

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Embriogénesis somática directa a
partir de explantes foliares de
plántulas cultivadas *in vitro* de
Coffea arabica L.**

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

Carlos Francisco de Jesús Fuentes Cerdá

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

**Mérida, Yucatán, México
2001**

DIOS

Concédemel

**Serenidad para aceptar
las cosas que no puedo cambiar,**

**Valor para cambiar
las que si puedo, y**

**Sabiduría para discernir
la diferencia.**

Contenido

	Pág.
Agradecimientos	
Dedicatoria	
Abreviaturas	
Resumen	
Abstract	
Introducción	1
Capítulo 1 Antecedentes	5
1.1 El cultivo de tejidos vegetales	5
1.2 La embriogénesis somática	6
1.3 La importancia del estudio del cafeto	8
1.4 La embriogénesis somática en <i>Coffea</i> spp.	9
1.5. Factores que afectan la embriogénesis somática	17
1.5.1 La planta donadora	18
1.5.2 Explante	18
1.5.3. Medio de cultivo	19
1.5.3.1 Fuente de nitrógeno	19
1.5.3.2 Fuente de carbono	21
1.5.3.3 Calcio y hierro	21
1.5.3.4. Reguladores del crecimiento	22
1.5.3.4.1 Auxinas	22
1.5.3.4.2 Citocininas	22

	Pág.
1.5.3.4.3 Giberelinas	23
1.5.3.4.4 Otros	23
1.5.4 Condiciones del medio ambiente	23
Objetivos	39
Hipótesis	40
Capítulo 2 Coffee Tissue Culture as a New Model for the Study of Somaclonal Variation	41
2.1. Introduction	41
2.2. Results	42
2.3. Conclusions	44
Capítulo 3 Morphological and Histological Analysis of Direct Somatic Embryogenesis in <i>Coffea arabica</i>	49
3.1. Introduction	49
3.2. Materials and methods	50
3.2.1. Plant material	50
3.2.2. Somatic embryogenesis	51
3.2.3. Histological study	51
3.3. Results	51
3.3.1. Embryogenesis induction	51
3.3.2. Morphological stages	52
3.3.3. Ontogenesis of somatic embryo	53
3.4. Discussion	53

	Pág.
Capítulo 4 Modification of the Embryogenic Response of <i>Coffea arabica</i> by the Nitrogen Source	59
4.1. Introduction	59
4.2. Materials and methods	60
4.2.1. Plant material	60
4.2.2. Plantlet culture	60
4.2.3. Somatic embryogenesis induction	60
4.3. Results and discussion	60
Capítulo 5 Conclusiones Generales y Perspectivas	67

Índice de cuadros

	Pág.
Capítulo 1	
1.1. Embriogénesis somática <i>in vitro</i> en <i>Coffea</i> spp.	10
Capítulo 4	
4.1. Effect of nitrogen source on direct somatic embryogenesis induction, total embryos per explant and total embryos per experiment in <i>C. arabica</i> , 120 days after induction.	61
4.2. Effect of different nitrate/ammonium molar ratio on direct somatic embryogenesis induction, total embryos per explant and total embryos per experiment in <i>C. arabica</i> , 120 days after induction.	62

Índice de figuras

	Pág.
Capítulo 1	
1.1 Comparación entre embriogénesis somática y embriogénesis cigótica.	7
1.2. Comparación entre embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta.	8
Capítulo 2	
2.1. Direct somatic embryogenesis in <i>Coffea arabica</i> L.	43
2.2. Histological study of direct somatic embryogenesis in <i>Coffea arabica</i> L.	44
2.3 Effect of nitrogen source on somatic embryogenesis induction in <i>Coffea arabica</i> L.	45
2.4. Effect of nitrogen source on somatic embryogenesis induction in <i>Coffea arabica</i> L. after 120 days of culture.	45
Capítulo 3	
3.1. Morphological stages of direct somatic embryos and adventitious shoot.	52
3.2. Ontogenesis of somatic embryo of <i>Coffea arabica</i> L. obtained by direct embryogenesis.	54
Capítulo 4	
4.1. Effect of the total nitrogen source on direct somatic embryogenesis induction in <i>C. arabica</i> L., 120 days after induction.	61
4.2. Effect of different nitrate/ammonium molar ratios on direct somatic embryogenesis induction in <i>C. arabica</i> L., 120 days after induction.	62

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo financiero a través de la beca de Doctorado (No. de Registro 89534) y del proyecto Estudios Bioquímicos y Moleculares de la Embriogénesis Somática del Café (No. de Registro 4123P-N y 31816-N).

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán, por permitir mi formación en su Programa de Doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas (No. de registro 02940214).

A la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por permitirme realizar la fase experimental de mi trabajo utilizando sus instalaciones y equipo, así como por la asesoría recibida por su personal.

A mis tutores Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, Dra. S. M. Teresa Hernández Sotomayor, Dra. Nancy Santana Buzzy, Dra. Graciela Racagni Di Palma, Dra. Magdalena Segura Nieto, Dr. Manuel de Jesús Soria Fregoso, Dr. Mykola Piven y Dr. Neftali Ochoa Alejo, por su atinada dirección durante el desarrollo y la conclusión del presente trabajo.

Al Consejo del Sistema Nacional de Educación Tecnológica que en el marco del Programa de Mejoramiento del Profesorado, me permitió la obtención del Grado de Doctor en Ciencias (No. de registro 99210P).

A la Dirección General de Educación Tecnológica Agropecuaria, por las facilidades otorgadas durante mi formación.

A la M.C. Lucila Aurelia Sánchez Cach, por sus sugerencias y crítica durante la redacción del documento final.

A mi familia, por su apoyo y respaldo en la vida.

A compañeros y amigos, con contagiar me su entusiasmo y ansia de superación.

Dedicatoria

A Lucy Beatriz y Freddy Jesús

Abreviaturas

2, 4, 5-T	Ácido 2, 4, 5-Triclorofenoxyacético
2,4-D	Ácido 2, 4-Diclorofenoxyacético
ABA	Ácido abscísico
AFLP	Amplified Fragments Lengths Polymorphism
AG ₃ o GA ₃	Ácido giberélico
ANA o NAA	Ácido α -naftalénacético
ASIC	Asociación Científica Internacional del Café
BAP	6-bencilaminopurina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementario
FAA	Formalina-ácido acético-etanol
GOGAT	Glutamato sintasa
GS	Glutamino sintetasa
HFSE o ESAF	Embriogénesis Somática de Alta Frecuencia
IBA o AIB	Ácido indol butírico
Kin	Cinetina
LFSE o ESBF	Embriogénesis Somática de Baja Frecuencia
MS	Murashige y Skoog
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa por transcripción reversa
SCSE o ESAC	Embriogénesis Somática Autocontrolable

Resumen

La embriogénesis somática es el proceso a través del cual las células somáticas de las plantas se convierten en embriones, los cuales son capaces de germinar y desarrollarse hasta producir plantas completas. Este fenómeno puede apreciarse de manera natural en muchas especies; sin embargo fue a finales de los 50's que pudo reproducirse bajo condiciones de laboratorio por dos grupos independientes, Reinert *et al.* en Alemania y Stewart *et al.* en los Estados Unidos, en ambos casos a partir de cultivos celulares de *Daucus carota* L. Esta capacidad de las células somáticas de las plantas cultivadas *in vitro* de formar embriones de forma similar a la embriogénesis cigótica es una de las características más interesantes de las plantas y el mejor ejemplo del concepto de totipotencia, que señala que toda célula viviente normal posee la capacidad de regenerar un organismo completo, según propuso Haberlandt en 1902. Desde el principio se visualizó el potencial de este fenómeno tanto para la ciencia básica como para la ciencia aplicada. En el primer caso resulta fundamental para establecer comparaciones con la embriogénesis cigótica y procesos de desarrollo. En la segunda instancia resulta de enorme utilidad para la propagación clonal pues permite obtener un gran número de plantas en lapsos más breves que en los métodos tradicionales de micropagación.

