones de estrés también tiene un efecto positivo en la andrógenesis (Touraev et al. 1996; Touraev et al. 1997).

La relación entre los diversos tipos de estrés y la ES aún no se entiende. No obstante, se ha sugerido que bajo condiciones severas, la proliferación celular

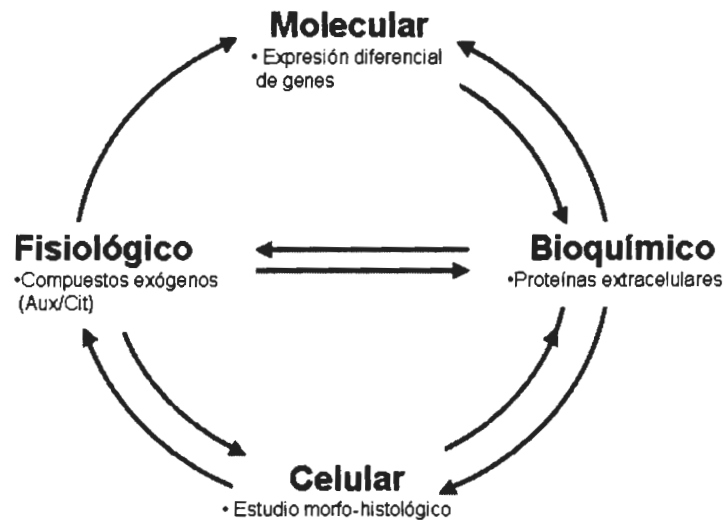


normal de las células desdiferenciadas es inhibida y como consecuencia, se estimula la producción de embriones somáticos (Lee et al., 2001). Se desconoce el mecanismo por el cual se induce la formación de embriones somáticos después o durante estas condiciones severas. Esta área del conocimiento aún permanece sin explorar y su estudio podría arrojar datos que permitan entender el mecanismo de señalización involucrado.

Otros de los compuestos ampliamente utilizados con el objeto de incrementar el rendimiento en la formación de embriones somáticos han sido los salicilatos (SA). Estas sustancias pertenecen a un grupo diverso de compuestos fenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Entre los diversos fenómenos biológicos en los que están involucrados, se encuentra la ES. Roustan et al. (1989b) y Hutchinson y Saxena (1996) reportaron que los SA a concentraciones del orden micromolar estimulan la producción de embriones somáticos en *D. carota* y *Pelargonium x hortorum*. El efecto promotor podría estar relacionado con la inhibición de la biosíntesis de etileno (Leslie y Romani 1986; Meijer y Brown 1988; Roustan et al. 1989a; Roustan et al. 1989b; Nissen 1994; Hutchinson et al. 1997). Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios. Meijer y Brown (1988) y Nissen (1994), utilizando como modelo *D. carota* y *M. sativa*, respectivamente, encontraron que los SA no estimularon la ES a concentraciones micromolares; en ambos estudios la biosíntesis del etileno fue estimulada y no inhibida como se había propuesto. Una posible explicación en la discrepancia en los resultados obtenidos es el uso de especies diferentes, pues cada especie responde de diferente manera a un mismo estímulo e inclusive esto sucede en cultivares de una misma especie. Por otro lado, los SA aumentan la concentración endógena de  $H_2O_2$  como un mecanismo de defensa al ataque de patógenos (Lamb y Dixon 1997). Se ha determinado que la aplicación exógena de  $H_2O_2$  aumenta sus niveles endógenos y promueve la ES en *Lycium barbarum* (Kairong et al. 1999). Recientemente Luo et al. (2001) determinaron que el incremento endógeno de  $H_2O_2$ , ocasionado por la adición exógena de SA, fue indispensable para el aumento en la producción de embriones somáticos. Esto sugiere que la ruta de inducción de la embriogénesis es una ruta que podría tener un punto común con la ruta por respuesta a estrés.

## DISEÑO EXPERIMENTAL

En nuestro grupo estamos interesados en estudiar el proceso de la embriogénesis somática *in vitro* desde varios aspectos (Figura I.4), como son: el fisiológico, el celular, el bioquímico y el molecular, utilizando como modelo de estudio *Coffea arabica*. Para el desarrollo de este proyecto se utilizó una línea celular embriogénica en medio líquido de *Coffea arabica*. Inicialmente, la línea celular fue obtenida a partir de callo embriogénico proveniente de explantes foliares de plántulas *in vitro*.



**Figura I.4.** Interconexiones entre las áreas de estudio para la embriogénesis somática.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ammirato P. V. (1983) Embryogenesis, in: Handbook of Plant Cell Culture., Vol. I. Techniques for Propagation and Breeding, (Evans D. A., W. R. Sharp, P. V. Ammirato, Y. Yamada, eds.), Macmillan, New York, 82-123.
- Ammirato P. V. (1987) Organizational events during somatic embryogenesis, in: Plant Biology Vol. 3. Plant Tissue and Cell Culture, (Green C. E. D. A. Somers W. P. Hackett, D. D. Biesboer, eds.), Alan R. Liss, New York, 57-81.
- Bajaj Y. P. S. (1995) Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement, in: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 105-125.
- Baldan B., F. Guzzo, F. Filippini, M. Gasparian, F. LoSchiavo, A. Vitale, S. C. De Vries, P. Mariani, M. Terzi (1997) The secretory nature of the lesion of carrot cell variant ts11, rescuable by endochitinase. *Planta*, 203: 381-389.
- Berger F., A. Taylor, C. Brownlee (1994) Cell fate determination by the cell wall in early *fucus* development. *Science*, 263: 1421-1423.
- Bhojwani S. S. , M. K. Razdan (1983) Somatic embryogenesis, in: Plant Tissue Culture: Theory and Practice, (Bhojwani S. S., M. K. Razdan, eds.), Elsevier, Amsterdam, 91-112.
- Botti C., I. K. Vasil (1984) Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. *Can. J. Bot.*, 62: 1629-1635.
- Buchheim J. A., S. M. Colburn, J. P. Ranch (1989) Maturation of soybean somatic embryos and the transition to plantlet growth. *Plant Physiol.*, 89: 768-775.
- Canhoto J. M., M. L. Lopes, G. S. Cruz (1999) Somatic embryogenesis and plant regeneration in myrtle (Myrtaceae). *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 57: 13-21.
- Carlberg I., L. Jonsson, A. Bergenstrahle, K. Soderhall (1987) Purification of a trypsin inhibitor secreted by embryogenic carrot cells. *Plant Physiol.*, 84: 197-290.

- Carlberg I., K. Söderhäll, K. Glimelius, T. Eriksson (1984) Protease activities in non-embryogenic and embryogenic carrot cell strains during callus growth and embryo formation. *Physiol. Plant.*, 62: 458-464.
- Chapman A., A. S. Blervacq, J. Vasseur, J. L. Hilbert (2000) Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta*, 211: 305-314.
- Choi Y. E., D. C. Yang, E. S. Yoon, K. T. Choi (1999) High-efficiency plant production via direct somatic single embryogenesis from preplasmolysed cotyledons of *Panax ginseng* and possible dormancy of somatic embryos. *Plant Cell Rep.*, 18: 493-499.
- Chung W., H. Pedersen, C.-K. Chin (1992) Enhanced somatic embryo production by conditioned media in cell suspension cultures of *Daucus carota*. *Biotechnol. Lett.*, 14: 837-840.
- Conger B. V., G. E. Hanning, D. J. Gray, J. K. McDaniel (1983) Direct embryogenesis from mesophyll cells of orchardgrass. *Science*, 221: 850-851.
- Cordewener J., H. Booij, H. Van der Zandt, F. A. Van Engelen, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, 184: 478-486.
- Coutos-Thevenot P., O. Maes, T. Jouenne, M. C. Mauro, M. Boulay, A. Deloire, J. Guern (1992) Extracellular protein pattern of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Sci.*, 86: 137-145.
- Cuadrado Y., H. Guerra, A. B. Martín, P. Gallego, O. Hita, A. Dorado, N. Villalobos (2001) Differences in invertase activity in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea*. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 67: 145-151.
- Cvikrová M., M. Hrubcová, J. Eder, P. Binarová (1996) Changes in the levels of endogenous phenolics, aromatic monoamines, phenylalanine ammonia-lyase, peroxidase and auxin oxidase activities during initiation of alfalfa

- embryogenic and nonembryogenic calli. *Plant Physiol. Biochem.*, 34: 853-861.
- De Jong A. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, 4: 425-433.
- De Jong A. J., T. Hendriks, E. A. Meijer, M. Penning, F. Lo Schiavo, M. Terzi, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1995) Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant ts11. *Dev. Genet.*, 16: 332-343.
- Domon J. M., G. Neutelings, D. Roger, A. David, H. David (2000) A basic chitinase-like protein secreted by embryogenic tissues of *Pinus caribaea* acts on arabinogalactan proteins extracted from the same cell lines. *J. Plant Physiol.*, 156: 33-39.
- Dos Santos A. V. P., R. D. Machado (1989) A scanning electron microscope study of *Theobroma cacao* somatic embryogenesis. *Ann. Bot.*, 64: 293-296.
- Dubois T., M. Guedira, J. Dubois, J. Vasseur (1990) Direct somatic embryogenesis in roots of *Cichorium*: is callose an early marker? *Ann. Bot.*, 65: 539-545.
- Dubois T., M. Guedira, J. Vasseur (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. A histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, 162: 120-127.
- Egertsdotter U., L. H. Mo, S. Von Arnold (1993) Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.*, 88: 315-321.
- Egertsdotter U., S. Von Arnold (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.*, 93: 334-345.
- Faure O., J. Aarouf, A. Nougarede (1996) Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L): Proembryogenesis. *Ann. Bot.*, 78: 23-28.

- Ibaraki Y., R. Matsushima, K. Kurata (2000) Analysis of morphological changes in carrot somatic embryogenesis by serial observation. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 61: 9-14.
- Ikeda-Iwai M., S. Satoh, H. Kamada (2002) Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. *J. Exp Bot*, 53: 1575-1580.
- Jayasankar S., B. R. Bondada, Z. Li, D. J. Gray (2002) A unique morphotype of grapevine somatic embryos exhibits accelerated germination and early plant development. *Plant Cell Rep.*, 20: 907-911.
- Jiménez V. M., F. Bangerth (2001a) Endogenous hormone levels in explants and in embryogenic and non-embryogenic cultures of carrot. *Physiol. Plant.*, 111: 389-395.
- Jiménez V. M., F. Bangerth (2001b) Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci.*, 160: 247-257.
- Kairong K. R., G. S. Xing, X. M. Liu, G. M. Xing, Y. F. Wang (1999) Effect of hydrogen peroxide on somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* L. *Plant Sci.*, 146: 9-16.
- Kamada H., K. Kobayashi, T. Kiyosue, H. Harada (1989) Stress induced somatic embryogenesis in carrot and its application to synthetic seed production. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 25: 1163-1166.
- Kato H., M. Takeuchi (1963) Morphogenesis *in vitro* starting from single cells of carrot root. *Plant Cell Physiol.*, 4: 243-245.
- Kawahara R. , A. Komamine (1995) Molecular basis of somatic embryogenesis, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 30. *Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 30-40.
- Kiyosue T., K. Takano, H. Kamada, H. Harada (1990) Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can. J. Bot.*, 68: 2301-2303.

- Kobayashi T., C. H. Eun, H. Hanai, Y. Matsubayashi, Y. Sakagami, H. Kamada (1999) Phytosulphokine- $\alpha$ , a peptidyl plant growth factor, stimulates somatic embryogenesis in carrot. *J. Exp. Bot.*, 50: 1123-1128.
- Kobayashi T., K. Higashi, K. Sasaki, T. Asami, S. Yoshida, H. Kamada (2000) Purification from conditioned medium and chemical identification of a factor that inhibits somatic embryogenesis in carrot. *Plant Cell Physiol.*, 41: 268-273.
- Kragh K. M., T. Hendriks, A. J. De Jong, F. Lo Schiavo, N. Bucherna, P. Hojrup, J. D. Mikkelsen, S. C. De Vries (1996) Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Mol. Biol.*, 31: 631-645.
- Kreuger M., G. Van Holst (1995) Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 197: 135-141.
- Kreuger M., G. J. Van Holst (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 189: 243-248.
- Kreuger M., G. J. Van Holst (1996) Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol. Biol.*, 30: 1077-1086.
- Krikorian A. D., L. K. Simola (1999) Totipotency, somatic embryogenesis, and Harry Waris (1893-1973). *Physiol. Plant.*, 105: 348-355.
- Lamb C., R. A. Dixon (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48: 251-275.
- Lee E. K., D. Y. Cho, W. Y. Soh (2001) Enhanced production and germination of somatic embryos by temporary starvation in tissue cultures of *Daucus carota*. *Plant Cell Rep.*, 20: 408-415.
- Leslie C. A., R. J. Romani (1986) Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.*, 5: 144-146.
- Litz R. E. (1986) Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in *Carica* suspension cultures. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 111: 969-972.
- Lo Schiavo F., G. Giuliano, S. C. De Vries, A. Genga, R. Bollini, L. Pitto, F. Cozzani, V. Nuti-Ronchi, M. Terzi (1990) A carrot cell variant temperature sensitive for

- somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 223: 385-393.
- Luo J. P., S. T. Jiang, L. J. Pan (2001) Enhanced somatic embryogenesis by salicylic acid of *Astragalus adsurgens* Pall: relationship with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-metabolizing enzymes activities. *Plant Sci.*, 161: 125-132.
- Maës O., P. Coutos-Thévenot, T. Jouenne, M. Boulay, J. Guern (1997) Influence of extracellular proteins, proteases and protease inhibitors on grapevine somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 50: 97-105.
- Maheswaran G., E. G. Williams (1985) Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens* *in vitro*. *Ann. Bot.*, 56: 619-630.
- Majewska-Sawka A., E. A. Nothnagel (2000) The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol.*, 122: 3-9.
- Matsubayashi Y., M. Ogawa, A. Moritani, Y. Sakagami (2002) An LRR receptor kinase involved in perception of a peptide plant hormone, phytosulfokine. *Science*, 296: 1470-1472.
- Matsubayashi Y., Y. Sakagami (1996) Phytosulfokine, sulfated peptides that induce the proliferation of single mesophyll cells of *Asparagus officinalis* L. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 93: 7623-7627.
- Matsubayashi Y., H. Yang, Y. Sakagami (2001) Peptide signals and their receptors in higher plants. *Trends Plant Sci.*, 6: 573-577.
- McCabe P. F., T. A. Valentine, F. L. Scott, R. I. Pennell (1997) Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell*, 9: 2225-2241.
- Meijer E. G. M., D. C. W. Brown (1988) Inhibition of somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, amino-oxyacetic acid, 2,4-dinitrophenol and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. *J. Exp. Bot.*, 39: 263-270.
- Menéndez-Yuffá A., E. G. de Garcia (1997) Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma*, 199: 208-214.



- Nabors M. W., J. W. Heyser, T. A. Dykes, K. J. DeMott (1983) Long-duration, high-frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta*, 157: 385-391.
- Nakamura T., T. Taniguchi, E. Maeda (1992) Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. *Jpn. J. Crop. Sci.*, 61: 476-486.
- Nissen P. (1994) Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: Effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiol. Plant.*, 92: 397-403.
- Nomura K., A. Komamine (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.*, 79: 988-991.
- Nothnagel E. A. (1997) Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Rev. Cytol.*, 174: 195-291.
- Oinam G. S., S. L. Kothari (1995) Totipotency of coleoptile tissue in indica rice (*Oryza sativa* L. cv. CH 1039). *Plant Cell Rep.*, 14: 245-248.
- Osuga K., H. Kamada, A. Komamine (1993) Cell density is an important factor for synchronization of the late stage of somatic embryogenesis at high frequency. *Plant Tissue Culture Lett.*, 10: 180-183.
- Pennell R. I., L. Janniche, G. N. Scofield, H. Booij, S. C. De Vries, K. Roberts (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J. Cell Biol.*, 119: 1371-1380.
- Pennell R. I., C. Lamb (1997) Programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 9: 1157-1168.
- Quiroz-Figueroa F. R. , R. Rojas-Herrera , F. Sánchez-Teyer , V. M. Loyola-Vargas (2000) Compuestos excretados por los CTV y su papel en la embriogénesis somática, in: Simposia Académico en Honor de la Dra. Estela Sánchez Quintanar, (Bernal-Lugo I., H. Loza, eds.), Facultad de Química, UNAM, México, 9-19.
- Reinert J. (1959) Über die kontrolle der morphogenese und die induktion von adventivembryonen an gewebeulturen aus karotten. *Planta*, 53: 318-333.

- Roustan J. P., A. Latche, J. Fallot (1989a) Stimulation of *Daucus carota* somatic embryogenesis by inhibitors of ethylene synthesis: cobalt and nickel. *Plant Cell Rep.*, 8: 182-185.
- Roustan J.-P., A. Latche, J. Fallot (1989b) Effet de l'acide salicylique et de l'acide acétylsalicylique sur la production d'éthylène et l'embryogenèse somatique de suspensions cellulaires de carotte (*Daucus carota* L.). *C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III*, 308: 395-399.
- Samaj J., F. Baluska, M. Bobák, D. Volkmann (1999) Extracellular matrix surface network of embryogenic units of friable maize callus contains arabinogalactan-proteins recognized by monoclonal antibody JIM4. *Plant Cell Rep.*, 18: 369-374.
- Satoh S., H. Kamada, H. Harada, T. Fujii (1986) Auxin-controlled glycoprotein release into the medium of embryogenic carrot cells. *Plant Physiol.*, 81: 931-933.
- Schiavone F. M., T. J. Cooke (1985) A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell culture. *Can. J. Bot.*, 63: 1573-1578.
- Schmidt E. D. L., F. Guzzo, M. A. J. Toonen, S. C. De Vries (1997) A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development*, 124: 2049-2062.
- Sharp W. R., M. R. Söndahl, L. S. Caldas, S. B. Maraffa (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 268-310.
- Smith D. L., A. D. Krikorian (1989) Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *Am. J. Bot.*, 76: 1832-1843.
- Somleva M. N., E. D. L. Schmidt, S. C. De Vries (2000) Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. *Plant Cell Rep.*, 19: 718-726.
- Steward F. C., M. O. Mapes, K. Mears (1958) Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *Am. J. Bot.*, 45: 705-708.