Hoy en día, a pesar de que existen alrededor de un centenar de hectáreas sembradas con cultivos provenientes de la inducción *in vitro* de la embriogénesis somática, son escasos los éxitos relacionados con especies leñosas y más aún de habitat tropical.

De lo anterior surgió el interés de estudiar este fenómeno en *Coffea arabica* L. una especie de gran valor comercial en el mundo y para México en particular, por ser éste uno de los principales países productores y exportadores en el mundo.

En el presente documento, en el Capítulo 1 se describen brevemente las generalidades del cultivo de tejidos vegetales; de la embriogénesis somática y los principales factores que influyen sobre ella; así como la importancia del género *Coffea* y los antecedentes relacionados con la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* para las especies más importantes de este género.

En el Capítulo 2, se describe el protocolo generado para la inducción de la embriogénesis somática directa en *C. arabica* L. usando fragmentos de hojas, el explante más recurrido para este género, pero con la modificación de usar plántulas cultivadas *in vitro*, en lugar de plantas adultas. Además, se utiliza un solo medio para establecer todo el proceso y como regulador del crecimiento exógeno sólo se adiciona una citocinina (BAP). Este protocolo reviste particular importancia por su potencial en la investigación al completarse el proceso en unas cuantas semanas, y también por la estabilidad genética de las plantas regeneradas pues los ensayos realizados para detectar variación somaclonal no muestran variación genética.

En el Capítulo 3, se muestra el análisis histológico del proceso antes señalado, observándose que las estructuras organizadas que dan origen a los embriones somáticos surgen directamente del explante, comprobando de esta manera que se trata de embriogénesis somática directa. Además se observó que los embriones surgen de células pequeñas isodiamétricas con citoplasmas densos que transitan por una serie

de divisiones organizadas al igual que lo señalado por la literatura para otras especies. Finalmente, pudo establecerse el origen unicelular para los embriones somáticos de esta especie.

En el Capítulo 4, se demuestra el efecto de la modificación de la fuente nitrogenada sobre la respuesta de los explantes, mostrándose que concentraciones mayores a 15 mM de nitrógeno total en el medio inhiben fuertemente la respuesta del tejido, además se precisa la presencia de nitrato y amonio en el medio para obtener respuesta.

Se concluye con el análisis general del trabajo y las perspectivas que plantea este modelo como una poderosa herramienta para el estudio de este proceso para esta especie y también para *C. canephora*, la segunda especie en importancia de este género. Aunque el número de plantas regeneradas es bajo en comparación a los protocolos descritos para inducir la embriogénesis somática indirecta, la ventaja de utilizar este modelo se fundamenta en la obtención de respuesta en poco tiempo.

Abstract

Somatic embryogenesis is a process through plant somatic cells become embryos, which are capable of germinate and to develop until whole plant regeneration. This phenomenon can be appreciated in natural way in many species; however it was in the 50's that could be reproduced under conditions of laboratory for two independent groups, Reinert *et al.* at Germany and Stewart *et al.* at United States, in both cases from cultured cells of *Daucus carota* L. This capacity of *in vitro* cultured somatic cells of plants to form embryos in similar way to zygotic embryogenesis is one of the most interesting characteristics of plants and the best example of concept of totipotency, that indicates every normal living cell possesses capacity of regenerate a complete organism, as proposed Haberlandt in 1902. Potential of this phenomenon was visualized so much for basic and applied research. In the first case its fundamental to establish comparisons with zygotic embryogenesis and development processes. In a second instance, results of enormous utility for the clonal propagation therefore permits to obtain a great number of plants in briefer interim than traditional micropropagation methods. Nowadays, in spite of exist around a hundred of hectares sown with crops originating from somatic embryogenesis, they are scarce the successes related to woody species and more still from tropical habitat. Of previous, interest arose for study this phenomenon in *Coffea arabica* L. a specie of great commercial value in the world and for Mexico in particular, because it is one of the main exporting and producing countries in the world.

In this document, in Chapter 1 are described briefly the generalities of plant tissue culture and somatic embryogenesis in particular, importance of *Coffea* genus and reports related to somatic embryogenesis in this genus.

In Chapter 2, a protocol generated to induce direct somatic embryogenesis is described, by first time, for *C. arabica* L., using leaves fragments, explants most used for this genus, but using *in vitro* cultured plantlets adult plants. Furthermore, it is used a single medium to establish all process and only a citokinin (BAP) like exogenous plant growth regulator is added. This protocol has particular importance by its potential in research because process is completed in only a few weeks, and also by genetic stability of regenerate plants since screenings to detect somaclonal variation do not showed genetic variation.

In Chapter 3, a histological analysis of the process before is shown, organized structures that give rise somatic embryos emerge directly from explant, proving this is a direct somatic embryogenesis. Furthermore, it was observed that embryos arose from small and isodiametrics cells with dense cytoplasm that undergo a series of organized divisions as indicated in literature for other species. Finally, it could be established the unicellular origin for somatic embryos.

In Chapter 4, the effect of source nitrogen modification on explants response is demonstrated, greater concentrations to 15 mM of total nitrogen in culture medium inhibit strongly response of process, furthermore both nitrate and ammonium are required in culture medium to obtain response.

Finally, general analysis of the work are described and also, the perspectives that outline this model as a powerful tool for the study of the process for this species and also for *C. canephora*, the second species in importance of this genus. Although the number of regenerated plants is low in comparison to the protocols described for inducing the indirect somatic embryogenesis, the advantage of using this model is based on the short time in which the response is obtained.

Introducción

El cultivo de tejidos vegetales representa una valiosa herramienta para la propagación masiva de cultivos tropicales, tales como plátano y palma de aceite, sin embargo, el costo de este conjunto de técnicas resulta elevado, por lo que en la actualidad se buscan técnicas que permitan la multiplicación masiva de materiales sobresalientes a bajo costo; bajo este contexto, la inducción de la embriogénesis somática *in vitro* es la metodología que resulta más prometedora en virtud del elevado número de individuos que se pueden obtener en cada ciclo de cultivo.

La embriogénesis somática es la formación de un embrión a partir de una célula que no es gamética ni producto de la fusión de gametos. Este fenómeno se conoce en la naturaleza como embriogénesis adventicia, una forma de apomixis. Reinert *et al.* y Stewart *et al.*, de manera independiente, describieron este proceso morfogenético en 1958. A partir de lo anterior, se ha generado mucha información relacionada al fenómeno, sin embargo la inducción exitosa de embriones somáticos y la subsecuente recuperación de plantas viables aún entrañan dificultades para la mayoría de las especies.

No obstante lo anterior, la tendencia mundial actual se inclina fuertemente hacia la embriogénesis somática, dado que la posibilidad de obtener embriones somáticos a partir de cultivos celulares presenta ventajas que no son posibles cuando las plantas son regeneradas mediante organogénesis, por ejemplo, la embriogénesis somática genera estructuras bipolares que cuentan tanto con ápices radiculares como caulinares, iniciándose ambos meristemos en un solo paso. Además los cultivos embriogénicos pueden producir gran número de embriones por contenedor, muchos más que los brotes múltiples generados adventiciamente vía organogénesis. También debe considerarse que al emplear medios líquidos en los cultivos en suspensión, los embriones están separados y flotan libremente en el medio, por lo que no es preciso separarlos manualmente. Finalmente, debemos señalar la posibilidad de inducir la dormancia en los embriones obtenidos para incorporarlos en semillas artificiales mediante su encapsulación, lo cual facilitaría su almacenamiento, transporte y plantación.

La embriogénesis somática ha sido estudiada ampliamente en zanahoria y menos profusamente en alfalfa. Recientemente, también se está estudiando intensamente en *Arabidopsis thaliana*. Sin embargo, si bien estos estudios han aportado la base para iniciar el estudio en especies tropicales, por ejemplo, en lo concerniente al efecto de la aplicación de auxinas exógenas, resulta difícil extrapolar los resultados obtenidos en zanahoria por tratarse de especies de hábitat diferente.

En la actualidad, la embriogénesis somática se utiliza para propagar masivamente en forma, semicomercial: palma de aceite, palma datilera, pino y pícea.

Hoy en día, la propagación masiva con fines comerciales del cafeto se obtiene por esquejes, sin embargo, el diseño de un sistema eficiente, tanto para la inducción de la embriogénesis somática, como para la obtención de semillas artificiales, permitirá la plantación de extensiones con una población homogénea de individuos de alta calidad (élite), lo cual redundará en el beneficio económico que pudiera obtener el productor cafetalero. Para lo anterior resulta indispensable la comprensión no sólo del proceso embriogénico en sí, sino también de las enzimas clave y/o genes participantes en dicho fenómeno, lo cual permitiría en un momento dado su manipulación y eficientización.

Una de las dificultades fundamentales en las especies tropicales, consiste en la presencia de compuestos fenólicos que, por lo general, resultan desfavorables para la embriogénesis somática, mientras que en zanahoria no están presentes. Otro factor que resulta imposible soslayar son los efectos del etileno, que en el cafeto parece ser indispensable para que la embriogénesis tenga lugar (Hatanaka et al., 1995), en tanto que este mismo regulador inhibe el proceso en zanahoria (Roustan et al., 1994).

Por lo anterior, resulta indispensable estudiar los aspectos fundamentales de la embriogénesis somática en especies tropicales de importancia comercial tales como plátano, coco, cafeto y otros.

Los aspectos bioquímicos y moleculares que se llevan a cabo, antes y durante la embriogénesis no se han estudiado en cafeto. No se ha abordado ningún estudio bioquímico, fisiológico ni molecular, con la única excepción del realizado por Menéndez et al. (Menéndez et al., 1994; 1994). La fuente de nitrógeno del medio de cultivo podría ser determinante en el proceso embriogenético. Aclarar este punto es vital, dado que la hipótesis más aceptada actualmente es que para la primera fase de la inducción se requiere de una auxina (generalmente 2, 4-D), pero no de los compuestos nitrogenados, en tanto que en la segunda fase se requiere de nitrógeno reducido.

En general, poco se conoce sobre el metabolismo del nitrógeno durante el proceso de embriogénesis somática. Los pocos estudios que se han realizado se han centrado en la determinación de la poza de aminoácidos y del efecto de análogos de éstos (Kamada y Harada, 1984; Siriwardana y Nabors, 1983; Shetty y Asano, 1991; Skokut et al., 1985; Stuart y Strickland, 1984b; Stuart y Strickland, 1984a). y del efecto de algunos inhibidores enzimáticos en la vía de las poliaminas (Khan y Minocha, 1991; Minocha y Khan, 1991; Mengoli et al., 1989).

Entre los posibles factores que pueden afectar el proceso embriogénico en cafeto y que no se han estudiado a fondo, se encuentran los niveles endógenos de etileno (Hatanaka et al., 1995), la concentración de auxinas en los tejidos, las fuentes de carbono y nitrógeno y los niveles de calcio. También es preciso profundizar en el efecto del agente gelificante y en la fisiología de dicho fenómeno, particularmente en el metabolismo del agua. El conocimiento de este último fenómeno será indispensable para la producción de semilla artificial,

La embriogénesis somática en cafeto ha sido llevada a cabo a partir de cultivos embriogénicos y procede en tres etapas, dependiendo de las condiciones del cultivo, Söndhal y Sharp, (1977) establecieron que en una primera etapa se producen embriones a baja frecuencia (ESBF) y en una segunda etapa se producen embriones a alta frecuencia (ESAF). Recientemente Neuenschwander y Baumann, (1992) demostraron que existe un tercer tipo de embriogénesis en los cultivos de cafeto, la embriogénesis autocontrolable, (ESAC ó SCSE, por sus siglas en inglés); el que el proceso se lleve de una manera u otra depende de las condiciones de cultivo.

REFERENCIAS

- Hatanaka T., E. Sawabe, T. Azuma, N. Uchida y T. Yasuda, THE ROLE OF ETHYLENE IN SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM LEAF DISKS OF COFFEA CANEPHORA, *Plant Sci.*, 107: 199-204, (1995).
- Kamada H. y H. Harada, CHANGES IN ENDOGENOUS AMINO ACID COMPOSITIONS DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS IN DAUCUS CAROTA L., *Plant Cell Physiol.*, 25: 27-38, (1984).
- Khan A. J. y S. C. Minocha, POLYAMINES AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CARROT. 2. THE EFFECTS OF CYCLOHEXYLAMMONIUM PHOSPHATE, *J. Plant Physiol.*, 137: 446-452, (1991).
- Menéndez A., E. G. de Garcia y M. S. Nieto, COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN ELECTROPHORETIC PATTERNS DURING EMBRYOGENESIS IN COFFEA ARABICA CV CATTIMOR, *Plant Cell Rep.*, 13: 197-202, (1994).
- Mengoli M., N. Bagni, G. Luccarini, R. V. Nuti y D. Serafini-Fracassini, DAUCUS CAROTA CELL CULTURES: POLYAMINES AND EFFECT OF POLYAMINE BIOSYNTHESIS INHIBITORS IN THE PREEMBRYOGENIC PHASE AND DIFFERENT EMBRYO STAGES, *J. Plant Physiol.*, 134: 389-394, (1989).
- Minocha S. C. y A. J. Khan, EFFECTS OF COMBINATIONS OF POLYAMINE BIOSYNTHETIC INHIBITORS ON CELLULAR POLYAMINES IN CARROT CELL CULTURES, *J. Plant Physiol.*, 137: 507-510, (1991).
- Neuenschwander B. y T. W. Baumann, A NOVEL TYPE OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEA ARABICA, *Plant Cell Rep.*, 10: 608-612, (1992).
- Roustan J.-P., A. Latché y J. Fallot, ROLE OF ETHYLENE ON INDUCTION AND EXPRESSION OF CARROT SOMATIC EMBRYOGENESIS: RELATIONSHIP WITH POLYAMINE METABOLISM, *Plant Sci.*, 103: 223-229, (1994).
- Shetty K. y Y. Asano, SPECIFIC SELECTION OF EMBRYOGENIC CELL LINES IN AGROSTIS ALBA L. USING THE PROLINE ANALOG THIOPROLINE, *Plant Sci.*, 79: 259-263, (1991).
- Siriwardana S. y M. W. Nabors, TRYPTOPHAN ENHANCEMENT OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN RICE, *Plant Physiol.*, 73: 142-146, (1983).
- Skokut T. A., J. Manchester y J. Schaefer, REGENERATION IN ALFALFA TISUE CULTURE. STIMULATION OF SOMATIC EMBRYO PRODUCTION BY AMINO ACIDS AND N-15 NMR DETERMINATION OF NITROGEN UTILIZATION, *Plant Physiol.*, 79: 579-583, (1985).
- Söndahl M. R. y W. R. Sharp, HIGH FREQUENCY INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN CULTURED LEAF EXPLANTS OF COFFEA ARABICA L., Z. *Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408, (1977).
- Stuart D. A. y S. G. Strickland, SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM CELL CULTURES OF MEDICAGO SATIVA L. I. THE ROLE OF AMINO ACID ADDITIONS TO THE REGENERATION MEDIUM, *Plant Sci. Lett.*, 34: 165-174, (1984a).