- Stirn S., H.-J. Jacobsen (1987) Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.*, 6: 50-54.
- Stuart R., H. E. Street (1969) Studies on the growth in culture of plant cells IV. The initiation of division in suspensions of stationary-phase cells of *Acer pseudoplatanus* L. *J. Exp. Bot.*, 20: 556-571.
- Tan S. K., H. Kamada (2000) Initial identification of a phosphoprotein that appears to be involved in the induction of somatic embryogenesis in carrot. *Plant Cell Rep.*, 19: 739-747.
- Taylor M. G., I. K. Vasil (1996) The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). *Am. J. Bot.*, 83: 28-44.
- Toonen M. A. J., T. Hendriks, E. D. L. Schmidt, H. A. Verhoeven, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. *Planta*, 194: 565-572.
- Toonen M. A. J., E. D. L. Schmidt, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1997) Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta*, 203: 188-195.
- Touraev A., A. Ilham, O. Vicente, E. Heberle-Bors (1996) Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: An optimized system for molecular studies. *Plant Cell Rep.*, 15: 561-565.
- Touraev A., O. Vicente, E. Heberle-Bors (1997) Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.*, 2: 297-302.
- Trigiano R. N., D. J. Gray, B. V. Conger, J. K. McDaniel (1989) Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.*, 150: 72-77.
- Tsukahara M., A. Komamine (1997) Separation and analysis of cell types involved in early stages of carrot somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 47: 145-151.
- Van Engelen F. A., S. C. De Vries (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet.*, 8: 66-70.

- Verdus M.-C., T. Dubois, J. Dubois, J. Vasseur (1993) Ultrastructural changes in leaves of *Cichorium* during somatic embryogenesis. *Ann. Bot.*, 72: 375-383.
- Waris H. (1957) A striking morphogenetic effect of amino acid in seed plant. *Suom Kemistil*, 36B: 121.
- Warren G. S., M. W. Fowler (1981) Physiological interactions during the initial stages of embryogenesis in cultures of *Daucus carota* L. *New Phytol.*, 87: 481-486.
- Wetherell D. F. (1984) Enhanced adventive embryogenesis resulting from plasmolysis of cultured wild carrot cells. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 5: 221-227.
- Wilde H. D., W. S. Nelson, H. Booij, S. C. De Vries, T. L. Thomas (1988) Gene-expression programs in embryogenic and non-embryogenic carrot cultures. *Planta*, 176: 205-211.
- Williams E. G., G. Maheswaran (1986) Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.*, 57: 443-462.
- Yang H., Y. Matsubayashi, H. Hanai, Y. Sakagami (2000) Phytosulfokine- $\alpha$ , a peptide growth factor found in higher plants: its structure, functions, precursor and receptors. *Plant Cell Physiol.*, 41: 825-830.
- Yeung E. C. (1995) Structural and development patterns in somatic embryogenesis, in: *In vitro* Embryogenesis in Plants, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 205-247.
- Zheng M. Y., Y. Weng, C. F. Konzak (2002) The effect of ovary-conditioned medium on microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep.*, 20: 802-807.

## CAPÍTULO II

### DIFFERENTIAL GENE EXPRESSION BETWEEN EMBRYOGENIC AND NON-EMBRYOGENIC CLUSTERS IN CELL SUSPENSION CULTURES OF *Coffea arabica* L.

F. R. Quiroz-Figueroa, M. Méndez-Zeel, F. Sánchez-Teyer, R. Rojas-Herrera and  
V. M. Loyola-Vargas

This chapter was published in *Journal of Plant Physiology* 159(11): 1267-1270, (2002)

#### Summary

Somatic embryogenesis (SE) is a very useful system for studying the differentiation process in plants and involves gene regulation at several levels. During SE induction in *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo two types of cell clusters, embryogenic (EC) and non-embryogenic (NEC), were observed. The goal of this work was to compare the most relevant characteristics between EC and NEC for a better understanding of the mechanism driving SE. Morpho-histological observations indicated a correlation between the morphological features of clusters and their embryogenic competence. On the other hand, no variation at the DNA level, studied by AFLP, were found to explain the disparity in embryogenic competence of clusters, but gene expression, observed by RNA differential display, and SDS-PAGE showed differences that can explain that disparity. Our results lead us to propose that differential gene expression can modulate the embryogenic capacity of coffee cells and that the number of genes turned off in somatic cells to allow for the change from a somatic to an embryogenic state, is higher than that of genes that are turned on.

**Keywords:** *Coffea arabica*, embryogenic cluster, non-embryogenic clusters, somatic embryogenesis.

## **Introduction**

Somatic embryogenesis (SE) is a feasible model for studying the differentiation process in plants. In contrast to its zygotic counterpart, SE can easily be observed, the culture conditions can be controlled and large quantities of embryos can be obtained. SE can be used for the study of early morphogenetic and molecular events occurring during embryogenesis in higher plants. The embryogenic competence of cultures is often a characteristic confined to a very limited fraction of the cell population (Nomura and Komamine 1985) or to cells in discrete zones on clusters (Vasil and Vasil 1981). Although in many cases the physical features may be sufficient for the distinction between embryogenic and non-embryogenic clusters, they do not provide information for studying the mechanisms involved in plant cell differentiation, especially in the process of SE induction.

Somatic embryogenesis has been reported for the two most important species of *Coffea* genus (Staritsky 1970; Herman and Haas 1975). However, even now, very little is known about the mechanisms of somatic embryogenesis induction in these models. The aim of the present study was to analyze the most relevant characteristics between embryogenic and non-embryogenic clusters of *Coffea arabica* at different levels. These cluster types had the same origin and were cultured under the same conditions. In this work we report some morphological, molecular and biochemical differences in both types of clusters that can explain the observed disparity in embryogenic competence.

## **Materials and Methods**

### **Plant material and culture conditions**

Embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo were maintained and embryogenesis was initiated as previously described by Quiroz-Figueroa et al. (2002).

### **AFLP analysis**

For AFLP development, a modification of the procedure originally reported by Vos et al (1995), was used, omitting the first pre-selective PCR. A binary matrix was

obtained from scored band patterns by absence (0) or presence (1) of bands. The bootstrap was calculated, employing 500 repetitions and 25% of the resampled binary matrix, using the Phylogenetic Computer Tools for Windows ver. 1.18. The average bootstrapped matrix was used to calculate the similarity matrix using the formula reported by Nei and Li (1979). The similarity matrix was analyzed using the DICE coefficient and the clusters were analyzed by the Unweighted Pair-Group Method (UPGMA), as reported by Saitou and Nei (1987). Bootstrap data were used for the statistical analysis using STATISTICA for Windows (StatSoft, Inc., 1998).

#### **Isolation of total RNA and protein**

TriPure® Isolation Reagent (Boehringer, Mannheim) was used for isolation of total RNA and protein, as recommended by the supplier, from 100 mg (dry weight) of the different tissues. RNA integrity was checked by electrophoresis in agarose gels (1% w/v) and ethidium bromide staining. Proteins were resuspended in 0.3 ml of 50 mmol L<sup>-1</sup> sodium phosphate buffer (pH 7.5) containing 250 mmol L<sup>-1</sup> sucrose and 2.5 mmol L<sup>-1</sup> EDTA.

#### **RNA differential display**

This study was performed as described previously by Rojas-Herrera et al. (2002). The first strand was synthesized from 2 µg of the total RNA, using 2.5 µmol L<sup>-1</sup> of oligo(dT)<sub>13</sub>AA as anchor primer and incubated for 1 hour at 37°C. PCR reaction was performed using 2.5 µl of first strand reaction as the template. The amplification products were loaded in a polyacrylamide sequencing gel (5%) and exposed at -80°C in cassettes with an intensifier screen using Hyperfilms (Kodak).

#### **Protein quantification and SDS-PAGE electrophoresis**

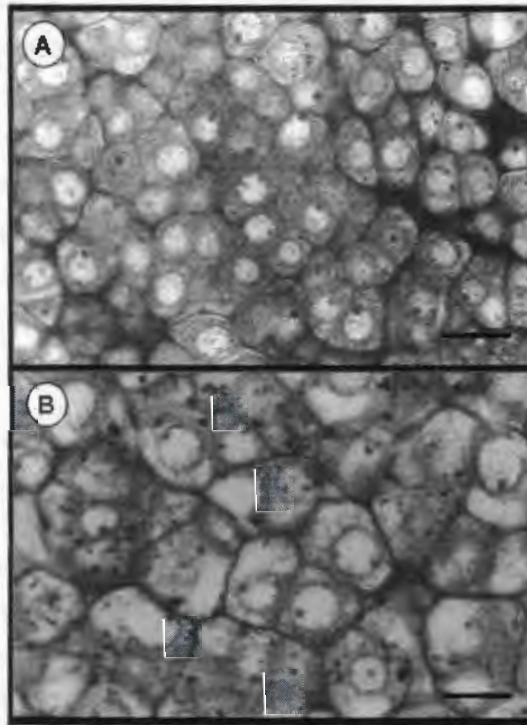
The protein content was estimated by Peterson's method (Peterson 1977) using BSA (Sigma, USA) as a standard. SDS-PAGE on 10% gel was performed essentially as described by Laemmli (1970). Fifteen µg of protein were loaded in each lane. Bands were visualized by staining with ammoniacal-silver according to Wray et al. (1981).

## Results and discussion

During SE induction two distinguishable clusters, embryogenic (EC) and non-embryogenic (NEC), growing under the same condition were observed (Figure I.1). EC was brown, embryos emerged from day 12, and up to 30 somatic embryos per cluster were scored. NEC emerged from EC around day 16 after induction; they were pale-yellow and did not give rise to somatic embryos.

Browning of tissues, probably caused by the accumulation of phenolic compounds, seems to be necessary for the somatic embryogenesis process in coffee and may be a very useful visual marker to distinguish between embryogenic and non-embryogenic cultures. Both embryogenic and non-embryogenic cells are quite similar at the histological level but they differ in cell size and in the presence of a larger quantity of inclusion bodies in non-embryogenic cells (Figure II.1). Our histological observations indicated a correlation between cell types and embryogenic capacity of clusters, agreeing with the study by Nomura and Komamine (1985) in *Daucus carota* suspension cultures. However, Menéndez et al. (1994) and Tahara et al. (1995) observed the presence of elongated and highly vacuolated cells in the non-embryogenic callus in contrast to embryogenic cells, which resemble meristematic cells. A third set of observations shows that the capability of individual single cells to form somatic embryos is not restricted to a particular distinguishable cell type based on its morphology (Toonen et al. 1994). It is possible that the observed differences are the consequence of the systems used. The presence of two cell clusters coming from the same origin and growing in the same medium may represent an advantage over other systems where embryogenic and nonembryogenic lines are usually obtained from different sources (Jiménez and Bangerth 2001) or culture conditions (Grotkass et al. 1995). The differences found could therefore be attributed to the presence or absence of a particular substance in the medium as well as other factors caused by the explant source.





**Figure II.1.** Histological aspect of embryogenic and non-embryogenic clusters. **A** Cross-section of embryogenic cluster. **B** Cross-section of non-embryogenic cluster. All sections were stained with toluidine blue. Bars = 20  $\mu\text{m}$ .

According to Lo Schiavo et al. (1989), culture conditions could induce changes in genetic information at the DNA level. To test this hypothesis, AFLP markers were obtained employing 11 primer combinations. A total of 987 bands were scored, resulting in 85 (8.61%) polymorphic bands (data not show). The average number of bands per combination of primers was 89; moreover, both the total and the polymorphic number of bands varied according to the primer combination analyzed. The similarity index between EC and NEC was 0.994. Several factors concerning tissue culture-induced variation, such as genotype (Söndahl and Bragin 1991), explant source (Van den Bulk et al. 1990), growth regulators employed (Van den Bulk et al., 1990) and age of culture (Müller et al. 1990) have been reported.

Nevertheless, our results suggest that the difference in embryogenic capacity between EC and NEC might not be due to DNA variation. However, DNA methylation status could be involved in driving the genetic program toward the embryogenic pathway. To our knowledge this is the first evidence that embryogenic and non-embryogenic clusters are equal at the DNA level, as determined by AFLP's.

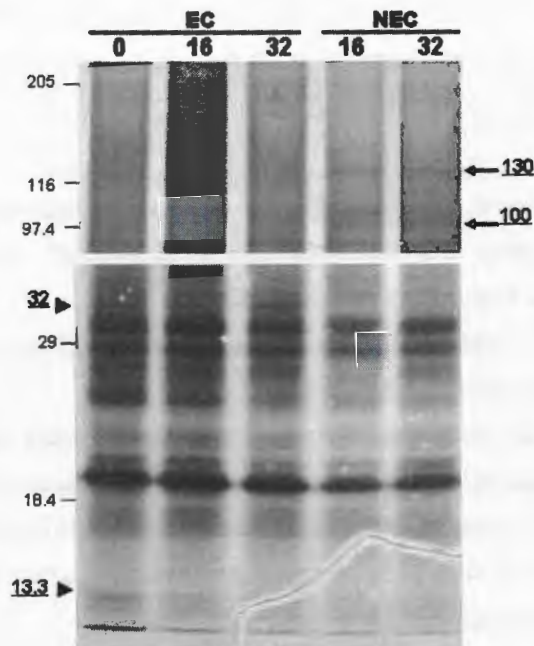
To assess whether there were differences in the gene expression pattern between EC and NEC, samples of RNA from day 16 and day 20 after embryogenesis induction were compared by differential display analysis (Liang and Pardee 1992). Nine combinations of primers were employed and a total of 295 EC and 280 NEC bands, were scored. It is important to note that down-regulation is more abundant in both clusters (3.3%) and the number of regulated genes in EC is much higher (6.8%) than in NEC (3.9%). On the other hand, 17 specific bands were observed in the EC but there were only 3 in the NEC (Table II.1). Our results lead us to propose that differential gene expression can modulate the embryogenetic capacity of coffee cells and that the number of genes turned off in somatic cells, to allow for the change from a somatic to an embryogenic state, is higher than those genes that are turned on.

**Table II.1.** Comparison by differential display analysis of the gene expression patterns from embryogenic and non-embryogenic clusters.

	Embryogenic clusters	Non-embryogenic clusters
Total Bands	295	280
Invariant	275 (93.22%)	269 (96.07%)
Up regulated	7 (2.37%)	5 (1.78%)
Down regulated	13 (4.40%)	6 (2.14%)
Specific	17	3

We analyzed the total protein patterns between EC and NEC by SDS-PAGE. In both clusters, almost the same pattern was found (Figure II.2) except for minor qualitative

differences. Two proteins of 13.3 and 32 kDa (arrowheads) were specific in EC and others of 100 and 130 kDa (arrows) in NEC. Other proteins, such as those of 19, 27 and 29 kDa, were consistently expressed in both clusters. In several species, some proteins are expressed specifically during the development of somatic embryos (Sung and Okimoto 1981; Stirn and Jacobsen 1987). The close similarity observed in the total protein patterns may be due to the fact that clusters have a common origin, but the presence of specific proteins in EC and NEC could indicate that these may be involved in the determination process of embryo formation. These specific proteins could thus serve as biochemical markers for assessing the embryogenic capacity of *in vitro* cultures. Nevertheless, further biochemical studies will be necessary to understand the nature and role of these proteins.



**Figure II.2.** Sodium dodecyl sulfate-polyacrilamide gel electrophoresis profile of intracellular proteins from *Coffea arabica* embryogenic and non-embryogenic clusters. Numbers at the top are days after embryogenesis induction. *Numbers in the left margin refer to the kDa values of marker proteins. Underlined number in both*

margins refer to the molecular weight of the specific proteins in embryogenic (headarrows) and non-embryogenic (arrows) clusters. Analysis was done using 10% SDS-PAGE.

In conclusion, *in vitro* cultures having EC and NEC from the same origin and cultured under the same conditions, offer the possibility of carrying out comparative studies and searches for pathways involved in the complex process of somatic embryogenesis that will allow for a better understanding of the mechanism that drive SE in higher plants.

### **Acknowledgements**

The authors thank F. Barredo-Pool for technical assistance on histological study, and S. Kú-Rodríguez for technical assistance on the electrophoresis study.

### **References**

- Grotkass C., R. Lieberei, W. Preil (1995) Polyphenoloxidase-activity and -activation in embryogenic and non-embryogenic suspension cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Plant Cell Rep.*, 14: 428-431.
- Herman E. B., G. J. Haas (1975) Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10: 588-589.
- Jiménez V. M., F. Bangerth (2001) Hormonal status of maize initial explants and of the embryogenic and non-embryogenic callus cultures derived from them as related to morphogenesis *in vitro*. *Plant Sci.*, 160: 247-257.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Liang P., A. B. Pardee (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257: 967-971.
- Lo Schiavo F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli, M. Terzi (1989) DNA methylation of embryogenic carrot

- cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 325-331.
- Menéndez A., E. G. de Garcia, M. S. Nieto (1994) Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Rep.*, 13: 197-202.
- Müller E., P. T. H. Brownn, S. Hartke, H. Lörz (1990) DNA variation in tissue-culture-derived rice plants. *Theor. Appl. Genet.*, 80: 673-679.
- Nei M., W. H. Li (1979) Mathematical model for studding genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 76: 5269-5273 .
- Nomura K., A. Komamine (1985) Identification and isolation of single cells that produce somatic embryos at a high frequency in a carrot suspension culture. *Plant Physiol.*, 79: 988-991.
- Peterson G. L. (1977) A simplification of protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83: 346-356.
- Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V. M. Loyola-Vargas (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.*, 20: 1141-1149.
- Rojas-Herrera R., F. R. Quiroz-Figueroa, M. Monforte-González, F. Sánchez-Teyer, V. M. Loyola-Vargas (2002) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotech.*, 21: 43-50.
- Saitou N., M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4: 406-425.
- Söndahl M. R., A. Bragin (1991) Somaclonal variation as a breeding tool for coffee improvement, in: 14<sup>o</sup> Colloque de la Association Scientifique Internationale du café, San Francisco, 701-710.
- Staritsky G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Need.*, 19: 509-514.
- Stirn S., H.-J. Jacobsen (1987) Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.*, 6: 50-54.

- Sung Z. R., R. Okimoto (1981) Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78: 3683-3687.
- Tahara M., T. Nakanishi, T. Yasuda, T. Yamaguchi (1995) Histological and biological aspects in somatic embryogenesis of *Coffea arabica*, in: 16<sup>e</sup> Colloque Scientifique International sur le café, Kyoto, 860-867.
- Toonen M. A. J., T. Hendriks, E. D. L. Schmidt, H. A. Verhoeven, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1994) Description of somatic-embryo-forming single cells in carrot suspension cultures employing video cell tracking. Planta, 194: 565-572.
- Van den Bulk R. W., H. J. M. Löfer, W. H. Lindhout, M. Koornneef (1990) Somaclonal variation in tomato: effect of explant source and comparison with chemical mutagenesis. Theor. Appl. Genet., 80: 817-825.
- Vasil V., I. K. Vasil (1981) Somatic embryogenesis and plant regeneration from tissue cultures of *Pennisetum americanum*, and *P. americanum* x *P. purpureum* hybrid. Am. J. Bot., 68: 864-872.
- Vos P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, M. Zabeau (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 23: 4407-4414.
- Wray W., T. Boulikas, V. P. Wray, R. Hancock (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem., 118: 197-203.

## CAPÍTULO III

### HISTOLOGICAL STUDIES ON THE DEVELOPMENTAL STAGES AND DIFFERENTIATION OF SOMATIC EMBRYOGENESIS SYSTEMS OF *Coffea arabica* L.

F. R. Quiroz-Figueroa, R. Rojas-Herrera and V. M. Loyola-Vargas

This chapter is part of an article published in Plant Cell Reports 20(12): 1141-1149, (2002)

#### **Abstract**

Histocytological analysis carried out on callus of *Coffea arabica* undergoing somatic embryogenesis revealed that embryogenic cells were observed within the first week. During indirect embryogenesis, six clear developmental stages were recognized. The embryos were globular-, oblong-, heart-, elongated, torpedo-, and cotyledonary shaped. Cross sections of somatic embryos revealed a well-defined procambium in the globular-stage embryos. Our histological observations indicate that indirect somatic embryos of coffee have a unicellular origin.

**Keywords:** *Coffea arabica*, somatic embryogenesis, histological study, ontogenesis.

#### **Introduction**

The ability to produce morphologically well-formed and normally developed embryos from somatic cells resides uniquely within the plant kingdom (Zimmerman 1993). In addition, the development of somatic and zygotic embryos is highly similar (Zimmerman 1993). Consequently, somatic embryogenesis provides a useful model to study embryo development in plants. In contrast to zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis can easily be observed, the culture conditions can be controlled, and large quantities of embryos can be easily obtained (Kawahara and Komamine 1995).

Two types of somatic embryogenesis are recognized. The term "direct" is applied to explants that undergo a minimum of proliferation before forming somatic embryos, whereas "indirect" refers to explants which undergo an extensive proliferation before the development of somatic embryos (Sharp et al. 1980). It has been suggested that in direct embryogenesis, embryogenic cells are present and simply require favorable conditions for embryo development, while indirect embryogenesis requires the re-determination of differentiated cells (Yeung 1995). However, the terms "direct" and "indirect" are still useful in describing cases in which either very little or a great deal of explant proliferation precedes embryogenesis, while not necessarily indicating fundamental differences in the cells involved (Halperin 1995). Direct somatic embryogenesis is generally considered to have a unicellular origin, whereas in indirect somatic embryogenesis opinions vary with respect to a unicellular or multicellular origin. Histological studies in different species have described both unicellular (Trigiano et al. 1989; Faure et al. 1996) and multicellular (Taylor and Vasil 1996; Fernandez et al. 1999) pathways.

Somatic embryogenesis was first reported in *Coffea canephora* by Staritsky (1970), and in *Coffea arabica* by Söndahl and Sharp (1977). Histogenesis of indirect somatic embryogenesis of *C. arabica* has been described by Söndahl et al. (1979b), Michaux-Ferriere et al. (1989) and Menéndez-Yuffá and de García (1996), but there has been no histological study in coffee that shows the development from one single cell to a somatic embryo.

The aim of the investigation reported here was to compare the most relevant characteristics of the induction of somatic embryogenesis with callus formation. We present here the developmental stages and the differentiation of somatic embryogenesis of *C. arabica* cv. Caturra Rojo and demonstrate that the sequential events in embryo development are conserved and arise through one symmetrical unicellular pathway.



## **Materials and methods**

### **Plant material**

Seeds of *Coffea arabica* cv. "Caturra Rojo", collected from several productive plots at Chiapas, Mexico, were washed and soaked for 24-48 h in sterile distilled water, disinfected with commercial bleach [1.25% (v/v) sodium hypochlorite] for 20 min, and finally rinsed with sterile water. The zygotic embryos were germinated in MS medium (Murashige and Skoog 1962) supplemented with 29.6  $\mu\text{M}$  thiamine, 0.555  $\mu\text{M}$  myo-inositol, 0.41  $\mu\text{M}$  biotin, 0.15  $\mu\text{M}$  L-cysteine, 166.48 mM glucose, 0.53  $\mu\text{M}$  NAA, 2.32  $\mu\text{M}$  Kin, and 0.25% (w/v) Gelrite; the pH was adjusted to 5.7 before autoclaving (20 min, 110°C). Ten embryos were placed in each Magenta plastic box and cultivated at 25 $\pm$ 2°C under a 16/8-h (light/darkn) photoperiod. Plantlets were grown in Magenta boxes containing 40 ml of MS medium, supplemented with 11.86  $\mu\text{M}$  thiamine, 0.56  $\mu\text{M}$  myo-inositol, 0.16  $\mu\text{M}$  L-cysteine, 87.64 mM sucrose, 0.54  $\mu\text{M}$  NAA, 2.32  $\mu\text{M}$  Kin, and 0.25% (w/v) Gelrite; the pH was adjusted to 5.8 before autoclaving (20 min, 110°C). The plantlets were cultured at 25 $\pm$ 2°C under a 16/8-h (light/darkness) photoperiod and transferred to fresh medium every 90 days.

### **Indirect somatic embryogenesis**

*Embryogenic calli induction.* Leaves of somatic plantlets of *C. arabica* cv. Caturra Rojo were cut so as to avoid midvein and edges. Explants were placed on callus induction medium S1i - MS basal salts, 29.6  $\mu\text{M}$  thiamine-HCl, 550  $\mu\text{M}$  myo-inositol, 210  $\mu\text{M}$  L-cysteine, 87.7 mM sucrose, 4.5  $\mu\text{M}$  2,4-D, 9.2  $\mu\text{M}$  Kin, and 0.1% (w/v) Gelrite, pH 5.8 -as described previously by Söndahl and Sharp (1977). Secondary-type creamy-appearing calli were transferred to fresh medium every 4 weeks.

*Embryogenic cell suspension cultures.* Creamy-appearing callus (1-2 g) was used as the starting material to establish embryogenic suspension cultures in 50 mL of liquid medium S1 (medium S1i without Gelrite) in 250 mL Erlenmeyer flasks. The resulting suspensions consisted of clusters of cells (diameter: between 60  $\mu\text{m}$  and 5,000  $\mu\text{m}$ ). These suspensions were maintained at 25 $\pm$ 2°C in the dark on a gyratory shaker at

100 rpm. Subcultures were carried out every 2 weeks by inoculating 2 g of tissue into 50 mL of fresh medium.

*Somatic embryogenesis induction.* After 1 week the suspension cultures maintained in S1 medium were transferred to the embryogenesis induction medium S3: one-half strength MS inorganic salts (except  $\text{KNO}_3$ , which was increased to twice normal strength), 29.6  $\mu\text{M}$  thiamine-HCl, 550  $\mu\text{M}$  myo-inositol, 210  $\mu\text{M}$  L-cysteine, 87.7 mM sucrose, 0.27  $\mu\text{M}$  NAA, 2.3  $\mu\text{M}$  Kin, pH 5.8, as described previously Söndahl and Sharp (1977). The culture conditions was inoculated at a low density (0.25 g of tissue) into 100 mL of medium in 250-mL Erlenmeyer flasks and maintained at  $25\pm 2^\circ\text{C}$  in the dark on a gyratory shaker at 100 rpm. The medium was refreshed every 4 weeks.

### **Histological study**

Samples of embryogenic clusters of cells (40 days) were used for study. Sets of samples were fixed with FAA [10% formalin, 5% acetic acid, 50% ethanol (v/v)] for 24 h under negative pressure (5-10 psi) and dehydrated in a set of increasing ethanol solutions [40%, 60%, 80%, 100% (v/v)] twice for 30 min each step, and embedded in JB-4 resin (JB-4 Embedding Kit, Polyscience). Sections (6  $\mu\text{m}$  thick) were stained with 0.5% toluidine blue in 200  $\mu\text{M}$  acetate buffer. Macroscopic features were photographed using a stereoscope (Stemi SV11, Zeiss) and Kodak Plus-X-Pan film (ASA 125). Photographs of the histological study were taken on a standard Axioplan microscope (Axioplan, Zeiss) and Kodak Plus-X-Pan film (ASA 125) with a green filter.

### **Results and discussion**

Somatic embryos may have either a unicellular or multicellular origin (Zimmerman 1993). In this investigation, we observed the main stages of embryogenesis from one cell to the globular stages; these are presented in Figure III.1. The first stage of embryogenesis, reached within the first week in culture on embryogenesis induction medium, was characterized by a cell with a prominent nucleus and nucleolus, a

dense cytoplasm, and cell walls thicker than normal; it was relatively isodiametric and small with respect to neighboring cells. This embryogenic cell was between 15  $\mu\text{m}$  and 20  $\mu\text{m}$  in diameter and showed signs of polarization (Figure III.1A, arrow). The first division of the embryogenic cell is shown in Figure III.1B; the two proembryogenic cells (arrow) have the same characteristic as the initial proembryogenic cell, but these latter cells are characterized by symmetry in the first division. The division of each of the two cells of the proembryo produced a tetrad of cells (Figure III.1C) in a symmetrical pattern, each one with a prominent nucleus, nucleolus, and thick cell walls. The next step in ontogenesis is the formation of the proembryo (Figure III.1D), which contained about 8-12 cells as can be seen here in a transversal cross section. The proembryos were between 50  $\mu\text{m}$  and 65  $\mu\text{m}$  in length after 1 week in culture. The early division, to form a proembryo of 12 cells, is very similar to the early division in animal embryos (morula stage). A proembryo containing approximately 20 cells is shown in Figure III.1E. After 2 weeks, somatic embryos in the early-globular stages were observed (Figure III.1F-H). In all cases, the protoderm was distinctly differentiated (arrowhead). Some embryos exhibited a suspensor-like structure (Figure III.1H, arrow) with approximately four columns of cells, as also described by Söndahl et al. (1979b).

During indirect embryogenesis, six clear developmental stages were recognized. The embryos were globular-shaped after 2 weeks in culture (Figure III.2A), oblong (Figure III.2B) and heart-shaped (Figure III.2C) after 3 weeks in culture, and elongated (Figure III.2D), torpedo- (Figure III.2E), and cotyledonary-shaped (Figure III.2F) after 4 weeks in culture. In Figure III.2A, globular-shaped embryos with different globular morphological shapes are shown - i.e., early-globular embryos (arrowheads, black and white) and later globular embryos (arrows) with up to 30 embryos per cluster. The next developmental stage, the oblong embryo (Figure III.2B), was around 1 mm in size. The oblong stage is a transition between the globular- and heart-shaped stage. The heart-shaped embryo (Figure III.2C) was three to five times larger than the globular-stage one. In this stage, the cotyledons were initiated (arrowheads), which denotes the beginning of the heart-shaped stage of development. There is

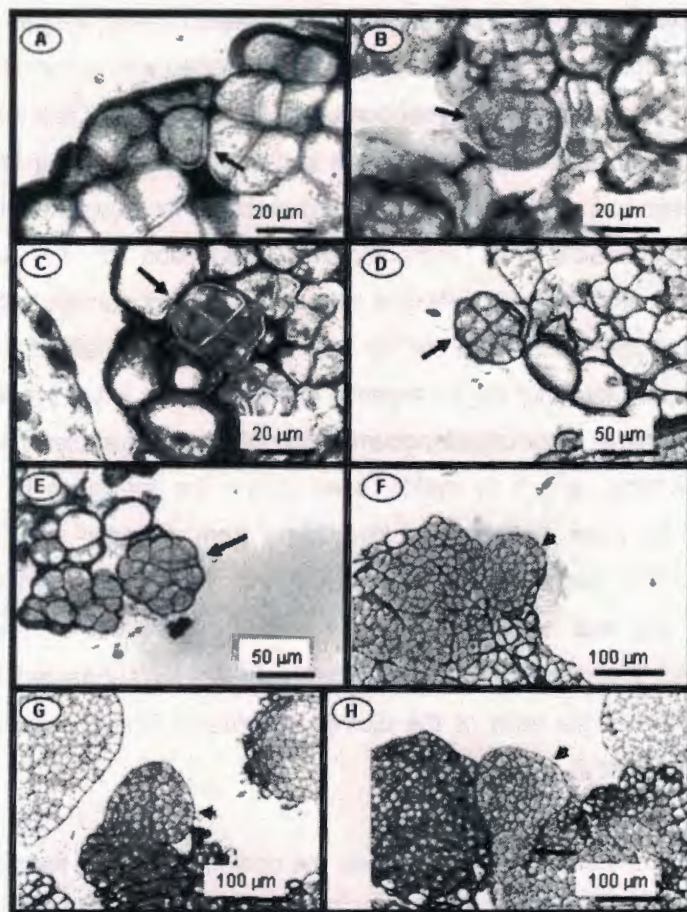
another transition stage between the heart- and torpedo-shaped stages, which is the elongated stage (Figure III.2D). In this stage it was also possible to see a suspensor-like structure (arrowhead). This is the first report of an elongated stage. The final two stages are the torpedo- (Figure III.2E) and cotyledonary-shaped embryos (Figure III.2F). Nakamura et al. (1992) reported five developmental stages for *C. arabica* somatic embryogenesis. The oblong stage that we describe here (Figure III.2B), could be equivalent to the elongated stage reported by Nakamura et al. (1992). Oblong embryos have previously only been reported for *Daucus carota*, and it has been suggested that this shape occurs because the future hypocotyl axis undergoes considerable elongation before the emergence of the cotyledons (Schiavone and Cooke 1985). The transition stage between the heart- and torpedo-shaped embryos (Figure III.2D) was not observed by Nakamura et al. (1992).

The cross sections of somatic embryos in the globular to cotyledonary stages present a well-defined procambium (Figure III.3, arrows). The protoderm was also well-developed; protoderm cells had a prominent nucleolus (data not shown), as a result of a high mitotic activity. Two oblong embryos with well-defined protoderm and procambium are shown in Figure III.3B. The initiation of cotyledonary primordia coincided with the bifurcation of procambium into the cotyledons at the shoot pole (Figure III.3C, arrowheads). In the globular-, oblong, and heart-shaped stages, spherical cells were present, indicating that growth and development were following a normal course. In the embryos from the elongated to cotyledonary stages (Figure III.3D-F), the procambium cells present in the central core (A) were longer than the same cells in the central core (I) of the embryos from the early stages. A well-defined procambium was observed in the globular-stage embryos (Figure III.3A). In *D. carota*, the procambium was only beginning to be seen at the oblong stage, and a well-defined procambium was not observed until the heart-shaped stage (Schiavone and Cooke 1985).

The physiological and morphological maturity of the tissue as well as the components of the culture medium determine the time of occurrence and types of

possible responses in coffee somatic embryogenesis (Loyola-Vargas et al. 1999). Using young leaves from *in vitro* seedling pre-conditioned with growth regulators, we have shortened the embryogenic response time from 6 weeks (Yasuda et al. 1985) to 3 weeks in direct somatic embryogenesis and from 14 weeks (Söndahl and Sharp 1977) to 2 weeks in indirect somatic embryogenesis. This study presents a detailed comparative histological and morphological description of the initiation and development of coffee somatic embryos induced by indirect somatic embryogenesis. In this system, a mixture of NAA and kin was used. In other methods, the formation of embryogenic centers and the emergence of the embryos in the presence of 2,4-D were preceded by a pronounced accumulation of starch granules (Söndahl et al. 1979b). Presumably, starch is rapidly used during the formation of embryogenic regions and has been observed to be absent from globular- and heart-shaped embryos with the exception of suspensor-zone cells. This pattern of starch accumulation and use has been reported earlier in other embryogenic systems (Rodriguez and Wetzstein 1998). It has been previously suggested that embryos develop from the single cells of the clumps previously formed, as in the case of *Cichorium* (Dubois et al. 1991).

Somatic embryogenesis in coffee has been the subject of several histological studies (Söndahl et al. 1979a; Söndahl et al., 1979b; Nassuth et al. 1980; Michaux-Ferrière et al. 1987; Michaux-Ferrière et al. 1989; Nakamura et al. 1992; Tahara et al. 1995; Menéndez-Yuffá and de Garcia 1997). While these studies have provided valuable information, they did not clearly demonstrate embryo development from one single cell to the final stages. Michaux-Ferrière et al. (1989) and Menéndez-Yuffá and de Garcia (1997) provided evidence for the hypothesis that somatic embryos in *Coffea* have unicellular origins. However, in both papers, the main stages of ontogenesis were not observed. In this report, we demonstrate that the sequential events in embryo development arise through symmetric unicellular pathways (Figure III.1). Our histological observations enable us to conclude that indirect somatic embryos of coffee formed in callus, have a unicellular origin. This work provides a basis for further experimentation for studying the effect of changes in the culture procedure.