Stuart D. A. y S. G. Strickland, SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM CELL CULTURES OF MEDICAGO SATIVA L. II. THE INTERACTION OF AMINO ACIDS WITH AMMONIUM, *Plant Sci. Lett.*, 34: 175-181, (1984b).

CAPÍTULO 1

Antecedentes

1.1. EL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

El término cultivo de tejidos *in vitro* comprende, en su acepción más amplia, un heterogéneo grupo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal: protoplasto, célula, tejido, órgano) se cultiva asepticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

Aún cuando es difícil determinar un punto de partida en el origen del cultivo de los tejidos vegetales, podemos remontarnos a 1860-1861, años en que Sacko en 1860 y Knops en 1861, descubrieron que las sustancias más importantes absorbidas por las plantas eran los compuestos orgánicos. El resultado de estas observaciones fue la elaboración de una sustancia nutritiva (solución de Knops) empleada hasta la fecha y que históricamente se usó como componente básico de los medios de cultivo para las plantas (Villalobos, 1990).

Otros estudios de importante repercusión fueron los llevados a cabo por Vöchting (1878), referentes a la polaridad en la formación de las nuevas yemas. Este investigador concluyó, que el destino de las células se define por el corte y no depende del tamaño de las ramas. En parte, estos estudios fueron inspirados por los realizados previamente por Schwann (1839), en los cuales el concepto de totipotencia celular estaba implícito en los enunciados de su teoría celular. Morgan es, posiblemente, el investigador que acuñó el concepto de totipotencia, en función de la capacidad de regenerar un organismo completo a partir de una célula (Villalobos, 1990).

Cuando se conocieron las condiciones de crecimiento y división de células, aparecieron numerosos artículos en los que se experimentaban mejores condiciones para una rápida división celular, mayor velocidad de crecimiento y otros componentes del medio de cultivo. Murashige y Skoog (1962), estudiaron y propusieron la composición de un medio nutritivo para obtener una mayor velocidad en el crecimiento *in vitro* de células de *Nicotiana tabacum*. En la actualidad, las sales inorgánicas de este medio de cultivo se usan con bastante éxito en un gran número de especies (Hurtado y Merino, 1987).

La amplitud de la definición de lo que es el cultivo de tejidos y los numerosos objetivos que éste persigue, constituye un serio escollo a cualquier intento de generalización acerca de los factores que afectan el establecimiento de los cultivos *in vitro*, y obligan a consideraciones previas para delimitar los sus alcances.

La importancia del cultivo de tejidos radica en el enorme potencial de sus aplicaciones, con el mejoramiento genético a la cabeza. El uso de esta metodología, sola o conjuntamente con otras técnicas, ha generado toda una nueva rama de la biotecnología. Las técnicas de ingeniería genética lo requieren de manera casi indispensable.

De todos los procesos morfogenéticos utilizados en el cultivo de tejidos, la embriogénesis somática *in vitro* ha sido considerada como la que tiene el mayor

potencial de comercialización. Sin embargo, la falta de conocimiento básico de los mecanismos que regulan la diferenciación celular y la variación somaclonal, ha detenido la realización de dicho potencial.

En este trabajo se hace una revisión del cultivo de tejidos del cafeto, con un énfasis particular en el uso de la embriogénesis somática para el mejoramiento genético.

1.2. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Entre 1958 y 1959, de manera simultánea, tres grupos de investigación, en diversas partes del mundo reportaron que al cabo de cierto tiempo aparecían en el medio células aisladas, que eran capaces de crecer y multiplicarse y que si estos mismos explantes eran sometidos a ciertas condiciones de cultivo se desarrollaban en ellos estructuras bipolares que eran capaces de regenerar plantas completas. Estas estructuras eran morfológicamente idénticas a los embriones pero provenían de células somáticas. Más tarde estas estructuras recibieron el nombre de embriones somáticos y el proceso mediante el cual se regeneraban se le denominó embriogénesis somática (Steward *et al.*, 1958a; Reinert, 1959; Krikorian y Simola, 1999).

Los embriones somáticos, asexuales o adventicios se han definido como aquellos embriones iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos (Tisserat, 1985). Los embriones somáticos son estructuras bipolares con un eje radical-apical y parece que no poseen conexión vascular con el tejido materno; las estructuras bipolares son capaces de crecer y formar plantas normales.

La embrionía adventicia es un evento morfogenético que ocurre *in vivo* a partir de las nucelas de ciertos géneros de plantas, por ejemplo, *Citrus spp.* (Kunitake y Mii, 1995), *Mangifera indica* (Litz *et al.*, 1993), *Eugenia spp.*, *Garcinia mangostana* y *Lansium domesticum*, o a partir de integumentos del óvulo como ocurre en *Eugenia malacencis*. También se origina de las sinérgidas (Cooper, 1943), del suspensor (Crete, 1938) y de otros tejidos localizados dentro del ovario como el endospermo (Muniyamma, 1977), las antípodas (Reinert, 1959). La embrionía adventicia también ocurre en los ápices de las hojas de la orquídea *Malaxis paludosa* (Taylor, 1967)

Como se mencionó anteriormente, la totipotencialidad de las células vegetales cultivadas *in vitro* fue establecida por Reinert (1959), Stewart *et al.*, (1958a; 1958b), y Waris (Krikorian y Simola, 1999) quienes describieron la inducción de embriones somáticos a partir de callos derivados del ápice radical de la zanahoria y plántulas de *Oenanthe aquatica*, respectivamente. También se ha obtenido la regeneración de plantas *in vitro* por medio de la embriogénesis somática a partir de células regenerativas, por ejemplo, en cultivos microspóricos de *Datura innoxia* (Guha y Maheshwari, 1964), como también en células del endospermo de *Santalum album* cultivadas *in vitro* (Lakshmi *et al.*, 1982).

En ciertos aspectos, los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos; sin embargo, tanto *in vivo* como *in vitro* pueden ocurrir algunas anomalías en el desarrollo, por ejemplo la fasciación y la fusión de los cotiledones (Figura 1.1).

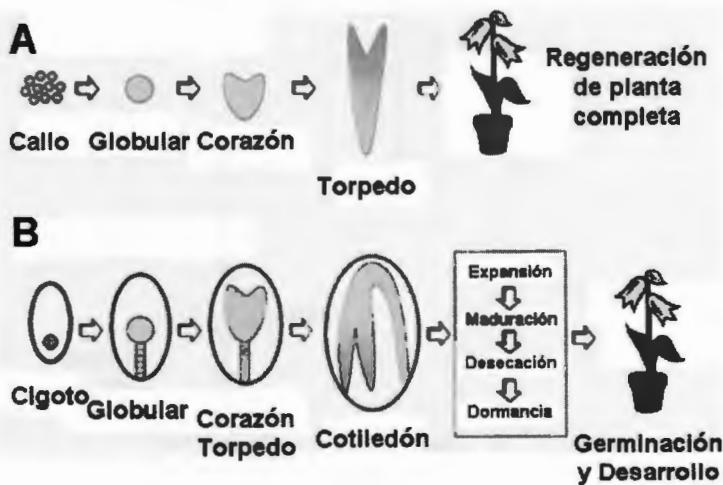


Figura 1.1. Comparación entre embriogénesis somática y embriogénesis cigótica. A) Embriogénesis somática. B) Embriogénesis cigótica. La morfología de los estadios de desarrollo son similares desde el estadio globular hasta el de torpedo, a partir del cual, los embriones somáticos continúan su desarrollo hasta regenerar una planta completa, en tanto que los embriones cigóticos presentan desecación o dormancia. (Modificado de Zimmerman, 1993).

Hasta la fecha se ha logrado inducir la embriogénesis somática en un gran número de especies, tanto de Angiospermas como de Gimnospermas. La ocurrencia o no de la embriogénesis somática en una especie está condicionada por varios factores entre los que se destacan, el genotipo de la especie, el tipo de explante, los nutrientes del medio de cultivo, los reguladores del crecimiento empleados y el régimen de subcultivo (Carman, 1990).