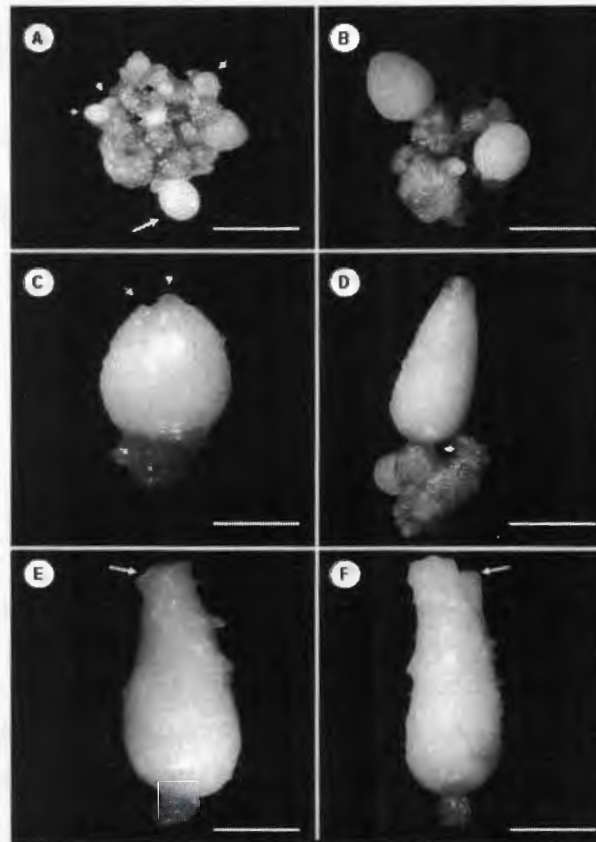


**Figure III.1 A-H.** Indirect embryogenesis of somatic cells of *C. arabica*. **A** Embryogenic cell (arrow), **B** Two-celled stage embryo, **C** Four-celled stage embryo, **D** Proembryo containing 8-12 cells (arrow), **E** Proembryo containing approximately 20 cells, **F-H** somatic embryos at early-globular stages. *Arrows* in **A-E** proembryos, *arrowheads* in **F-H** protoderm, *arrow* in **H** suspensor-like structure. All samples were stained with toluidine blue.

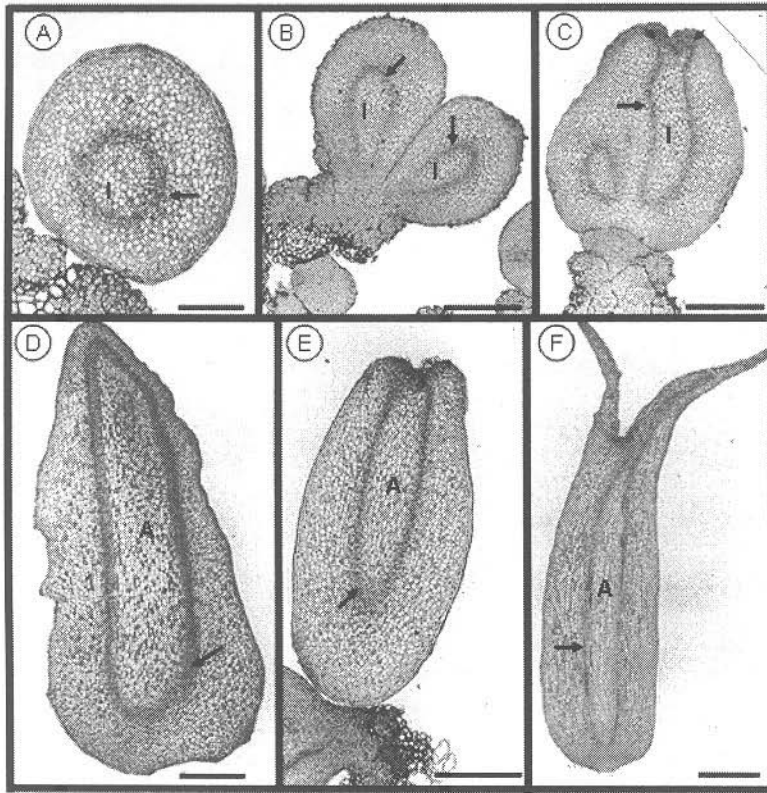
### Acknowledgments

The authors thank Dr. T. Hernández-Sotomayor for her critical reading of the manuscript, M. Méndez-Zeel and M. Monforte-Gonzalez for their technical assistance

with the tissue culture, and F. Barredo-Pool and A. Guzmán-Antonio for their technical assistance with the histological studies.



**Figure III.2 A-F.** Developmental stages of somatic embryos obtained by indirect embryogenesis. **A** Globular embryos. *Arrowheads* early-globular embryos, *arrow* a globular embryo. **B** Oblong embryos. **C** Heart-shaped embryo. *Arrowheads* the cotyledons. **D** Elongated embryo. *Arrow* suspensor-like structure. **E** Torpedo-shaped embryo. **F** Cotyledonary embryo. Bar (A-F): 1 mm.



**Figure III.3 A-F.** Cross-section of different developmental stages of somatic embryos obtained by direct embryogenesis. **A** Globular embryo, **B** oblong embryos, **C** heart-shaped embryo, **D** elongated embryo, **E** torpedo-shaped embryo, **F** cotyledonary embryo. *Arrows* procambium zone, *arrowheads* in **C** a shoot pole, *A, I* procambium cells present in central core (see text). Bar **A**: 200  $\mu\text{m}$ , bar **B-F**: 500  $\mu\text{m}$ . All samples are in transverse section and were stained with toluidine blue.

## References

- Dubois T., M. Guedira, J. Vasseur (1991) Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. An histological and SEM study of early stages. *Protoplasma*, 162: 120-127.



- Faure O., J. Aarouf, A. Nougarede (1996) Ontogenesis, differentiation and precocious germination in anther-derived somatic embryos of grapevine (*Vitis vinifera* L): Proembryogenesis. *Ann. Bot.*, 78: 23-28.
- Fernandez S., N. Michaux-Ferrière, M. Coumans (1999) The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO<sub>3</sub>. *Plant Growth Reg.*, 28: 147-155.
- Halperin W. (1995) *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems, in: *In vitro* Embryogenesis in Plants, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1-16.
- Kawahara R. , A. Komamine (1995) Molecular basis of somatic embryogenesis, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 30-40.
- Loyola-Vargas V. M., C. Fuentes, M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, R. Rojas, J. Mijangos-Cortés (1999) Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation, in: 18<sup>e</sup> Colloque Scientifique International sur le café, Helsinsky, 302-307.
- Menéndez-Yuffá A. , E. de Garcia (1996) *Coffea* species (Coffee), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 35. Trees IV*, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 95-119.
- Menéndez-Yuffá A., E. G. de Garcia (1997) Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma*, 199: 208-214.
- Michaux-Ferrière N., D. Bieysse, D. Alvard, P. Dublin (1989) Étude histologique del l'embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. *Café Cacao Thé*, 33: 207-217.
- Michaux-Ferrière N., P. Dublin, J. Schwendiman (1987) Étude histologique de l'embryogenèse somatique à partir d'explants foliaires de *Coffea arabica* L. *Café Cacao Thé*, 31: 103-111.
- Murashige T., F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.

- Nakamura T., T. Taniguchi, E. Maeda (1992) Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. *Jpn. J. Crop. Sci.*, 61: 476-486.
- Nassuth A., T. M. Wormer, F. Bouman, G. Staritsky (1980) The histogenesis of callus in *Coffea canephora* stem explants and the discovery of early embryoid initiation. *Acta Bot. Need.*, 29: 49-54.
- Rodriguez A. P., H. Y. Wetzstein (1998) A morphological and histological comparison of the initiation and development of pecan (*Carya illinoensis*) somatic embryogenic cultures induced with naphthaleneacetic acid or 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Protoplasma*, 204: 71-83.
- Schiavone F. M., T. J. Cooke (1985) A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell culture. *Can. J. Bot.*, 63: 1573-1578.
- Sharp W. R., M. R. Söndahl, L. S. Caldas, S. B. Maraffa (1980) The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 268-310.
- Söndahl M. R., J. L. Salisbury, W. R. Sharp (1979a) SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in *Coffea* callus cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 185-188.
- Söndahl M. R., W. R. Sharp (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408.
- Söndahl M. R., D. Spahlinger, W. R. Sharp (1979b) A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 101-108.
- Staritsky G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Need.*, 19: 509-514.
- Tahara M., T. Nakanishi, T. Yasuda, T. Yamaguchi (1995) Histological and biological aspects in somatic embryogenesis of *Coffea arabica*, in: 16<sup>e</sup> Colloque Scientifique International sur le café, Kyoto, 860-867.
- Taylor M. G., I. K. Vasil (1996) The ultrastructure of somatic embryo development in pearl millet (*Pennisetum glaucum*; Poaceae). *Am. J. Bot.*, 83: 28-44.
- Trigiano R. N., D. J. Gray, B. V. Conger, J. K. McDaniel (1989) Origin of direct somatic embryos from cultured leaf segments of *Dactylis glomerata*. *Bot. Gaz.*, 150: 72-77.

- Yasuda T., Y. Fujii, T. Yamaguchi (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.*, 26: 595-597.
- Yeung E. C. (1995) Structural and development patterns in somatic embryogenesis, in: *In vitro* Embryogenesis in Plants, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 205-247.
- Zimmerman J. L. (1993) Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants. *Plant Cell*, 5: 1411-1423.



## CAPÍTULO IV

### PATRÓN PROTEICO EXTRACELULAR DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN SUSPENSIONES CELULARES DE *Coffea arabica* L.

F. R. Quiroz-Figueroa, S. C. Kú-Rodríguez y V. M. Loyola-Vargas

Este capítulo fue publicado en la Revista de la Sociedad Química de México 46(3): 259-263, (2002)

#### Resumen

Un amplio número de especies vegetales excretan proteínas al medio de cultivo, algunas de estas proteínas parecen tener alguna función durante la embriogénesis somática. La mayor parte de la información disponible sobre este campo ha sido obtenida con cultivos celulares de *Daucus carota*, por lo que es necesario extender esta área de estudio a otros sistemas. Se obtuvieron cultivos embriogénicos en medio líquido de *Coffea arabica*. Se detectaron proteínas extracelulares en el medio condicionado de las líneas embriogénicas, cuya concentración varió a lo largo del período de cultivo. El perfil electroforético obtenido por electroenfoque y SDS-PAGE mostró la presencia de dos proteínas específicas para la condición embriogénica: ambas con una masa molecular de 27 kDa y con pI 5.7 y 9.4-9.7, respectivamente.

**Palabras clave:** Proteínas extracelulares, *Coffea arabica*, patrón electroforético.

#### Introducción

La mayoría de las especies vegetales cultivadas *in vitro* excretan proteínas al medio de cultivo. Entre las proteínas excretadas por los cultivos, se han detectado enzimas como la peroxidasa (Fry 1980), la fosfatasa (Ciarrocchi et al. 1981), la fumarasa (Kim y Lee 2002), la esterasa (Chibbar et al. 1989), proteasas (Gavish et al. 1991), la  $\alpha$ -manosidasa (Kunze et al. 1998), quitinasas (Esaka et al. 1990) y  $\beta$ -1,3-

glucanasas (Kunze et al., 1998). También se han identificado otras, tales como: inhibidores de proteasas (Ojima et al. 1977; Carlberg et al. 1987), una proteína del tipo de la extensina (Kawasaki 1989), proteínas relacionadas con la patogenicidad (Helleboid et al. 1998), proteínas relacionadas con choque térmico (Mita et al. 1997), una proteína transferidora de lípidos (Sterk et al. 1991), y arabinogalactoproteínas (Fincher et al. 1983). La mayoría de estas proteínas excretadas al medio de cultivo pertenecen al grupo de proteínas relacionadas con los mecanismos de defensa de las plantas. Las proteínas extracelulares que más se han estudiado son las peroxidasas (Chibbar y Van Huystee 1984; Moreno et al. 1990; Shetty et al. 1990).

Se desconoce cuál es la función de las proteínas en el medio de cultivo; sin embargo, se puede especular que una posible función es la modificación de los polímeros de la pared celular. Se ha observado que algunas de estas proteínas juegan un importante papel en el desarrollo del proceso de la embriogénesis somática, ya sea promoviéndolo o inhibiéndolo (Van Engelen y De Vries 1992; Quiroz-Figueroa et al. 2000).

Entre las proteínas que tienen capacidad de promover la embriogénesis somática se identificó una con actividad de peroxidasa, que puede restablecer la capacidad embriogénica inhibida por la tunicamicina en suspensiones celulares de *Daucus carota*. Esta peroxidasa fue purificada del medio de cultivo de las líneas silvestres o sin tratamiento con tunicamicina (Cordewener et al. 1991).

La línea celular mutante *ts11* de *D. carota* puede desarrollar el proceso de la embriogénesis somática en forma normal a 24°C, en tanto que a 32°C el proceso no va más allá del estadio globular, a menos que el sistema sea complementado con medio condicionado de cultivos silvestres o del mismo cultivo a 24°C (Lo Schiavo et al. 1990). Los embriones *ts11* respondieron a la adición de una glucoproteína ácida, la endoquitinasa -EP3- (De Jong et al. 1992; 1995), aumentando el número de embriones globulares a 32°C (Kragh et al. 1996) y restaurando su sistema endomembranal (Baldan et al. 1997). Esta mutante no es capaz de llevar a cabo

apropiadamente la glucosilación de algunas proteínas a la temperatura no permisible.

Proteínas de tipo estructural también se han implicado en varios procesos de diferenciación celular, entre éstos la embriogénesis somática (Pennell et al. 1992; Van Hengel et al. 2002). Kreuger y van Holst (1993; 1995), observaron que las líneas celulares en medio líquido excretaron un grupo característico de arabinogalactoproteínas (AGPs), cuya composición cambió con la edad del cultivo (Kreuger y Van Holst 1993). La adición de AGPs a líneas celulares no-embriogénicas promovió la inducción del potencial embriogénico (Kreuger y Van Holst 1993), mientras que otro grupo de AGPs, no afectó el proceso (Toonen et al. 1997). Egertsdotter et al. (1993) y Egertsdotter y von Arnold (1995), usando como modelo de estudio al abeto (*Picea abies*), determinaron que la adición de proteínas extracelulares, entre ellas las APGs de una línea embriogénica normal a una línea embriogénica anormal tuvieron la capacidad de restaurar la morfología de los embriones.

Toonen et al. (1997) han propuesto la existencia de células nodrizas que podrían producir factores que promueven la embriogénesis, siendo las AGPs aquellas que promoverían el desarrollo de estas células nodrizas. Pennell et al. (1992) y McCabe et al. (1997) localizaron un epítipo, reconocido por el anticuerpo monoclonal JIM8 en las paredes celulares de cierto tipo de células embriogénicas, y ausente en las células no embriogénicas, que podría ser empleado como un marcador temprano de la embriogénesis somática. Además, demostraron que determinado tipo celular fue competente para formar embriones somáticos y al adicionar el medio condicionado de cultivos compuestos por células positivas al JIM8, a los cultivos de células JIM8<sup>-</sup>, éstos últimos formaron y desarrollaron embriones somáticos. Lo interesante en dicho trabajo es que únicamente un sólo tipo de células hizo la diferencia entre los dos grupos.

En el caso de las proteínas extracelulares que inhiben la embriogénesis somática, Gavish et al. (1991; 1992), utilizando como modelo de estudio cultivos de *Citrus aurantium*; determinaron que el desarrollo normal de los embriones somáticos

dependió de manera obligatoria de la ausencia de proteínas glucosiladas de masa molecular entre 53 y 57 kDa. Por otro lado, Coutos-Thevenot et al. (1992) trabajando con suspensiones celulares de un híbrido de uva, evidenciaron el mismo efecto inhibitorio en la embriogénesis, concluyendo que son las moléculas extracelulares mayores de 10 kDa las involucradas en este efecto, posteriormente se demostró que fue un mecanismo proteolítico el implicado en su inhibición (Maës et al. 1997).

El café es una planta de importancia agrícola en diversos países. Se han reportado varios sistemas para la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* en *Coffea* spp. Staritsky (1970) reportó por primera vez la obtención de embriones somáticos en *Coffea canephora*, y Herman y Haas (1975) para *Coffea arabica*. A partir de esas fechas se han desarrollado varios protocolos para la obtención de la embriogénesis somática en el género *Coffea* (Söndahl y Sharp 1977; Söndahl et al. 1979; Dublin 1981; Yasuda et al. 1985). Actualmente poco se sabe acerca de los aspectos bioquímicos y moleculares de la inducción de la embriogénesis somática (Menéndez et al. 1994; Menéndez-Yuffá y De García 1996; Rojas-Herrera et al. 2002; Rojas-Herrera y Loyola-Vargas 2002) y crecimiento celular (Quiroz-Figueroa y Loyola-Vargas 2001) en este género. El objetivo de este trabajo fue analizar los perfiles electroforéticos en geles de poliacrilamida, bajo condiciones desnaturalizantes, en una y dos dimensiones así como por electroenfoque, de las proteínas extracelulares durante el crecimiento sin organización, y después de la inducción de la embriogénesis somática en cultivos *in vitro* de *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo en medio líquido.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal y condiciones de cultivo**

Los cultivos embriogénicos de *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo fueron mantenidos en medio líquido y la embriogénesis fue iniciada como se describió previamente Quiroz-Figueroa (2002), capítulo III.



### **Concentración de proteína extracelular**

El medio de cultivo libre de células fue liofilizado y resuspendido en un volumen igual al 10% del volumen inicial. El medio condicionado fue fraccionado en un equipo de ultrafiltración (Ultrafiltration Cell, model 8050, Amicon Corp.) utilizando membranas con un tamaño de exclusión de 10 kDa, hasta un volumen cercano al 1% del volumen inicial. Después fue liofilizado y resuspendido en un amortiguador de citrato-fosfatos (pH 5.0, 1 mM PMSF, 0.157 mM leupeptina, y 5 mM DTT).

### **Cuantificación de proteína**

El contenido de proteína fue cuantificado por el método de Peterson (1977), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

El análisis de los patrones electroforéticos en 1D se realizó en geles de poliacrilamida al 10% de T y 2.6 % de C bajo condiciones desnaturalizantes (PAGE-SDS), con base en el sistema discontinuo propuesto por Laemmli (1970), cargando 5  $\mu\text{g}$  de proteína total por carril. El análisis de los patrones electroforéticos en 2D, se realizó con el protocolo propuesto por Robertson et al. (1997), utilizando 50  $\mu\text{g}$  de proteína total. Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con plata amoniacal (Wray et al. 1981). El electroenfoque se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 7.5% con un gradiente de pH de amplio rango (Bio-Lyte® 3/10 Ampholyte, BIO RAD) y las bandas se detectaron con el protocolo de Heukeshoven y Dernick (1985).

## **Resultados y Discusión**

### **Cuantificación de proteína extracelular**

Se cuantificó el contenido de proteína total en los concentrados protéicos extracelulares (>10 kDa) obtenidos a partir del medio condicionado. En ambas condiciones, de propagación (S1) e inducción de la embriogénesis somática (S3), se detectó proteína en el medio de cultivo (Cuadro IV.1). Bajo la condición de propagación, en el día cero, hubo una concentración de  $0.96 \mu\text{g ml}^{-1}$  medio, la cual

fue aumentando a lo largo del ciclo de cultivo, alcanzando un valor máximo de 24  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de medio de cultivo para el día de resiembra (día 14), lo que implica un incremento de 25 veces con respecto al día cero. Durante la inducción de la embriogénesis, la concentración de proteína extracelular también aumentó a lo largo del período. Durante los primeros 12 días de inducción el aumento fue pequeño (0.49  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en el día cero y 0.54  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en el día 12); sin embargo, alcanzó una concentración de 9.98  $\mu\text{g ml}^{-1}$  en el día 24, representando un incremento de 20 veces con respecto al día cero.

**Cuadro IV.1.** Concentración de proteína extracelular por mL de medio de cultivo bajo condiciones de propagación (S1) e Inducción de la embriogénesis somática (S3).

Edad del cultivo (día)	Proteína extracelular ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ medio)
S1 0	0.96
14	24.05
S3 0	0.492
12	0.548
16	7.09
24	9.98

En un amplio número de especies vegetales cultivadas *in vitro* se ha reportado la presencia de proteínas extracelulares; por ejemplo, en *Hordeum vulgare* (Nielsen y Hansen 1992) se detectó una concentración máxima de 105  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de medio en el día de resiembra, mientras que la concentración en el día 25 de inducción de la embriogénesis somática fue de 225  $\mu\text{g ml}^{-1}$  de medio. Para las suspensiones celulares de *Solanum tuberosum* (Bredemeijer et al. 1985) y de *Raphanus sativus* (Moreno-Valenzuela et al. 1989) se observó un comportamiento similar. En las

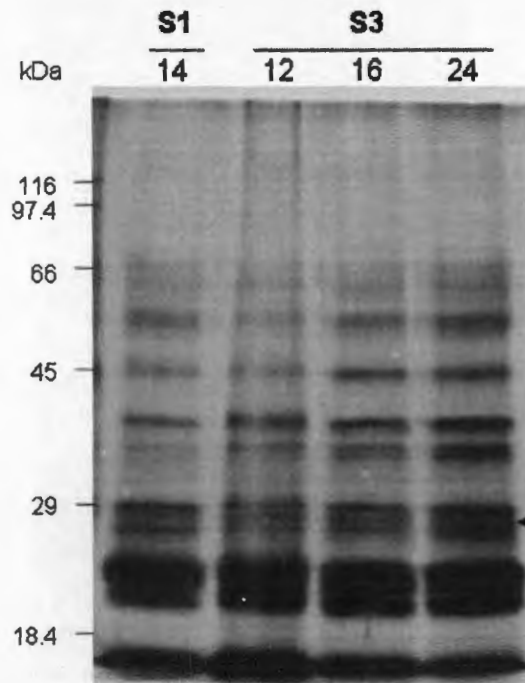
suspensiones celulares de *Coffea arabica* se reportó que durante el crecimiento de una línea celular, la acumulación de proteína extracelular alcanzó una concentración de  $63 \mu\text{g ml}^{-1}$  de medio en el día 24, iniciándose la secreción de una manera lenta, pero ésta aumento rápidamente después del día 12 de cultivo (Quiroz-Figueroa y Loyola-Vargas 2001). Un comportamiento similar se observó durante el período de inducción de la embriogénesis somática. Las diferencias notadas en la concentración de proteína extracelular entre las diferentes especies podría deberse a la especie *per se*, a la densidad del inóculo inicial, a las características de los agregados celulares y/o al estadio fisiológico de los cultivos.

#### **Análisis de los patrones electroforéticos de las proteínas extracelulares**

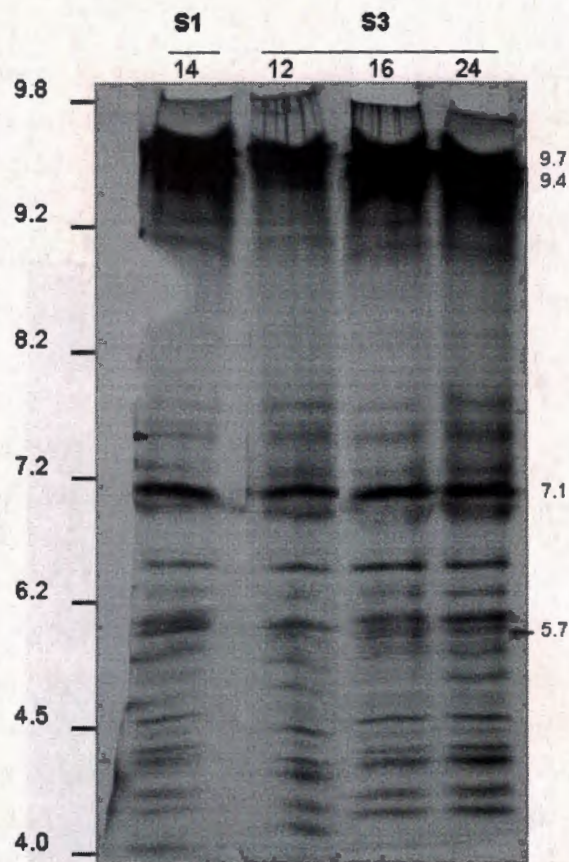
El perfil protéico extracelular obtenido por separación por SDS-PAGE reveló diferencias cualitativas mínimas (Figura IV.1). La poza de proteínas estaba compuesta por polipéptidos con pesos moleculares entre 15 y 61 kDa. Con base en el nivel de detección, las proteínas extracelulares se pueden clasificar en: constitutivas (21, 23, 29 y 40 kDa), que aumentan a lo largo del ciclo de cultivo (26, 31, 44, 52, 53 y 61 kDa) y específica (27 kDa); esta última observada únicamente en S3 (Figura IV.1, flecha). En *D. carota* se identificó una proteína extracelular responsable de la restauración de la embriogénesis en cultivos inhibidos por tunicamicina (Cordewener et al., 1991). Dicha proteína presentó actividad de peroxidasa con un *pI* de 7.6 y una masa de 38 kDa, parecido al de la banda observada exclusivamente en nuestros cultivos en S3. Un total de 10 bandas protéicas fueron detectadas por SDS-PAGE. Este patrón fue menos complejo que los observados en suspensiones celulares de *Spinacia oleracea* con 16 bandas (Fry 1980), *D. carota* con 15 diferentes proteínas (De Vries et al. 1988), *Picea abies* con 20 polipéptidos (Egertsdotter et al. 1993) y *C. arabica* con 30 bandas protéicas (Quiroz-Figueroa y Loyola-Vargas 2001). En general, las proteínas extracelulares secretadas a los medio de cultivo en diversas especies presentan masas moleculares entre 10 y 96 kDa.

El perfil electroforético de las proteínas extracelulares separadas por electroenfoque (gradiente de pH de 3.5 a 10) fue más complejo (Figura IV.2), con respecto al obtenido por SDS-PAGE (Figura IV.1). Se observaron aproximadamente 26 bandas protéicas, con un amplio rango de pl's. En el rango básico se observaron 3 proteínas con pl's entre 9.4-9.7, y una proteína con un pl de 7.1 se presentó en forma abundante. El mayor número de bandas protéicas se encontró en el rango ácido-neutro. Cuando se compararon los perfiles de las proteínas extracelulares en S1, día 14 y S3, presentaron gran similitud, con excepción de una proteína ácida con un pl de 5.7 que estuvo presente en S3 (Figura IV.2, flecha), pero ausente en S1. El perfil protéico extracelular de *Solanum tuberosum* separado por electroenfoque mostró que las bandas se distribuyen a lo largo del rango de pH de entre 3.5 a 9.5 (Bredemeijer et al. 1985); mientras que en cultivos de *D. carota* se detectaron proteínas de pl cercano a 9 con actividad de peroxidasas. En *Dactylis glomerata*, el patrón isoenzimático revelado para estearasa estuvo conformado principalmente de isoformas ácidas (Tchorbadjieva y Odjakova 2001).

Para una caracterización más precisa de las proteínas extracelulares se realizaron separaciones electroforéticas en dos dimensiones. El patrón protéico visualizado en S1 día 14 (Figura IV.3, A) y S3 día 12 (Figura IV.3, B) fue muy similar en el número de polipéptidos, contabilizándose un total de 22 manchas. Sin embargo, cuando se realizaron las separaciones de las proteínas en S3 día 16 y 24, los patrones no tuvieron la resolución adecuada. No obstante, algunas manchas pudieron ser localizadas (ver Figura IV.3, C y D, comparar con A, B). Una mancha de aproximadamente 27 kDa y pl de 9.7-9.4 fue visible en las muestras S3 día 16 (Figura IV.3, C rectángulo) y 24 (Figura IV.3, D rectángulo) que estaba ausente en S1 día 14 (Figura IV.3, A) y en S3 día 12 (Figura IV.3, B). Esa mancha podría corresponder a la proteína observada en la Figura IV.1 (flecha) que fue específica para la condición de embriogénesis; sin embargo, durante el análisis de las proteínas separadas por electroenfoque, ninguna fue específica en el rango 9.7-9.4 de pH. Una explicación para la ausencia de esas proteínas podría ser que éstas coemigraron con otra de pls cercanos, enmascarándose al momento del revelado.



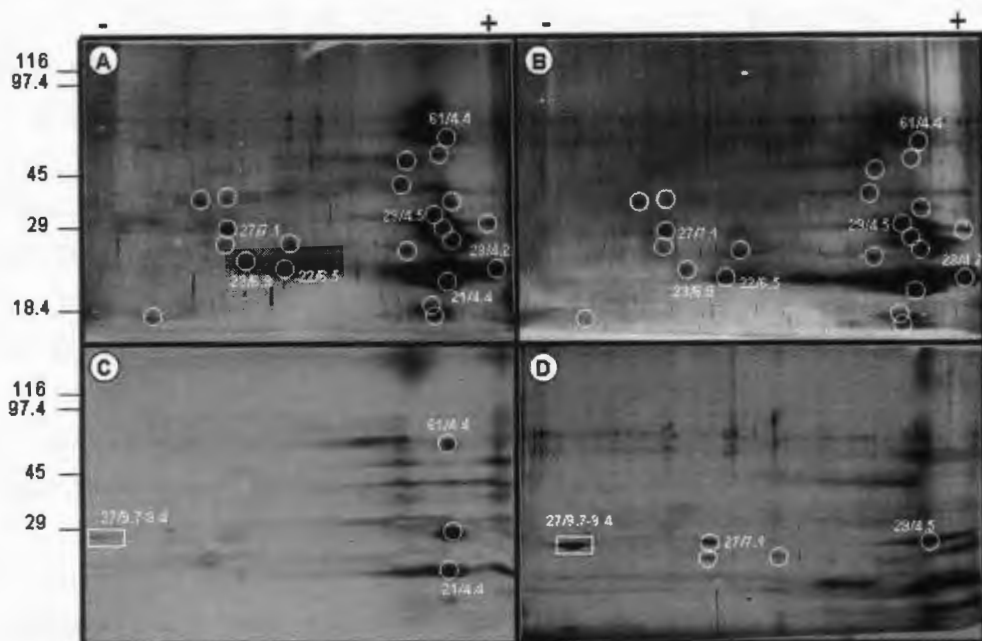
**Figura IV.1.** Perfil electroforético de las proteínas extracelulares bajo condiciones de propagación (S1) e inducción (S3) de la embriogénesis somática. La separación fue realizada en un gel de poliacrilamida al 10% y tefido con plata amoniaca. Los números en la parte superior del gel corresponden a la edad del cultivo en días y los números en la izquierda representan la masa molecular en kDa de proteínas estándar. La *flecha* indica la posición del bandeo específico para la condición de embriogénesis.



**Figura IV.2.** Proteína extracelular bajo condiciones de propagación (S1) e inducción de la embriogénesis (S3), separadas por electroenfoque en un gradiente de pH entre 3.5 y 10. La separación fue realizada en un gel de poliacrilamida al 7.5%. Las proteínas fueron visualizadas con plata amoniacal. Los números en la parte superior del gel corresponden a la edad del cultivo en días. Los números en el lado izquierdo representan el pH, medido con un electrodo capilar. Los números en el lado derecho representan el pI de algunas proteínas. La *flecha* señala una banda específica de la condición S3.

### Reconocimientos

Los autores agradecen el apoyo técnico en la parte de cultivo de tejidos de Marcela Méndez-Zeel.



**Figura IV.3.** Patrón electroforético en dos dimensiones de las proteínas extracelulares bajo condición de propagación en el día 14 (A), bajo inducción de la embriogénesis en el día 12 (B), 16 (C) y 24 (D). Cincuenta microgramos de proteína total fueron utilizados en cada separación. Las bandas protéicas fueron visualizadas con tinción de plata. Los números en la zona izquierda representan la masa molecular en kDa de proteínas estándar. Los signos en la parte superior indica la zona básica (-) y ácida (+). Los círculos representan proteínas detectadas constitutivamente. Los rectángulos representan a la proteína específica de los días 16 y 24 en S3.

### Bibliografía

Baldan B., F. Guzzo, F. Filippini, M. Gasparian, F. LoSchiavo, A. Vitale, S. C. De Vries, P. Mariani, M. Terzi (1997) The secretory nature of the lesion of carrot cell variant ts11, rescuable by endochitinase. *Planta*, 203: 381-389.

- Bredemeijer G. M. M., H. C. J. Burg, K. Sree Ramulu, P. Dijkhuis (1985) Release of peroxidases by cultured potato cells. *Acta Bot. Neerl.*, 34: 325-335.
- Carlberg I., L. Jonsson, A. Bergenstrahle, K. Soderhall (1987) Purification of a trypsin inhibitor secreted by embryogenic carrot cells. *Plant Physiol.*, 84: 197-290.
- Chibbar R. N., P. L. Plowick, W. J. Newsted, J. Shyluk, F. Goerges (1989) Identification and isolation of a unique esterase from the medium of non-embryogenic cell line of cultured carrot cells. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 18: 47-53.
- Chibbar R. N., R. B. Van Huystee (1984) Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.*, 75: 956-958.
- Ciarrocchi G., R. Cella, E. Nielsen (1981) Release of nucleotide-cleaving acid phosphatase from carrot cells grown in suspension culture. *Physiol. Plant.*, 53: 375-377.
- Cordewener J., H. Booij, H. Van der Zandt, F. A. Van Engelen, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, 184: 478-486.
- Coutos-Thevenot P., O. Maes, T. Jouenne, M. C. Mauro, M. Boulay, A. Deloire, J. Guern (1992) Extracellular protein pattern of grapevine cell suspensions in embryogenic and non-embryogenic situations. *Plant Sci.*, 86: 137-145.
- De Jong A. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, 4: 425-433.
- De Jong A. J., T. Hendriks, E. A. Meijer, M. Penning, F. Lo Schiavo, M. Terzi, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1995) Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant ts11. *Dev. Genet.*, 16: 332-343.
- De Vries S. C., H. Booij, R. Janssens, R. Vogels, L. Saris, F. Lo Schiavo, M. Terzi, A. Van Kammen (1988) Carrot somatic embryogenesis depends on the phytohormone-controlled presence of correctly glycosylated extracellular proteins. *Devel. Genet.*, 2: 462-476.



- Dublin P. (1981) Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25: 237-242.
- Egertsdotter U., L. H. Mo, S. Von Arnold (1993) Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.*, 88: 315-321.
- Egertsdotter U., S. Von Arnold (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.*, 93: 334-345.
- Esaka M., K. Enoki, B. Kouchi, T. Sasaki (1990) Purification and characterization of abundant secreted protein in suspension-cultured pumpkin cells. Abundant secreted protein may be a chitinase. *Plant Physiol.*, 93: 1037-1041.
- Fincher G. B., B. A. Stone, A. E. Clarke (1983) Arabinogalactan-proteins: structure, biosynthesis and function. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 34: 47-70.
- Fry S. C. (1980) Gibberellin-controlled pectinic acid and protein secretion in growing cells. *Phytochem.*, 19: 735-740.
- Gavish H., A. Vardi, R. Fluhr (1991) Extracellular proteins and early embryo development in *Citrus* nucellar cell cultures. *Physiol. Plant.*, 82: 606-616.
- Gavish H., A. Vardi, R. Fluhr (1992) Suppression of somatic embryogenesis in *Citrus* cell cultures by extracellular proteins. *Planta*, 186: 511-517.
- Helleboid S., G. Bauw, L. Belingheri, J. Vasseur, J. L. Hilbert (1998) Extracellular  $\beta$ -1,3-glucanases are induced during early somatic embryogenesis in *Cichorium*. *Planta*, 205: 56-63.
- Herman E. B., G. J. Haas (1975) Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10: 588-589.
- Heukeshoven J., R. Dernick (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis*, 6: 103-112.
- Kawasaki S. (1989) Extensin secreted into the culture medium by tobacco cells I. Purification and some properties. *Plant Cell Physiol.*, 30: 259-265.