Se reconocen dos tipos de embriogénesis somática; se le llama directa cuando los explantes muestran un mínimo de proliferación antes de aparecer los embriones somáticos e indirecta cuando los explantes sufren un periodo de proliferación desorganizada antes de la inducción de los embriones somáticos. (Meijer y Brown, 1988). En otras palabras, se sugiere que en la embriogénesis somática directa las células proembriogénicas están presentes y sólo requieren condiciones favorables para inducir el fenómeno, mientras que la indirecta requiere de una redeterminación de las células diferenciadas para adquirir el estado proembriogénico previo requerido para el inicio de la embriogénesis (Yeung, 1995). Sin embargo, los términos directa e indirecta son útiles para diferenciar entre casos con pequeña o gran proliferación de los explantes antes del proceso embriogénico (Figura 1.2), pero no indica necesariamente las diferencias fundamentales entre las células involucradas (Halperin, 1995).

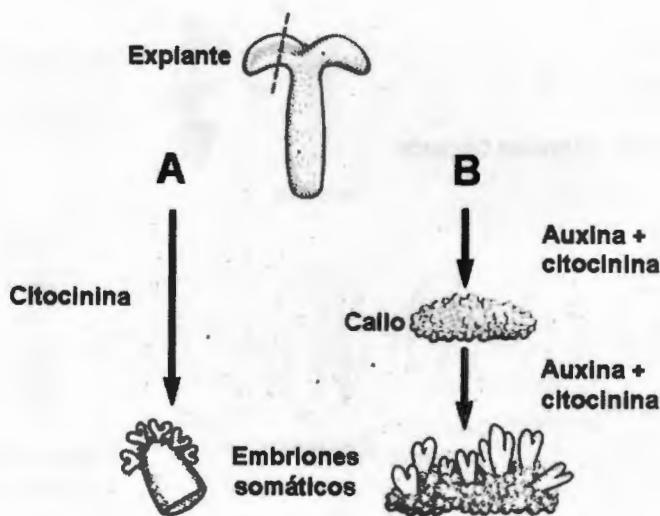


Figura 1.2. Comparación entre embriogénesis somática directa e indirecta. A) Embriogénesis somática directa en un solo medio y usando exclusivamente citocininas. B) Embriogénesis somática indirecta en dos etapas, usando auxinas y citocininas en ambas, y con una fase intermedia de callo.

1.3. LA IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DEL CAFETO

El género *Coffea* pertenece a la familia de las Rubiáceas y es un cultivo de gran importancia económica para varios países, entre los que destacan, Colombia, México, Brasil, Uganda, Etiopía, Indonesia, Vietnam y Filipinas.

La producción mundial de este producto está distribuida de la siguiente manera: América Latina provee el 67%, África el 17% y Asia y Oceanía el 16%.

Existen dos especies de consumo mundial: *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, siendo la primera la de mayor calidad y su producción es aproximadamente el 75% de la producción mundial. *C. canephora* es más resistente a enfermedades, produce más frutos y se adapta fácilmente al tipo de clima de las regiones productoras, pero produce un café más fuerte y de menor calidad.

México ocupa el quinto lugar mundial como productor de café, y tiene un área sembrada de 760 mil ha, en doce estados de la república. El café es para México una base importante de captación de divisas; en el ciclo 96-97, México exportó 4.4 millones de sacos de 60 kg que aportaron 858 millones de dólares, una de las exportaciones más altas del sector cafetalero en las últimas tres décadas y superó en un 29.9% el valor de las exportaciones del ciclo 95-96. Este cultivo genera casi tres millones de empleos. Lo anterior refleja la importancia que tiene la investigación dirigida al mejoramiento de este recurso.

Debido a la diferencia de ploidías entre las especies de cafeto de interés económico, éstas se encuentran aisladas genéticamente por lo que los programas tradicionales de mejoramiento genético no son siempre factibles de utilizar; se requiere de alrededor de 30 años de cruzas y selecciones para obtener una nueva variedad mejorada. Por otro lado, en la medida en que se obtengan e identifiquen híbridos de interés se requiere de técnicas de propagación masiva para la multiplicación de estos materiales. La embriogénesis somática ofrece una buena oportunidad en este sentido por lo que se hace necesario generar un protocolo eficiente y reproducible, así como un mejor conocimiento de los eventos moleculares, bioquímicos y fisiológicos que gobiernan este proceso.

1.4. LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN COFFEA SPP.

En 1970, Staritsky logró la obtención de embriones somáticos partiendo de callos de entrenudos de ramas ortotrópicas de *Coffea canephora*. A partir de entonces y hasta la fecha prácticamente todas las partes y órganos del cafeto han sido cultivados *in vitro*.

Sharp *et al.*, (1973), usando el mismo medio de cultivo que Staritsky (1970), pero con mayor contenido en algunos de los compuestos orgánicos, como sacarosa y tiamina y utilizando ácido naftalén-acético (ANA), y agua de coco como reguladores del crecimiento, lograron obtener embriogénesis somática en *C. arabica*. Crocomo *et al.* (1979), publicaron la ocurrencia de cinco variaciones fenotípicas en células de *C. arabica* obtenidas del cultivo *in vitro* de brotes ortotróficos y hojas en el mismo medio que había empleado Staritsky, pero suplementado con hidrolizado de caseína, mientras que para el desarrollo de brotes fueron necesarias las vitaminas de White, así como la adición de cinetina y la ausencia de 2,4-D.

Herman y Haas (1975), trabajando con *C. arabica* cultivaron segmentos de hojas de callos plagiotrópicos en el medio de Linsmaier y Skoog (1965) suplementado con cinetina y ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2, 4-D) lograron inducir la formación de embriones, los cuales tuvieron un desarrollo normal después de dos meses en el medio de Gresshoff y Doy (1992), adicionando 0.44 µM de ANA; sin embargo, hubo malformación de las hojas y crecimiento muy pobre de las raíces, además éstas carecían de pelos absorbentes. Posteriormente, empleando la misma especie, Söndahl y Sharp (1977) lograron la inducción de embriones y su conversión en plantas completas utilizando el medio basal de Murashige y Skoog (1962) suplementado con diferentes dosis de cinetina y de 2, 4-D y diferentes concentraciones de las sales minerales. Además, estos últimos investigadores también descubrieron dos estructuras con diferente potencialidad embriogénica en este tipo de explante. Desde entonces, la investigación sobre la embriogénesis somática en el género *Coffea* ha venido desarrollándose en diversos laboratorios alrededor del mundo (Dublin, 1991).

Uno de los aspectos que más se ha estudiado es la histología del proceso de embriogénesis somática indirecta en el cafeto, aunque cabe señalar la falta de un estudio histológico sistemático sobre la embriogénesis somática directa en cafeto. Entre los resultados de los estudios que se han realizado se ha observado que los callos provenientes de explantes foliares del cafeto se originan de las células perivasculares del explante y que los embriones se originan de células que se encuentran formando glóbulos dentro de la masa del callo; estos embriones están

perfectamente constituidos y son absolutamente comparables a los embriones cigóticos (Michaux-Ferrière *et al.*, 1987).

Si bien los rendimientos reportados para la embriogénesis somática del cafeto en medio líquido han sido de tan sólo 186 embriones después de 8 semanas (Yasuda *et al.*, 1985), el escalamiento del proceso en medio líquido en biorreactores de 3 y 5 L, ha aumentado estos rendimientos hasta 200 mil – 500 mil embriones por gramo de inóculo y con una conversión a planta del 48% (Ducos *et al.*, 1993; Zamarripa , 1993).