- Kim S. H., W. S. Lee (2002) Participation of extracellular fumarase in the utilization of malate in cultured carrot cells. *Plant Cell Rep.*, 20: 1087-1092.
- Kragh K. M., T. Hendriks, A. J. De Jong, F. Lo Schiavo, N. Bucherna, P. Hojrup, J. D. Mikkelsen, S. C. De Vries (1996) Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Mol. Biol.*, 31: 631-645.
- Kreuger M., G. Van Holst (1995) Arabinogalactan-protein epitopes in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 197: 135-141.
- Kreuger M., G. J. Van Holst (1993) Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 189: 243-248.
- Kunze I., G. Kunze, M. Bröker, R. Manteuffel, F. Meins Jr., K. Müntz (1998) Evidence for secretion of vacuolar  $\alpha$ -mannosidase, class I chitinase, and class I  $\beta$ -1,3-glucanase in suspension cultures of tobacco cells. *Planta*, 205: 92-99.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227: 680-685.
- Lo Schiavo F., G. Giuliano, S. C. De Vries, A. Genga, R. Bollini, L. Pitto, F. Cozzani, V. Nuti-Ronchi, M. Terzi (1990) A carrot cell variant temperature sensitive for somatic embryogenesis reveals a defect in the glycosylation of extracellular proteins. *Mol. Gen. Genet.*, 223: 385-393.
- Maës O., P. Coutos-Thévenot, T. Jouenne, M. Boulay, J. Guern (1997) Influence of extracellular proteins, proteases and protease inhibitors on grapevine somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 50: 97-105.
- McCabe P. F., T. A. Valentine, F. L. Scott, R. I. Pennell (1997) Soluble signals from cells identified at the cell wall establish a developmental pathway in carrot. *Plant Cell*, 9: 2225-2241.
- Menéndez A., E. G. de Garcia, M. S. Nieto (1994) Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Rep.*, 13: 197-202.
- Menéndez-Yuffá A., E. De García (1996) Análisis de patrones isoenzimáticos en callos embriogénicos y no embriogénicos de café. *Phyton*, 58: 15-22.

- Mita G., G. Nocco, C. Leuci, V. Greco, P. Rampino, C. Perrotta (1997) Secreted heat shock proteins in sunflower suspension cell cultures. *Plant Cell Rep.*, 16: 792-796.
- Moreno O. A., R. Vazquez-Duhalt, H. Nolasco (1990) Extracellular accumulation of high specific-activity peroxidase by cell suspension cultures of cowpea. *Plant Cell Rep.*, 9: 147-150.
- Moreno-Valenzuela O. A., R. Vazquez-Duhalt, J. L. Ochoa (1989) Peroxidase activity in calluses and cell suspension cultures of radish *Raphanus sativus* var. Cherry Bell. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 18: 321-327.
- Nielsen K. A., I. B. Hansen (1992) Appearance of extracellular proteins associated with somatic embryogenesis in suspension cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Plant Physiol.*, 139: 489-497.
- Ojima A., H. Shiota, K. Higashi, H. Kamada, Y. Shimma, M. Waba, S. Satto (1977) An extracellular insoluble inhibitor of cysteine proteinases in cell cultures and seeds of carrot. *Plant Mol. Biol.*, 34: 99-109.
- Pennell R. I., L. Janniche, G. N. Scofield, H. Booij, S. C. De Vries, K. Roberts (1992) Identification of a transitional cell state in the developmental pathway to carrot somatic embryogenesis. *J. Cell Biol.*, 119: 1371-1380.
- Peterson G. L. (1977) A simplification of protein assay method of Lowry *et al.* which is more generally applicable. *Anal. Biochem.*, 83: 346-356.
- Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V. M. Loyola-Vargas (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.*, 20: 1141-1149.
- Quiroz-Figueroa F. R., V. M. Loyola-Vargas (2001) Characterization of extracellular peroxidase released in *Coffea* suspension cell culture, in: 19<sup>th</sup> Colóquio científico e internacional sur le café, (Pauling B., ed.), Association Scientifique International Du Café, Paris. CD.
- Quiroz-Figueroa F. R., R. Rojas-Herrera, F. Sánchez-Teyer, V. M. Loyola-Vargas (2000) Compuestos excretados por los CTV y su papel en la embriogénesis somática, in: Simposia Académico en Honor de la Dra. Estela Sánchez

- Quintanar, (Bernal-Lugo I., H. Loza, eds.), Facultad de Química, UNAM, México, 9-19.
- Roberton E. F., H. K. Dannelly, P. J. Malloy, H. C. Reeves (1997) Rapid isoelectric focusing in a vertical polyacrilamide minigels system. *Anal. Biochem.*, 167: 290-294.
- Rojas-Herrera R., V. M. Loyola-Vargas (2002) Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. *Plant Sci.*, 163: 705-711.
- Rojas-Herrera R., F. R. Quiroz-Figueroa, M. Monforte-González, F. Sánchez-Teyer, V. M. Loyola-Vargas (2002) Differential gene expression during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotech.*, 21: 43-50.
- Shetty K., D. Bothra, D. L. Crawford, R. A. Korus (1990) Extracellular peroxidases as indicators of growth in plant cell suspension cultures. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 24/25: 213-221.
- Söndahl M. R., W. R. Sharp (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408.
- Söndahl M. R., D. Spahlinger, W. R. Sharp (1979) A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 101-108.
- Staritsky G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Need.*, 19: 509-514.
- Sterk P., H. Booij, G. A. Schellekens, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1991) Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. *Plant Cell*, 3: 907-921.
- Tchorbadjieva M., M. K. Odjakova (2001) An acid esterase as a biochemical marker for somatic embryogenesis in Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) suspension cultures. *Plant Cell Rep.*, 20: 28-33.
- Toonen M. A. J., E. D. L. Schmidt, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1997) Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta*, 203: 188-195.

- Van Engelen F. A., S. C. De Vries (1992) Extracellular proteins in plant embryogenesis. *Trends Genet.*, 8: 66-70.
- Van Hengel A. J., A. Van Kammen, S. C. De Vries (2002) A relationship between seed development, arabinogalactan-proteins (AGP) and the AGP mediated promotion of somatic embryogenesis. *Physiol. Plant.*, 114: 637-644.
- Wray W., T. Boulikas, V. P. Wray, R. Hancock (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 118: 197-203.
- Yasuda T., Y. Fujii, T. Yamaguchi (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol.*, 26: 595-597.



## CAPÍTULO V

### PICOMOLAR CONCENTRATIONS OF SALICYLATES INDUCE CELLULAR GROWTH AND ENHANCE SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *Coffea arabica* TISSUE CULTURE

F. Quiroz-Figueroa, M. Méndez-Zeel, A. Larqué-Saavedra and V. M. Loyola-Vargas

This chapter was published in Plant Cell Reports 20(8): 679-684, (2002)

#### Abstract

Embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo were treated with salicylic acid (SA). Two concentrations,  $10^{-12}$  and  $10^{-10}$  M, had a significant effect on the growth rate of the cell cultures when compared to the control, and this effect was concentration-dependent. These two SA concentrations also had a dramatic effect on both the number of somatic embryos and quality, in terms of embryo size and development. In general, the use of SA had a positive effect on cellular growth and somatic embryogenesis, causing a twofold increase in both processes. The increase in the number of somatic embryos could be a reflection of an increase in the number of embryogenic cells induced with SA treatment.

**Keywords:** Salicylic acid, *Coffea Arabica*, Somatic embryogenesis.

#### Introduction

Salicylates belong to a diverse group of plant phenolic compounds usually defined as substances that possess an aromatic ring bearing a hydroxyl group or its functional derivative (Raskin 1992a). Salicylic compounds are ubiquitous in plants (Raskin et al. 1990) and are involved in several biological events, such as flowering (Cleland and Ajami 1974; Kaihara et al. 1981), stomata closure (Larqué-Saavedra 1979),

adventitious root initiation (Kling and Meyer 1983), thermogenesis (Raskin et al. 1987; Raskin et al. 1989; Dat et al. 2000), inhibition of ethylene biosynthesis (Leslie and Romani 1986; Huang et al. 1993), induction of multiple stress tolerance (Senaratna et al. 2000), protection of nitrate reductase from degradation (Jain and Srivastava 1981), resistance to pathogens and the biosynthesis of pathogenesis-related (PR) proteins (in the presence or absence of pathogenic organisms) (Raskin 1992b). In some cases SA suppresses certain resistance mechanisms, such as the synthesis of phytoalexins (Ponchet et al. 1983) or proteinase inhibitors (Doares et al. 1995). It also inhibits abscisic acid-induced abscission (Apte and Laloraya 1982).

Roustan et al. (1989) reported that SA at a concentration of 50  $\mu\text{M}$  stimulated somatic embryogenesis in *Daucus carota*, while in *Pelargonium hortorum* Baily somatic embryogenesis was stimulated by 20  $\mu\text{M}$  SA (Hutchinson and Saxena 1996). In both cases there was a two-fold increase in the number of embryos. However, Nissen (1994) found that SA, when used at a concentration of 100  $\mu\text{M}$ , did not stimulate somatic embryogenesis in carrot but inhibited it. Similar results were obtained in somatic embryogenesis of *Medicago sativa* when SA concentrations were lower than 5  $\mu\text{M}$  (Meijer and Brown 1988). In both of these investigations, ethylene biosynthesis increased.

In *Coffea* spp. several model systems have been reported for somatic embryogenesis induction. *In vitro* somatic embryogenesis of *Coffea canephora* was first reported by Staritsky (1970), who described the induction of callus tissue from orthotropic internodes. Herman and Haas (1975) subsequently obtained somatic embryogenesis in *Coffea arabica* from callus cultures derived from leaf explants. Söndahl and Sharp (1977; 1979) developed a two-phase experimental protocol for somatic embryogenesis from leaves of *C. arabica* var. Bourbon. Dublin (1981) reported somatic embryogenesis from leaf explants of Arabusta using a medium with cytokinins but without auxins. Yasuda et al. (1985) induced embryogenic calli from *C. arabica* leaf explants using 5  $\mu\text{M}$  BA; white and friable calli were initiated after 16 weeks, and somatic embryos were obtained 4 weeks later. Somatic embryogenesis in coffee is very different from somatic embryogenesis in other species. In carrot, the process takes only a few days (Krikorian and Smith 1991), while the best results in



coffee are obtained after several weeks. The group of Söndahl demonstrated the latter when, after several weeks, a small number of somatic embryos were produced in a process called low-frequency somatic embryogenesis; this was followed by the production of somatic embryos on the top of the brown tissue, which was called high-frequency somatic embryogenesis (Söndahl and Sharp 1977).

For transformation and genetic improvement programs, it is desirable to have a faster and efficient protocol by which to produce coffee somatic embryos. In the investigation reported here, we examined the effect of SA on cellular growth and somatic embryo production in cell suspension culture of *C. arabica* cv. Caturra Rojo.

## **Materials and methods**

### **Plant material and culture conditions**

Embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* cv. Caturra Rojo were maintained and embryogenesis was initiated as previously described by Quiroz-Figueroa et al. (2002), chapter III. Briefly, leaves of *in vitro* somatic plantlets of *C. arabica* cv. Caturra Rojo were cut, avoiding the mid-vein and edges. Explants were placed on callus induction medium [S1i; MS basal salts (Murashige and Skoog 1962), 29.6  $\mu$ M thiamine-HCl, 550  $\mu$ M myo-inositol, 210  $\mu$ M L-cysteine, 87.7 mM sucrose, 4.5  $\mu$ M 2,4-D, 9.2  $\mu$ M Kin and Gelrite (0.1% w/v), pH 5.8]. Secondary-type creamish-like calli were transferred to fresh medium every 4 weeks. Embryogenic suspension cultures were established by transferring aliquots (1-2 g) of this creamish-like callus, which was used as the starting material, to 50 ml of liquid medium S1 (medium S1i without Gelrite) in 250-ml Erlenmeyer flasks. These suspensions were maintained on a gyratory shaker at 100 rpm and 25 $\pm$ 2  $^{\circ}$ C in the dark. Subculturing occurred every 2 weeks in 50 ml of fresh medium. After 1 week the suspension cultures, maintained in S1 medium, were transferred to the embryogenesis induction medium [S3; MS inorganic salts at one-half ionic strength (except for KNO<sub>3</sub> which was increased 2x normal strength), 29.6  $\mu$ M thiamine-HCl, 550  $\mu$ M myo-inositol, 210  $\mu$ M L-cysteine, 87.7 mM sucrose, 0.27  $\mu$ M NAA, 2.3  $\mu$ M Kin, pH 5.8]. The culture conditions consisted of a low inoculum density (0.25 g of

tissue), 250-ml Erlenmeyer flask, and 100 ml of medium, with the culture being maintained on a gyratory shaker at 100 rpm and  $25\pm 2$  °C in the dark. The medium was changed every 4 weeks.

### **Salicylic acid assays**

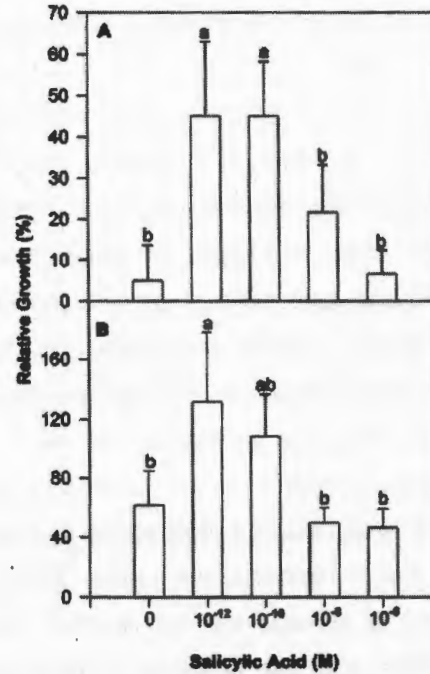
SA, in concentrations varying from  $10^{-12}$  M to  $10^{-6}$  M (in steps of  $10^{-2}$  M) (Larqué-Saavedra and Gutiérrez-Coronado 2000) was first filter-sterilized through a 0.45- $\mu$ m Millipore filter, then added to the propagation medium, pH 5.8. The cultures were maintained for 28 days, with samples being taken at day 14 and day 28 of culture. To evaluate the effect of SA on somatic embryogenesis, we transferred 14-day-old tissues maintained in propagation medium supplemented with  $10^{-12}$  M SA to induction medium supplemented with various concentrations of SA ( $10^{-12}$  to  $10^{-6}$  M at  $10^{-2}$  M steps). After 6 weeks, somatic embryos at different stages of development (globular/heart and torpedo/cotyledonary) were counted under a dissecting microscope.

All experiments consisted of three replicates of each treatment and were repeated at least three times. Data were analyzed by analysis of variance, and the means were compared by the least significant differences (LSD) test at  $P=0.05$ .

### **Results and discussion**

To answer the question of whether SA affected the growth rate of cultured cells, we added SA to the medium during the period of culture. SA was indeed found to influence the growth rate of the cultured cells and the effect was dose-dependent. After 14 days (Figure V.1A), cultures treated with  $10^{-12}$  M and  $10^{-10}$  M SA grew on average 40% more than the control. Relative growth decreased as the concentration of SA increased. The maximum relative growth, at day 28 (Figure V.1B), was obtained using a concentration of  $10^{-12}$  M SA, at which time the increase was 70%

over the control. In general, the higher concentrations did not have a significant effect on cellular growth.



**Figure V.1.** Effect of SA on the relative growth of *Coffea arabica* cell culture after 14 days (A) and 28 days (B) in culture. Different letters indicate that differences are significant at  $P=0.05$ . Relative growth is based on the increment in weight on the determined day with respect to the control (without SA) at day 0 and is expressed as a percentage.

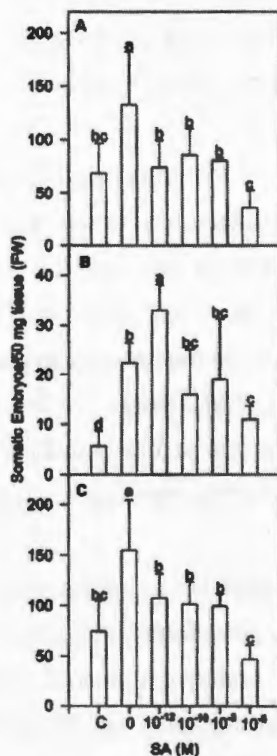
Carswell et al. (1989) reported that micromolar concentrations of ASA increased colony formation from protoplast cultures prepared from an embryogenic suspension culture of inbred elite maize. However, the ASA did not promote the growth rate of protoplast-derived cell colonies. These data are in agreement with our observation that at micromolar concentrations there is no effect on the growth rate of the embryogenic coffee tissues (Figure V.1). However, the response can be dependent

on the species, since in pearl millet (*Pennisetum americanum*) micromolar concentrations of ASA enhanced callus growth on a dry weight basis. There was also a significant reduction in ethylene production in the presence of ASA, which may be responsible for the enhancement in the growth of embryogenic cultures (Pius et al. 1993).