Como se mencionó con anterioridad, se han hecho varios esfuerzos, en diversos laboratorios, para desarrollar el proceso de la embriogénesis somática en cafeto (Cuadro 1.1). En este trabajo dicho esfuerzo se analiza desde la óptica del efecto que tienen las diversas modificaciones en el medio de cultivo en la producción y calidad de la embriogénesis somática en el cafeto.

Cuadro 1.1. Embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea* spp.

ESPECIE (CULTIVAR)	EXPLANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>C. arabica</i> , <i>C. canephora</i> y <i>C. liberica</i> .	Internudos de brotes ortotrópicos.	Se obtuvo embriogénesis somática sólo en <i>C. canephora</i> .	Staritsky, 1970.
<i>C. arabica</i> (Mundo Novo y Bourbon Amarillo).	Semillas, frutos, hojas, anteras, brotes ortotrópicos y brotes plagiotrópicos.	Se obtuvieron callos y regenerantes. Los callos de brotes ortotrópicos produjeron brotes y raíces. Células dihaploides de callos produjeron proembrioides.	Sharp <i>et al.</i> , 1973.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Producción de organoides y regeneración de plantas.	Herman y Haas, 1975.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Aplicaciones para el mejoramiento genético.	Monaco <i>et al.</i> , 1977
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Se obtuvo embriogénesis somática de baja y alta frecuencia con un método de dos etapas.	Söndahl y Sharp, 1977.
<i>C. arabica</i> (Bourbon).	Hojas.	Se identificaron dos tipos de poblaciones celulares; embriogénica (células pequeñas y esféricas) y no embriogénica (células elongadas).	Söndahl y Sharp, 1979a.

Continúa Cuadro 1.1.

ESPECIE (CULTIVAR)	EXPLANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>C. arabica</i> (Bourbon).	Hojas.	La proliferación de callos empezó en las células del mesófilo esponjoso.	Söndahl y Sharp, 1979b.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Aplicaciones en la investigación.	Söndahl y Sharp, 1979c.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	CTV del cafeto.	Stemmer, 1979.
<i>C. canephora</i> e híbrido Arabusta.	Internudos de tallos ortotrópicos e hipocotilos.	Las secciones internodales produjeron yemas y estructuras proembriogénicas.	Dublin, 1980a.
Híbrido Arabusta.	Internudos de tallos ortotrópicos.	Las secciones internodales produjeron yemas y estructuras proembriogénicas.	Dublin, 1980b.
<i>C. canephora</i> .	Tallos.	Se obtuvieron estructuras proembriogénicas.	Nassuth et al., 1980.
Híbrido Arabusta.	Hojas.	Embriogénesis somática directa e indirecta a partir de explantes de hojas.	Dublin, 1981.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Cultivo <i>in vitro</i> del cafeto.	Söndahl et al., 1981.
<i>C. arabica</i> (Caturra).	Embriones cigóticos.	Se evaluó el efecto de diferentes tratamientos en el desarrollo de embriones somáticos <i>in vitro</i> . Se regeneraron plantas.	Montes, 1982.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Cultivo de mutantes morfológicos.	Söndahl, 1982.
<i>C. arabica</i> (Mundo Novo) y <i>C. canephora</i> .	Hojas.	Se produjeron embriones somáticos con un método de dos etapas, la segunda en medio líquido.	Peña, 1983.
<i>C. canephora</i> .	Hojas.	Se obtuvieron embriones somáticos en un solo medio.	Pierson et al., 1983.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Mejoramiento genético.	Dublin, 1984.

Continúa Cuadro 1.1.

ESPECIE (CULTIVAR)	EXPLANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>C. arabica</i> (Mundo Novo).	Hojas.	Adaptación en campo de plantas obtenidas por embriogénesis somática.	Peña y Buitrago, 1984.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Analiza el potencial de este fenómeno.	Baumann, 1985.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Propagación.	Söndahl <i>et al.</i> , 1985.
<i>C. arabica</i> (Typica).	Hojas.	Se obtuvo embriogénesis somática en un solo medio.	Yasuda <i>et al.</i> , 1985.
<i>C. arabica</i> (Catimor)	Hojas.	Embriogénesis somática y regeneración de plantas.	De García y Menéndez, 1986.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Callogénesis y embriogénesis somática.	Marques, 1986.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Comparación con la embriogénesis animal.	Montezuma y Guimaraes, 1986.
<i>C. arabica</i> .	Callos y protoplastos.	Embriogénesis somática indirecta.	Yasuda <i>et al.</i> , 1986.
<i>C. arabica</i> (Catimor).	Hojas.	Micropropagación de diferentes líneas.	Berthouly <i>et al.</i> , 1987.
<i>C. arabica</i> (Catimor).	Hojas.	Se obtuvieron embriones somáticos a partir de explantes foliares con un protocolo de dos etapas.	García y Menéndez, 1987.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Embriogénesis somática indirecta.	Michaux-Ferriere y Dublin, 1987.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Los callos se originaron por la proliferación de células perivasculares. Las células embriogénicas pudieron observarse desde el 18º día.	Michaux-Ferriere <i>et al.</i> , 1987a.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Estudio histológico.	Michaux-Ferriere <i>et al.</i> , 1987b.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Regeneración de plantas.	Raghuramulu <i>et al.</i> , 1987.

Continúa Cuadro 1.1.

ESPECIE (CULTIVAR)	EXPLANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>C. canephora</i> .	Embriones somáticos.	Embriogénesis somática y regeneración de plantas a partir de protoplastos aislados de embriones somáticos.	Schöpke <i>et al.</i> , 1987.
<i>C. arabica</i> (Caturra).	Embriones somáticos en fase globular.	Criopreservación y recuperación (hasta 50%) de embriones somáticos.	Bertrand-Desbrunais <i>et al.</i> , 1988.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Semilla artificial.	Nouaille y Petiard, 1988.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Transferencia de masa en sistemas celulares.	Pedersen <i>et al.</i> , 1988.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Embriogénesis somática indirecta.	Santana <i>et al.</i> , 1988.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Conservación <i>in vitro</i> .	Guzmán-Vargas, 1989.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Características histológicas de la embriogénesis somática inducida en un solo medio.	Baumann y Neuenschwander, 1990.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Describe la biotecnología del cafeto.	Clarke y MacRae, 1990.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Semilla artificial.	Redenbaugh, 1990.
<i>C. arabica</i> (Caturra).	Protoplastos.	Regeneración de plantas a partir de suspensiones celulares.	Acuña y Peña, 1991.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Perspectivas en el mejoramiento.	Boxus <i>et al.</i> , 1991.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Propagación clonal.	Chatterjee <i>et al.</i> , 1991.
<i>C. canephora</i> .	Hojas.	Embriogénesis somática en un solo medio.	Hatanaka <i>et al.</i> , 1991.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Propagación <i>in vitro</i> .	Söndahl <i>et al.</i> , 1991a.

Continúa Cuadro 1.1.

ESPECIE (CULTIVAR)	EXPLANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Variación somaclonal.	Söndahl y Bragin, 1991.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Embriogénesis somática indirecta en medio líquido.	Zamarripa <i>et al.</i> , 1991a.
<i>C. canephora</i> .	Hojas de microinjerto.	Cultivo de callos embrionarios en medio líquido con tasas elevadas de embriones somáticos.	Zamarripa <i>et al.</i> , 1991b.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Histología.	Michaux-Ferriere y Schwendiman, 1992.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Transformación por bombardeo de micropartículas.	Nagai <i>et al.</i> , 1992.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Estudio con microscopio electrónico.	Nakamura <i>et al.</i> , 1992.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Segunda etapa de cultivo en medio líquido. Embriogénesis somática autocontrolable.	Neuenschwander y Baumann, 1992.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Embriogénesis somática en medio líquido.	Söndahl y Noriega, 1992.
<i>C. arabica</i> x híbrido de Timor.	Hojas.	Embriogénesis somática en un solo medio.	Aponte, 1993.
<i>C. arabica</i> (Caturra Rojo) y silvestre etíope.	Hojas de plantas de invernadero e <i>in vitro</i> .	Efecto de diferentes medios, explantes, genotípico y agente gelificante.	Bieysse <i>et al.</i> , 1993.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Conservación de germoplasma.	Florin <i>et al.</i> , 1993.
<i>C. arabica</i> (Catuai Rojo).	Hojas.	Rendimiento de 45 mil embriones somáticos en un biorreactor de 5 L.	Noriega y Söndahl, 1993.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Biotecnología aplicada al cafeto.	Pétard <i>et al.</i> , 1993.

Continúa Cuadro 1.1.

ESPECIE (CULTIVAR)	EXPLANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>C. arabica.</i>	Hojas.	Propagación por embriogénesis somática.	Rayns <i>et al.</i> , 1993.
<i>Coffea spp.</i>	Hojas.	Embriogénesis somática indirecta.	Santana, 1993.
<i>Coffea spp.</i>	Hojas.	Regeneración de plantas transgénicas.	Spiral y Pétiard, 1993.
<i>C. arabica.</i>	Embriones somáticos.	Criopreservación.	Tessereau, 1993.
<i>C. arabica, C. canephora e híbrido Arabusta.</i>	Hojas.	Embriogénesis somática indirecta en medio líquido.	Zamarripa <i>et al.</i> , 1993.
<i>C. arabica</i> (Garnica).	Hojas.	Efecto de la aplicación de poliaminas exógenas.	Calheiros <i>et al.</i> , 1994.
<i>Coffea spp.</i>	Hojas.	Describe la tecnología para la producción.	Castillo-Ponce <i>et al.</i> , 1994.
<i>C. arabica.</i>	Hojas.	Extracción de embriones por técnicas mecánicas.	Cheng y Ling, 1994.
<i>Coffea spp.</i>	Hojas.	Biotecnología del cafeto en Guatemala y Costa Rica.	Jaffé y Rojas, 1994.
<i>Coffea spp.</i>	Hojas.	CTV del cafeto en Uganda.	Juma, 1994.
<i>C. arabica.</i>	Hojas.	Cuantificación de embriones somáticos con monitor.	Ling <i>et al.</i> , 1994.
<i>C. arabica</i> (Catimor).	Hojas.	Estudio de patrones electroforéticos de proteínas durante la embriogénesis somática.	Menéndez <i>et al.</i> , 1994.
<i>C. arabica.</i>	Protoplastos.	Embriogénesis somática a partir de protoplastos.	Tahara <i>et al.</i> 1994.
<i>C. arabica.</i>	Hojas.	Estudio de la asincronía en la embriogénesis somática.	Toala-Menéndez, 1994.
Híbrido Arabusta.	Hojas.	Embriogénesis somática a partir de suspensiones celulares.	Zamarripa, 1994.

Continúa Cuadro 1.1.

ESPECIE (CULTIVAR)	EXPLANTE	OBSERVACIONES	REFERENCIA
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Callogénesis en medio sólido.	Cevallos-Vallejos, 1995.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Estudio de los aminoácidos presentes en la embriogénesis somática.	Nishibata <i>et al.</i> , 1995.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Criopreservación sin pretratamiento.	Mycock <i>et al.</i> , 1995.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Selección de variación somaclonal.	Söndahl <i>et al.</i> , 1995.
<i>C. arabica</i> .	Protoplastos.	Estudio histológico y biológico.	Tahara <i>et al.</i> , 1995.
<i>C. arabica</i> (Catimor).	Hojas.	Adaptación de plantas regeneradas.	Santana <i>et al.</i> , 1996.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Estudio de los factores que influyen sobre la embriogénesis somática en medio líquido.	Van Boxtel y Berthouly, 1996.
<i>Coffea</i> spp.	Hojas.	Aclimatación de plántulas obtenidas <i>in vitro</i> .	Ettiene <i>et al.</i> , 1997.
<i>C. arabica</i> (Catimor).	Hojas.	Estudio morfogenético de embriogénesis somática indirecta.	Menéndez-Yuffa y de García, 1997.
<i>C. arabica</i> .	Hojas.	Uso de biorreactores.	Etienne-Barry <i>et al.</i> , 1999.
<i>C. arabica</i> .	Hojas de plántulas <i>in vitro</i> .	Embriogénesis somática directa.	Loyola-Vargas <i>et al.</i> , 1999.
<i>C. arabica</i> .	Hojas de plántulas <i>in vitro</i> .	Estudio histológico comparativo entre embriogénesis somática directa e indirecta.	Quiroz-Figueroa <i>et al.</i> , 2000.
<i>C. arabica</i> .	Hojas de plántulas <i>in vitro</i> .	Efecto de la fuente nitrogenada.	Fuentes-Cerda <i>et al.</i> , 2001.

Al analizar la información anteriormente relacionada, se encontró que los protocolos más utilizados son los de Söndahl y Sharp (1977) y Dublin (1991); ambos utilizan al menos dos medios de cultivo, el primero para obtener callos a partir de explantes

foliares y el segundo para inducir la embriogénesis somática indirecta, ambos protocolos requieren de varios meses para completar el proceso; por ello llama la atención el reporte de Yasuda *et al.* (1985) en el que, con el uso de un solo medio de cultivo y una citocinina como regulador del crecimiento (BAP) obtienen embriones somáticos a partir de callos en pocas semanas.

1.5. FACTORES QUE AFECTAN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La zanahoria ha sido el modelo más empleado para el estudio de la embriogénesis somática (Sung *et al.*, 1988). La facilidad con la que se puede inducir el proceso ha hecho que más del 90% de las publicaciones sobre embriogénesis somática sean en zanahoria.

Inicialmente, Stewart *et al.*, (1958a) consideraron que para la inducción de la embriogénesis somática era esencial un ingrediente no identificado en el agua de coco; sin embargo, posteriormente se demostró que el agua de coco aunque era beneficiosa, no era necesaria para inducir la embriogénesis somática (Reinert, 1959). El agua de coco todavía se utiliza frecuentemente en los medios de cultivo, no solamente para estimular la producción de embriones somáticos, sino también para la maduración de los mismos (Thomas *et al.*, 1977; Vasil y Vasil, 1980; Vasil y Vasil, 1981a; Vasil y Vasil, 1981b).

Stewart *et al.*, (1958a) consideraban también que el aislamiento físico de las células, a partir de tejidos de plantas maduras, era la causa de que se convirtieran en embriogénicas; sin embargo, las evidencias no apoyan este punto de vista. Las células que dan origen a los proembriones son ricas en almidón y poseen una vacuola pequeña (Halperin, 1970).

Las diversas interpretaciones de los eventos que ocurren tempranamente en las células y que traen consigo la diferenciación de plantas a partir de callos siguen siendo hipotéticas. Stewart *et al.*, (1958a; 1964) propusieron que la diferenciación dependía del aislamiento fisiológico de las células en cultivo; sin embargo, los estudios ultraestructurales de la embriogénesis en callos de zanahoria no respaldan esta interpretación (Street y Withers, 1970).

Las células cultivadas que forman estructuras poliembrionáticas poseen paredes celulares gruesas (Skoog y Miller, 1957). Las primeras interpretaciones tempranas del fenómeno regenerativo efectuadas por Skoog y Miller (1957; Skoog y Tsui, 1948) sugirieron que la organización era dependiente de las interacciones cuantitativas entre los reguladores del crecimiento y otros factores. De esta manera, dentro de un cultivo puede haber gradientes fisiológicos que determinen la diferenciación.