After 14 days, cellular suspensions of coffee cultured on the propagation medium containing  $10^{-12}$  M SA were transferred to embryogenic induction medium either containing no SA or supplemented with different concentrations of SA. The number of somatic embryos at different stages of development (globular/heart and torpedo/cotyledonary) and the total number of embryos were determined after 6 weeks. The highest number of somatic embryos at the globular/heart stages was obtained when the SA was not present in the induction medium (Figure V.2A); this was an exception as none of the SA concentrations had a significant effect on the number of somatic embryos formed when compared to the control. In contrast, all treatments (Figure V.2B) had significant effects on the number of somatic embryos at the torpedo/cotyledonary stages relative to the control. The  $10^{-12}$  M SA treatment had a greater effect in terms of somatic embryo number (Figure V.2B) and quality (measured as embryo size and the absence of malformations) (Figure V.3C). However, SA had no effect on the capacity of the embryos to generate plantlets (data not shown).

When cellular suspensions were maintained in propagation medium supplemented with  $10^{-12}$  M SA and then transferred to induction medium without SA, the cells produced the greatest total number of somatic embryos (Figure V.2C). In *Medicago sativa*, the addition of millimolar concentrations of SA to the differentiation medium resulted in a reduction in the number of somatic embryos, which parallel a substantial increase in ethylene production (Meijer and Brown 1988). In embryogenic suspensions of *Daucus carota*, somatic embryogenesis was stimulated in the presence of SA and ethylene production was inhibited (Roustan et al. 1989). In contrast, Nissen (1994), using embryogenic suspensions of the same species as Roustan et al. (1989), determined that the presence of low concentrations of SA

stimulated the production of ethylene and inhibited the somatic embryogenesis process. In explants of geranium, the presence of ASA during a 3-day period of somatic embryogenesis induction caused a two-fold increase in the number of somatic embryos and enhanced synchronization of embryo development when compared to the control (Hutchinson and Saxena 1996). This is very similar to the results presented here.



**Figure V.2 A-C.** Effect of SA on somatic embryo production of *C. arabica* cell culture. Tissues maintained in propagation medium with SA ( $10^{-12}$  M) until day 14 were transferred to induction medium supplemented with different concentrations of SA. Mean numbers of somatic embryos at the globular/heart stage (A), torpedo/cotyledonary stage (B) and total (C) were taken after 6 weeks of embryogenesis induction. *Treatment C* Propagation and induction tissues without SA. *Different letters* indicate that differences are significant at  $P=0.05$

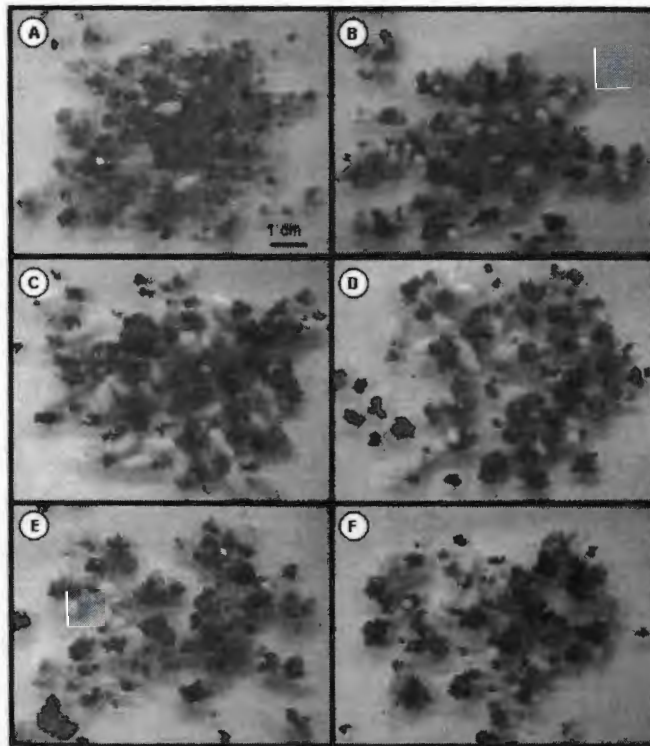
Figure V.3A shows the morphological aspects of embryogenic cellular suspensions produced in the absence of SA (control). The induction of the embryogenic process in the absence of SA in cultures previously grown in the presence of  $10^{-12}$  M SA during the maintenance phase produced a more homogeneous response (Figure V.3B). The presence of  $10^{-12}$  M SA (Figure V.3C) and  $10^{-10}$  M SA (Figure V.3D) during the induction phase of somatic embryogenesis resulted in a better development of the somatic embryos. In addition, the embryos were more abundant and larger than those produced in the absence of SA (Figure V.3A, B) or in the presence of higher concentrations of SA (Figure V.3E, F).

In our investigation, picomolar concentrations of SA had a positive effect on coffee embryogenic cellular suspension cultures, resulting in a two-fold increase in cellular growth and somatic embryogenesis as well as enhancing synchronization. The increased number of somatic embryos could be a consequence of the greater number of embryogenic cells or, as has been previously suggested, to the inhibition of ethylene synthesis (Roustan et al., 1989). On the other hand, the effect of SA at higher concentrations could be due to the possibility that phenolic compounds are able to change the organization of the membrane (Jain and Srivastava 1981).

Prior to this work, and to the best of our knowledge, SA has never been tested at these very low (picomolar) concentrations for its physiological effect, other than in the case of the activation of the systemic acquired resistance pathway in bean (De Meyer et al. 1999). Our results, together with those of other investigators, suggest that SA could be acting as a morphoregulator signal, which supports the hypothesis that SA is functioning as a growth regulator (Raskin 1992b).

The presence of contradictory evidence makes it difficult to explain the mechanism of SA action in the somatic embryogenesis responses observed. The question remains as to whether or not SA directly affects cellular differentiation. However, a possible mechanism could involve ethylene production, since SA at concentrations between 10  $\mu$ M and 100  $\mu$ M stimulated carrot somatic embryogenesis and strongly inhibited

the production of ethylene by blocking the enzymatic conversion of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid to ethylene (Leslie and Romani 1986; Roustan et al., 1989). This effect is dose-dependent, as low concentrations of SA stimulated rather than inhibited ethylene production in other carrot somatic embryogenesis systems (Nissen 1994). This effect is also species-dependent. For example, SA concentrations of 5-20  $\mu\text{M}$  in *M. sativa* inhibited somatic embryogenesis but did not inhibit ethylene biosynthesis (Meijer and Brown 1988).



**Figure V.3 A-F.** Morphology of somatic embryos from *C. arabica* cell culture induced with SA. **A** Without SA in both propagation and embryogenesis induction steps [0/0]. **B** Induction of the embryogenic process in the absence of SA in cultures grown previously in the presence of  $10^{-12}$  M [0/12]. **C** Induction with  $10^{-12}$  M SA in cultures

previously grown in  $10^{-12}$  M SA [12/12]. D Induction with  $10^{-10}$  M SA in cultures previously grown in  $10^{-12}$  M SA [10/12]. E Induction with  $10^{-8}$  M SA in cultures previously grown in  $10^{-12}$  M SA [8/12]. F Induction with  $10^{-6}$  M SA in cultures previously grown in  $10^{-12}$  M SA [6/12]. Photographs correspond to somatic embryos obtained in the experiment reported in Figure V.2 and are representative samples taken from single flasks.

Browning of the tissues, caused by an excessive accumulation of phenolic compounds, is necessary for the somatic embryogenesis process in coffee (Quiroz-Figueroa et al. 2002, chapter III). Similar observations have been reported by other authors (de Garcia and Menéndez 1987; Neuenschwander and Baumann 1992; Van Boxtel and Berthouly 1996; Menéndez-Yuffá and de Garcia 1997). It is possible that these phenolic compounds act as signals to induce the differentiation process. An alternative explanation is the possibility that, due to the chelating properties of these compounds, some inhibitors present in the embryogenic cultures are inactivated.

### **Acknowledgements**

The authors thank Teresa Hernández and Rafael Rojas for their critical reading of the manuscript.

### **References**

- Apte P. V., M. M. Laloraya (1982) Inhibitory action of phenolic compounds on abscisic acid-induced abscission. *J. Exp. Bot.*, 33: 826-830.
- Carswell G. K., C. M. Johnson, R. D. Shillito, C. T. Harms (1989) O-acetyl-salicylic acid promotes colony formation from protoplasts of an elite maize inbred. *Plant Cell Rep.*, 8: 282-284.
- Cleland C. F., A. Ajami (1974) Identification of the flower-inducing factor isolated from aphid honeydew as being salicylic acid. *Plant Physiol.*, 54: 904-906.



- Dat J. F., H. Lopez-Delgado, C. H. Foyer, I. M. Scott (2000) Effects of salicylic acid on oxidative stress and thermotolerance in tobacco. *J. Plant Physiol.*, 156: 659-665.
- de Garcia E., A. Menéndez (1987) Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto 'Catimor'. *Café Cacao Thé*, XXXI: 15-22.
- De Meyer G., K. Capieau, K. Audenaert, A. Buchala, J. P. Métraux, M. Höfte (1999) Nanogram amounts of salicylic acid produced by the rhizobacterium *Pseudomonas aeruginosa* TNSK2 activate the systemic acquired resistance pathway in bean. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12: 450-458.
- Doares S. H., J. Narváez-Vásquez, A. Conconi, C. A. Ryan (1995) Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid. *Plant Physiol.*, 108: 1741-1746.
- Dublin P. (1981) Embryogénese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25: 237-242.
- Herman E. B., G. J. Haas (1975) Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10: 588-589.
- Huang Y. F., C. T. Chen, C. H. Kao (1993) Salicylic acid inhibits the biosynthesis of ethylene in detached rice leaves. *Plant Growth Reg.*, 12: 79-82.
- Hutchinson M. J., P. K. Saxena (1996) Acetylsalicylic acid enhances and synchronizes thidiazuron- induced somatic embryogenesis in geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey) tissue cultures. *Plant Cell Rep.*, 15: 512-515.
- Jain A., H. S. Srivastava (1981) Effect of salicylic acid on nitrate reductase activity in maize seedlings. *Physiol. Plant.*, 51: 339-342.
- Kaihara S., K. Watanabe, A. Takimoto (1981) Flower-inducing effect of benzoic and salicylic acids in various strains of *Lemma paucicostata* and *L. minor*. *Plant Cell Physiol.*, 22: 819-825.
- Kling G. J., M. M. Jr. Meyer (1983) Effects of phenolic compounds and indoleacetic acid on adventitious root initiation in cuttings of *Phaseolus aureus*, *Acer saccharinum*, and *Acer griseum*. *HortScience*, 18: 352-354.

- Krikorian A. D. , D. L. Smith (1991) Somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota*), in: Plant Tissue Culture Manual. Supplement 3, (Lindsey K., ed.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, 1-32.
- Larqué-Saavedra A. (1979) Stomatal closure in response to acetylsalicylic acid treatment. *Z. Pflanzenphysiol.*, 93: 371-375.
- Larqué-Saavedra A. and M. A. Gutiérrez-Coronado (2000) El uso de salicilatos para incrementar la bioproductividad en plantas. Patent. Num. 197888, México.
- Leslie C. A., R. J. Romani (1986) Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.*, 5: 144-146.
- Meijer E. G. M., D. C. W. Brown (1988) Inhibition of somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, amino-oxyacetic acid, 2,4-dinitrophenol and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. *J. Exp. Bot.*, 39: 263-270.
- Menéndez-Yuffá A., E. G. de Garcia (1997) Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma*, 199: 208-214.
- Murashige T., F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Neuenschwander B., T. W. Baumann (1992) A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep.*, 10: 608-612.
- Nissen P. (1994) Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: Effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiol. Plant.*, 92: 397-403.
- Pius J., L. George, S. Eapen, P. S. Rao (1993) Enhanced plant regeneration in pearl millet (*Pennisetum americanum*) by ethylene inhibitors and cefotaxime. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 32: 91-96.
- Ponchet M., V. Duprez, P. Ricci (1983) Suppression of both induced resistance and phytoalexin production by salicylic acid during elicitation of carnation cuttings. *Acta Hort.*, 141: 61-65.
- Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V. M. Loyola-Vargas (2002) Histological studies on the developmental stages and

- differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*.  
Plant Cell Rep., 20: 1141-1149.
- Raskin I. (1992a) Role of salicylic acid in plants. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 43: 439-463.
- Raskin I. (1992b) Salicylate, a new plant hormone. Plant Physiol., 99: 799-803.
- Raskin I., A. Ehmann, W. R. Melander, B. J. D. Meeusen (1987) Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. Science, 237: 1601-1602.
- Raskin I., H. Skubatz, W. Tang, B. J. D. Meeusen (1990) Salicylic acid levels in thermogenic and nonthermogenic plants. Ann. Bot., 66: 369-373.
- Raskin I., I. M. Turner, W. R. Melander (1989) Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 2214-2218.
- Roustan J.-P., A. Latche, J. Fallot (1989) Effet de l'acide salicylique et de l'acide acétylsalicylique sur la production d'éthylène et l'embryogenèse somatique de suspensions cellulaires de carotte (*Daucus carota* L.). C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III, 308: 395-399.
- Senaratna T., D. Touchell, E. Bunn, K. Dixon (2000) Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. Plant Growth Reg., 30: 157-161.
- Söndahl M. R., W. R. Sharp (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z. Pflanzenphysiol., 81: 395-408.
- Söndahl M. R., W. R. Sharp (1979) Research in *Coffea* spp. and applications of tissue culture methods, in: Plant Cell and Tissue Culture: Principles and Applications, (Sharp W. R., P. O. Larsen, E. F. Paddock, V. Raghavan, eds.), Ohio State University Press, Columbus, 527-584.
- Staritsky G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Neod., 19: 509-514.
- Van Boxtel J., M. Berthouly (1996) High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves - Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. Plant Cell Tissue Org. Culture, 44: 7-17.

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

## CAPÍTULO VI

### DISCUSIÓN GENERAL Y PERSPECTIVAS

La totipotencialidad es un importante atributo en las células vegetales, y la embriogénesis somática es su manifestación máxima. El hecho de que los embriones somáticos se puedan desarrollar a partir de células somáticas demuestra que el programa genético para la embriogénesis está totalmente contenido en ellas y que puede “funcionar” en ausencia de los productos de los genes maternos (Zimmerman 1993). La embriogénesis somática ha sido abordada para su estudio desde diferentes campos, como el fisiológico, celular, bioquímico y molecular (Street 1976; Komamine 1992; Zimmerman 1993; Bajaj 1995; Pedroso y Pais 1995; Thorpe 1995; Dodeman et al. 1997; Raghavan 2000; Von Arnold et al. 2002; Rojas-Herrera et al. 2002b); sin embargo, aún estamos lejos de describir y entender en su totalidad dicho proceso. La mayor parte de la información disponible ha sido obtenida con cultivos celulares de *Daucus carota*; no obstante, varias de las conclusiones obtenidas no son aplicables a otras especies, por lo que nos pareció necesario extender los estudios a otros sistemas, como por ejemplo al género *Coffea*.

El café es una planta de importancia agrícola para diversos países. Se han reportado varios sistemas para la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea* spp. Staritsky (1970) describió por primera vez la obtención de embriones somáticos en *Coffea canephora*, mientras que Herman y Haas (1975) lo hicieron para *Coffea arabica*. A partir de esas fechas, varios protocolos han sido desarrollados para la obtención de embriones somáticos (Söndahl y Sharp 1977; Söndahl et al. 1979; Dublin 1981; Yasuda et al. 1985). Actualmente, poco se sabe acerca de los aspectos bioquímicos y moleculares de la inducción de la embriogénesis somática (Menéndez et al. 1994; Menéndez-Yuffá y De García 1996; Rojas-Herrera y Loyola-Vargas 2002; Rojas-Herrera et al. 2002a) y el crecimiento celular (Quiroz-Figueroa y Loyola-Vargas 2001) en este género.

Dentro del campo de investigación de la embriogénesis somática son muchas las áreas que se pueden investigar, tal como se discutió en el Capítulo I. Aunque la información disponible es muy variada, se vislumbra una posible intersección entre la ruta de la embriogénesis somática y los mecanismos de defensa a condiciones ambientales adversas.

Durante la inducción de la embriogénesis somática en la línea celular de *C. arabica* se observó la presencia de dos tipos de agregados (Figura I.1): uno con capacidad embriogénica (EC) y aspecto fenolizado, y otro sin capacidad embriogénica (NEC) de coloración cremosa. La presencia de los dos tipos de agregados celulares, que tienen el mismo origen pero presentan capacidad embriogénica diferencial y se propagan en el mismo medio, puede representar una ventaja sobre otros sistemas, en donde las líneas embriogénicas y no embriogénicas se obtienen a partir de diferentes fuentes de explante o bajo condiciones diferentes.

En el Capítulo II se realizó el análisis de los agregados embriogénicos y no embriogénicos con el objetivo de estudiar el nivel en el que se encuentran las diferencias en la capacidad embriogénica. Los cortes histológicos de los agregados (Figura II.1) indicaron una correlación entre el tipo celular y la capacidad embriogénica del agregado. La diferencia a nivel celular podría ser un reflejo en la variación de la información genética a nivel del ADN, ya que se ha reportado que las condiciones del cultivo pueden inducir estos cambios (Lo Schiavo et al. 1989). Los análisis, empleando la técnica de AFLP's, indicaron que las diferencias en la capacidad embriogénica en los agregados no se deben a variaciones en el ADN; sin embargo, no se puede descartar una regulación transcripcional ocasionada por la metilación del ADN (Kaepler y Phillips 1993), la cual está asociada con el silenciamiento de genes y el control de los transposones (Martienssen y Colot 2001). Esto podría estar ocasionando un redireccionamiento del programa vegetativo al embriogénico. En nuestro conocimiento, este es la primera evidencia que los agregados embriogénicos y no embriogénicos no presentan variaciones a nivel de

ADN. El análisis de la posible participación de la metilación del ADN y qué genes se encuentran así regulados en ambos agregados permitiría profundizar en el conocimiento molecular del proceso.

La diferencia en la capacidad embriogénica de los agregados reside en la expresión diferencial de los genes, ya que usando las técnicas del despliegue diferencial (DD) y electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes (SDS-PAGE) de las proteínas intracelulares (Cuadro II.1 y Figura II.2), se observó que un mayor porcentaje de genes se apagan (4.4%) cuando la respuesta embriogénica es inducida, mientras que un 2.3% se encienden. Un mayor porcentaje (6.7%) de genes cambia su estado en los agregados embriogénicos, en comparación con los no embriogénicos (3.8%). Lo anterior sugiere que durante la embriogénesis somática en *C. arabica*, el programa genético para la embriogénesis implica un apagamiento de un número mayor de genes, contrario a lo observado en otros sistemas, sugiriendo así que el programa embriogénico podría estar sometido al silenciamiento por los productos de genes represores y el apagamiento de los genes represores permitiría la manifestación de la capacidad embriogénica. Es importante hacer notar que no se había reportado que una condición para la manifestación del programa embriogénico fuera el que la expresión de un mayor número de genes se agasaran. Para conocer la identidad de dichos genes, es recomendable clonar y secuenciar las bandas diferenciales derivadas del DD o hibridación sustractiva, deducir el tipo de proteína que codifican, y predecir si se encuentran realmente correlacionados con el proceso de embriogénesis. Son necesarios estudios de hibridación *in situ* para conocer el patrón de expresión en un fragmento determinado, así como para establecer si este fragmento podría ser utilizado como marcador embriogénico. La sobre expresión de los genes correlacionados con la inducción de la embriogénesis o su silenciamiento en el tejido y la posterior evaluación de la capacidad para inducir embriones es uno de los principales retos en la búsqueda de la eficiencia de los sistemas embriogénicos o elucidar los mecanismos involucrados.

Cuando se analizaron los perfiles protéicos intracelulares por SDS-PAGE (Figura II.2) se observaron similitudes, con excepción de la presencia de proteínas agregado-específicas. Varios autores han encontrado la expresión específica de

proteínas (Sung y Okimoto 1981; Chen y Luthe 1987; Stirn y Jacobsen 1987; Tan y Kamada 2000; Cuadrado et al. 2001); sin embargo, es necesario conocer la naturaleza de las bandas de interés para poder determinar su posible función.

El análisis estructural es un importante primer paso en el estudio de la organización de la planta, y es en extremo útil para la morfogénesis (Yeung 1999). Aunque la histogénesis del embrión somático para *C. arabica* ha sido descrita por Söndahl et al. (1979), Michaux-Ferriere et al. (1989) y Menéndez-Yuffá y de García (1996), no hay un estudio histológico en el café que muestre el desarrollo del embrión somático a partir de una célula hasta los estadios finales. En el Capítulo III se describe la ontogenia del embrión somático, observándose las primeras divisiones dentro de la primera semana de inducción de la embriogénesis (Figura III.1). Se reconocieron por primera vez seis estadios de desarrollo para *C. arabica* (Figura III.2). Nakamura et al. (1992) reportaron cinco estadios, de los cuales el de tipo oblongo reportado en nuestro trabajo (Figura III.1B) podría ser el equivalente al de tipo alargado. Los embriones de tipo oblongo también se han descrito en *Daucus carota* (Schiavone y Cooke 1985). Los resultados obtenidos muestran de manera clara que los embriones somáticos presentan un procambium bien definido a partir del estadio de tipo globular (Figura III.3A). En contraste, en *D. carota* no se observó un procambium bien definido sino hasta el estadio de tipo corazón (Schiavone y Cooke 1985). Nuestras observaciones histológicas de la ontogenia del embrión somático en *C. arabica* mostraron una serie de divisiones coordinadas sugiriendo así una ruta de origen unicelular. Conocer y analizar los fragmentos clonados en un sistema embriogénico como el descrito en el Capítulo II vía hibridación *in situ*, al igual el uso de genes reporteros que conlleven los promotores de los genes de interés, serán los próximos campos de investigación que podrían arrojar datos muy importantes para elucidar este proceso de morfogénesis.

En el Capítulo IV se muestran los resultados de los análisis de los perfiles electroforéticos de las proteínas extracelulares durante el crecimiento sin organización y después de la inducción de la embriogénesis somática. Inicialmente



en ambas condiciones se detectaron proteínas en el medio de cultivo, cuyo contenido se incrementó a lo largo del ciclo de cultivo (Cuadro IV.1). El perfil electroforético extracelular separado por SDS-PAGE reveló mínimas diferencias, con excepción de una banda con una masa molecular de 27 kDa específica para la condición embriogénica (Figura IV.1, flecha). Se han reportado proteínas extracelulares en cultivos celulares de *D. carota* (Cordewener et al. 1991; De Jong et al. 1992; De Jong et al. 1995; Kragh et al. 1996) y *Picea abies* (Egertsdotter et al. 1993; Egertsdotter y Von Arnold 1995). Cuando las proteínas fueron separadas por electroenfoque, se observó una banda con pI 5.7 específica para la condición de embriogénesis (Figura IV.2). Al separar las proteínas por electroforesis en dos dimensiones, una mancha de aproximadamente 27 kDa y pI de entre 9.4-9.7 fue visible durante la inducción de la embriogénesis en los días 16 y 24 (Figuras IV.3 C y D, rectángulo), pero estaba ausente en el día 12 y en la condición de propagación. Esa mancha podría corresponder a la proteína observada en la figura IV.1 (flecha), que fue específica para la condición de embriogénesis. En este momento, en el género *Coffea* se carece de información sobre la naturaleza de las proteínas extracelulares, con excepción de un trabajo realizado en una suspensión celular bajo condiciones de propagación (Quiroz-Figueroa y Loyola-Vargas 2001); por ello es necesario identificarlas por medio de la secuenciación de las manchas generadas en las separaciones en 2D.

Un prerequisite para la expresión de la capacidad embriogénica en una línea celular de *C. arabica* es la presencia de un tejido con aspecto fenolizado (Figura I.1). Las plantas del género *Coffea*, en comparación con otros cultivos tropicales, contienen una alta concentración de fenoles (Monaco et al. 1977), lo que ocasiona que las líneas embriogénicas presenten velocidades de propagación muy bajas probablemente debido al efecto tóxico de las quinonas (Monaco et al., 1977). Por lo que para hacer más eficiente el sistema embriogénico, se evaluó el efecto del ácido salicílico (SA) exógeno en el crecimiento y la producción de embriones somáticos (Capítulo V). Se observó que concentraciones picomolares de SA tuvieron un efecto positivo en el crecimiento celular (Figura V.1), producción de embriones somáticos

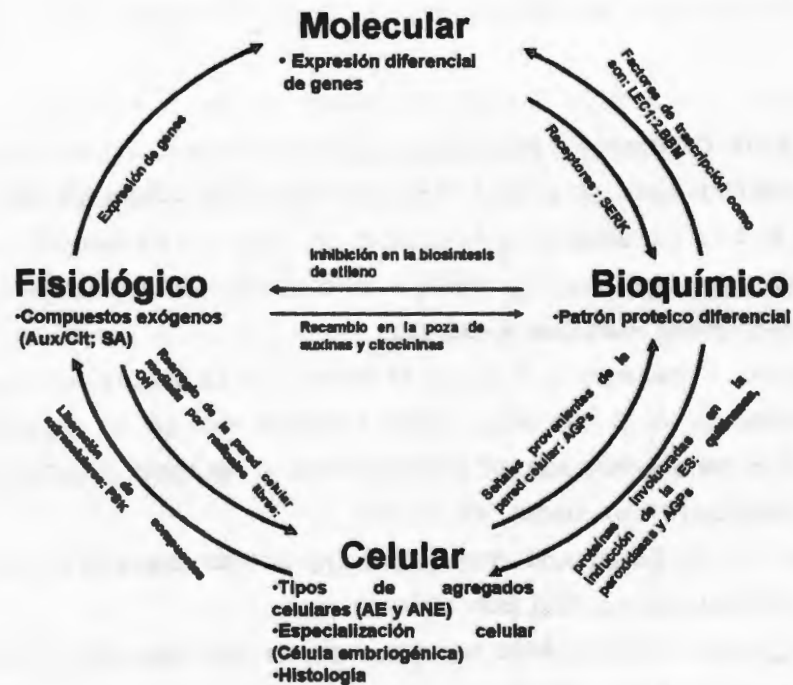
(Figura V.2) y su sincronización (Figura V.3). El efecto promotor podría deberse al incremento en el número de células competentes, o como ha sido previamente sugerido, a la inhibición de la biosíntesis de etileno (Roustan et al. 1989). Las evidencias contradictorias sobre el efecto del SA en la embriogénesis somática (Leslie y Romani 1986; Meijer y Brown 1988; Roustan et al., 1989; Nissen 1994) hacen difícil explicar su mecanismo de acción. No obstante, es evidente que el SA a concentraciones extremadamente bajas pueden modular importantes procesos fisiológicos, lo que apoyaría su función como señal morforegulatoria. Una alternativa para el esclarecimiento del modo de acción es el uso de SA marcado radiactivamente, analizando el metabolismo y las posibles enzimas involucradas. Otra alternativa es el uso de DD para poder clonar aquellos genes que se expresan o inhiben cuando se adiciona SA durante la embriogénesis somática.

La ES es un proceso muy complejo debido a la interacción de una gran cantidad de rutas metabólicas. Sin embargo, realizar estudios detallados desde varios frentes podría permitir conocer y entender cómo estas rutas metabólicas co-existen y cuáles son las señales involucradas para la inducción y el desarrollo del embrión.

La figura VI.1 es un planteamiento teórico de cómo estas interconexiones podrían estarse dando a diferentes niveles en un sistema de ES *in vitro*. Probablemente, la aplicación exógena de alguno de los compuestos (aux/cit, SA) que tienen la capacidad de modular la respuesta embriogénica, estén activando o inhibiendo un grupo particular de genes, induciendo así una reprogramación celular. Como resultado de esta reprogramación, se observe la presencia diferencial de proteínas que podrían ser, ya sean estructurales (AGPs), enzimas (quitinasas, peroxidasa, etc.) o reguladoras (LEC, BBM, PKL). Los cambios a nivel metabólico y fisiológico (relación de aux/cit, sensibilidad) provocarían que las células tomaran rutas diferentes de especialización celular, generándose así células de tipo embriogénica (competente) y no embriogénico. Por otro lado, estas células a su vez pudieran estar secretando compuestos (PSK), proteínas (quitinasas) o liberando señales provenientes de la pared celular que estimulen un rearrreglo del mismo y/o la

inducción en la formación del embrión, actuando así como células con función de nodriza.

Finalmente, los datos presentados en este trabajo muestran que *Coffea arabica* puede servir como un sistema modelo para realizar estudios de diferenciación celular en plantas tropicales. Realizar estudios más detallados en cada uno de los niveles de investigación, permitirá entender cómo una célula somática cambia su programa genético para pasar de un estado vegetativo a uno embriogénico.



**Figura V.1.** Interconexiones entre los diferentes niveles de estudio de la embriogénesis somática.

## Bibliografía

- Bajaj Y. P. S. (1995) Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement, in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 30. Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 105-125.
- Chen L.-J., D. S. Luthe (1987) Analysis of proteins from embryogenic and non-embryogenic rice (*Oryza sativa* L.) calli. *Plant Sci.*, 48: 181-188.
- Cordewener J., H. Booij, H. Van der Zandt, F. A. Van Engelen, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1991) Tunicamycin-inhibited carrot somatic embryogenesis can be restored by secreted cationic peroxidase isoenzymes. *Planta*, 184: 478-486.
- Cuadrado Y., H. Guerra, A. B. Martín, P. Gallego, O. Hita, A. Dorado, N. Villalobos (2001) Differences in invertase activity in embryogenic and non-embryogenic calli from *Medicago arborea*. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 67: 145-151.
- De Jong A. J., J. Cordewener, F. Lo Schiavo, M. Terzi, J. Vandekerckhove, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1992) A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell*, 4: 425-433.
- De Jong A. J., T. Hendriks, E. A. Meijer, M. Penning, F. Lo Schiavo, M. Terzi, A. Van Kammen, S. C. De Vries (1995) Transient reduction in secreted 32 kD chitinase prevents somatic embryogenesis in the carrot (*Daucus carota* L.) variant *ts11*. *Dev. Genet.*, 16: 332-343.
- Dodeman V. L., G. Ducreux, M. Kreis (1997) Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 48: 1493-1509.
- Dublin P. (1981) Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta. *Café Cacao Thé*, 25: 237-242.
- Egertsdotter U., L. H. Mo, S. Von Arnold (1993) Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.*, 88: 315-321.

- Egertsdotter U., S. Von Arnold (1995) Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.*, 93: 334-345.
- Herman E. B., G. J. Haas (1975) Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *HortScience*, 10: 588-589.
- Kaeppler S. M., R. L. Phillips (1993) Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90: 8773-8776.
- Komamine A. (1992) Mechanism of SE in cell cultures: physiology, biochemistry and molecular biology. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28: 11-14.
- Kragh K. M., T. Hendriks, A. J. De Jong, F. Lo Schiavo, N. Bucherna, P. Hojrup, J. D. Mikkelsen, S. C. De Vries (1996) Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant *ts11*. *Plant Mol. Biol.*, 31: 631-645.
- Leslie C. A., R. J. Romani (1986) Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis. *Plant Cell Rep.*, 5: 144-146.
- Lo Schiavo F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli, M. Terzi (1989) DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor Appl Genet* 77: 325-331.
- Martienssen R. A., V. Colot (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science*, 293: 1070-1074.
- Meijer E. G. M., D. C. W. Brown (1988) Inhibition of somatic embryogenesis in tissue cultures of *Medicago sativa* by aminoethoxyvinylglycine, amino-oxyacetic acid, 2,4-dinitrophenol and salicylic acid at concentrations which do not inhibit ethylene biosynthesis and growth. *J. Exp. Bot.*, 39: 263-270.
- Menéndez A., E. G. de Garcia, M. S. Nieto (1994) Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Rep.*, 13: 197-202.
- Menéndez-Yuffá A., E. De García (1996) Análisis de patrones isoenzimáticos en callos embriogénicos y no embriogénicos de café. *Phyton*, 58: 15-22.

- Menéndez-Yuffá A., E. de Garcia (1996) *Coffea* species (Coffee), in: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Vol. 35. Trees IV, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 95-119.
- Michaux-Ferrière N., D. Bieysse, D. Alvard, P. Dublin (1989) Étude histologique del l'embryogenése somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. *Café Cacao Thé*, 33: 207-217.
- Monaco L. C. , M. R. Söndahl , A. Carvalho , O. J. Crocomo , W. R. Sharp (1977) Application of tissue culture in the improvement of coffee, in: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture, (Reinhard E., Y. P. S. Bajaj, eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 109-129.
- Nakamura T., T. Taniguchi, E. Maeda (1992) Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. *Jpn. J. Crop. Sci.*, 61: 476-486.
- Nissen P. (1994) Stimulation of somatic embryogenesis in carrot by ethylene: Effects of modulators of ethylene biosynthesis and action. *Physiol. Plant.*, 92: 397-403.
- Pedroso M. C., M. S. Pais (1995) Factors controlling somatic embryogenesis. Cell wall changes as an *in vivo* marker of embryogenic competence. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 43: 147-154.
- Quiroz-Figueroa F. R., V. M. Loyola-Vargas (2001) Characterization of extracellular peroxidase released in *Coffea* suspension cell culture, in: 19<sup>th</sup> Coloque scientifique e international sur le café, (Pauling B., ed.), Association Scientifique International Du Café, Paris.CD
- Raghavan V. (2000) Embryogenic development of somatic cells and pollen grains, in: *Developmental Biology of Flowering Plants*, Anonymous, Springer-Verlag, New York, 309-322.
- Rojas-Herrera R., V. M. Loyola-Vargas (2002) Induction of a class III acidic chitinase in foliar explants of *Coffea arabica* L. during somatic embryogenesis and wounding. *Plant Sci.*, 163: 705-711.
- Rojas-Herrera R., F. R. Quiroz-Figueroa, M. Monforte-González, F. Sánchez-Teyer, V. M. Loyola-Vargas (2002a) Differential gene expression during somatic

- embryogenesis in *Coffea arabica* L. revealed by RT-PCR differential display. *Mol. Biotech.*, 21: 43-50.
- Rojas-Herrera R., F. R. Quiroz-Figueroa, F. Sánchez-Teyer, V. M. Loyola-Vargas (2002b) Molecular analysis of somatic embryogenesis: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 8: 171-184.
- Roustan J.-P., A. Latche, J. Fallot (1989) Effet de l'acide salicylique et de l'acide acétylsalicylique sur la production d'éthylène et l'embryogenèse somatique de suspensions cellulaires de carotte (*Daucus carota* L.). *C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III*, 308: 395-399.
- Schiavone F. M., T. J. Cooke (1985) A geometric analysis of somatic embryo formation in carrot cell culture. *Can. J. Bot.*, 63: 1573-1578.
- Söndahl M. R., W. R. Sharp (1977) High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408.
- Söndahl M. R., D. Spahlinger, W. R. Sharp (1979) A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 101-108.
- Staritsky G. (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neod.*, 19: 509-514.
- Stirn S., H.-J. Jacobsen (1987) Marker proteins for embryogenic differentiation patterns in pea callus. *Plant Cell Rep.*, 6: 50-54.
- Street H. E. (1976) Experimental embryogenesis -the totipotency of cultured plant cells, in: *The Developmental Biology of Plants and Animals*, (Graham C. F. and P. F. Wareing, eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 73-91.
- Sung Z. R., R. Okimoto (1981) Embryonic proteins in somatic embryos of carrot. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78: 3683-3687.
- Tan S. K., H. Kamada (2000) Initial identification of a phosphoprotein that appears to be involved in the induction of somatic embryogenesis in carrot. *Plant Cell Rep.*, 19: 739-747.
- Thorpe T. A. (1995) *In vitro* embryogenesis in plants, Kluwer Academic Publishers, Netherlands.

Von Arnold S., I. Sabala, P. Bozhkov, J. Dyachok, L. Filonova (2002) Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 69: 233-249.

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

Yeung E. C. (1999) The use of histology in the study of plant tissue culture systems- some practical comments. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 35: 137-143.

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