Street (1976) propuso que las células pequeñas isodiamétricas, con un núcleo prominente y con vacuolas pequeñas son las que poseen totipotencialidad para la diferenciación, tienen cierto patrón de expresión genética y se diferenciarán cuando sean expuestas a las señales apropiadas; esto implica el cambio a un nuevo patrón de expresión de los genes. Thorpe (1990) ha propuesto tres requerimientos para un desarrollo organizado *de novo*: la diferenciación celular, la interacción celular y una respuesta a las señales específicas.

Hay por lo menos dos factores que pueden controlar la formación de centros organizados (1976). Las células en división activa pueden estimular la división en las

células adyacentes y este grupo de células, que se dividen rápidamente, viene a ser como un poza de nutrientos o metabolitos de las células ubicadas junto a él, impidiendo que éstas se dividan.

La ocurrencia de la embriogénesis somática en una especie dada, está condicionada por varios factores, entre los que se destacan: el genotipo de la especie, el tipo de explante, los componentes del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento empleados y el régimen de subcultivo (Carman, 1990).

1.5.1. La planta donadora

La respuesta embriogénica del callo depende en gran medida del genotipo de la planta. Algunos cultivares se pueden regenerar más fácilmente en un medio específico, mientras que otros cultivares no responden en el mismo medio (Litz *et al.*, 1993). El estadio de desarrollo de la planta madre también afecta la respuesta morfológica del explante; Banks (1979) observó que los explantes obtenidos a partir de plantas maduras de *Hedera helix* formaban callos embriogénicos, mientras que el fenómeno no ocurría en explantes de plantas jóvenes.

1.5.2. Explante

Virtualmente, todos los tejidos vegetales tienen capacidad para formar callos embriogénicos. Comúnmente se han empleado como explantes, partes de plántulas como cotiledones, hipocotilos y embriones; adicionalmente se han usado ápices caulinares, segmentos de tallos, hojas, raíces e inflorescencias inmaduras. Según Ammirato (1983), estos explantes se han usado con éxito para obtener callos embriogénicos en diferentes especies de la mayoría de las familias de plantas.

En plantas leñosas se ha inducido embriogénesis somática en nucelas aisladas de *Citrus* spp (Rangan , 1984) y de *Mangifera indica* (Litz *et al.*, 1993) y a partir de la nucela de óvulos cultivados de *Citrus* spp., *Vitis vinifera* (Mullins, 1987), *Ribes rubrum* (Zatyko *et al.*, 1982), *Malus domesticum* (Eichholtz *et al.*, 1979), *Mangifera indica* (Litz *et al.*, 1993), especies de *Eugenis* (Litz y Jarret, 1991) y *Myrciaria cauliflora* (Litz y Jaiswal, 1991).

Se han obtenido callos embriogénicos a partir de varios tipos de explantes de palmas; entre ellos se encuentran los embriones cigóticos (Duval *et al.*, 1995), las hojas jóvenes (Buffard-Morel *et al.*, 1992), las inflorescencias (Branton y Blake, 1983), los ápices radicales (Smith y Jones, 1970) y los ápices de los retoños de palma datilera (Reynolds y Murashige, 1979); así como la regeneración de *Cocos nucifera* L. a partir de explantes de plúmula (Chan *et al.*, 1998).

La embriogénesis somática ha servido para obtener plantas con diversos cariotipos en tejidos de endospermo de *Croton bonplandeanum* (Bhojwani, 1984) y de *Santalum album* (Lakshmi *et al.*, 1982), con las que se obtuvieron plantas triploides. También se han recuperado plantas haploides como resultado de la embriogénesis somática en *Datura innoxia* (Guha y Maheshwari, 1964) y *Nicotiana tabacum* (Nitsch, 1983) a partir de anteras cultivadas *in vitro*.

1.5.3. Medio de cultivo

Generalmente se ha usado al medio desarrollado por Murashige y Skoog (1962), o la modificación de esta formulación (Evans *et al.*, 1981) para el cultivo de los explantes y los embriones obtenidos; la elevada concentración de sales de este medio parece ser adecuada para el crecimiento de los embriones somáticos (Ammirato, 1983).

1.5.3.1. Fuente de nitrógeno

Desde hace más de 30 años se sabe que la fuente nitrogenada modifica sustancialmente la respuesta embriogénica de los cultivos (Halperin y Wetherell, 1965). Desde entonces este componente del medio de cultivo se ha manipulado con el fin de hacer más eficiente el proceso. Sin embargo, no se sabe como actua durante el proceso de diferenciación celular. Por lo que la asimilación del nitrógeno y la función de éste en el crecimiento y desarrollo de las plantas son puntos clave para comprender los fundamentos de la diferenciación de las células vegetales.

Se sabe que tanto la forma como la cantidad de nitrógeno en el medio de cultivo tienen efectos significativos sobre la tasa de crecimiento, morfología y totipotencialidad celular (Bravo y Evans, 1985). La forma y el nivel del nitrógeno tienen un profundo efecto sobre la embriogénesis somática *in vitro*. Halperin y Wetherall (1965), y Halperin (1966; 1970) así como Reinert *et al.*, (1967), han demostrado que el nitrato de amonio aumenta la tasa de embriogénesis en células cultivadas de zanahoria, en comparación con nitrato de potasio. La glutamina en el medio de cultivo en suspensión estimula la embriogénesis somática en *Gossypium spp.* (Price y Smith, 1979).

Los primeros trabajos en embriogénesis somática de zanahoria señalaron que ésta es inhibida severamente en medios con nitrato como única fuente de nitrógeno. La adición de concentraciones bajas de amonio estimula tanto el crecimiento como la embriogénesis (Thorpe, 1978). Este efecto sinergístico parece deberse al patrón de uso del nitrógeno empleado por las células cultivadas *in vitro*. Los cultivos de células de zanahoria, soya e *Ipomea* parecen utilizar inicialmente amonio y posteriormente el nitrato (Rose y Martin, 1975; Sargent y King, 1974; Veliky y Rose, 1973).

En 1978, Donald y Verma demostraron que suspensiones celulares de zanahoria crecen y producen embriones en presencia de amonio como única fuente de nitrógeno. Adicionalmente, en experimentos previos observaron que el pH disminuía rápidamente en los primeros 4 días del cultivo (Dougall y Verma, 1978). En alfalfa (*Medicago sativa*) también se requiere de la presencia de nitrógeno reducido para la formación de embriones, por lo que se puede interpretar que no es una característica única de *Daucus carota* (Walker y Sato, 1981).

Sin embargo, en un trabajo posterior, en el que se evaluaban diferentes fuentes de nitrógeno, tales como aminoácidos y sus combinaciones, les permitió concluir que se requería de una fuente de nitrógeno reducido y como suplemento el nitrato para un rápido crecimiento y formación de embriones en zanahoria (Wetherell y Dougall, 1976).

Está claro por estos estudios que el ión amonio o uno o más aminoácidos producen tejido con una elevada capacidad embriogénica. El requerimiento de amonio va a depender en gran medida del medio de cultivo que se esté utilizando, ya que las

concentraciones de amonio que pueden favorecer la embriogénesis en un medio, en otro pueden no dar el mismo efecto (Walker y Sato, 1981).

No sólo se ha utilizado amonio como fuente de nitrógeno reducido, también se han probado la mayoría de los aminoácidos, solos y en combinación entre ellos, o con otras fuentes de nitrógeno como nitrato y amonio. Los resultados muestran que algunos aminoácidos como prolina, en combinación con amonio, aumentan el número de embriones de una manera importante en cultivos de alfalfa (Stuart y Strickland, 1984). La glutamina como única fuente de nitrógeno puede estimular la embriogénesis y en combinación con prolina se pueden lograr los mismos resultados que se obtienen con amonio, lo que sugiere que la glutamina puede sustituir al amonio (Stuart y Strickland, 1984).

En arroz (*Oryza sativa*) los cambios en la relación $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ alteran la sensibilidad a las auxinas y esto, a su vez, afecta la expresión de la embriogénesis (Grimes y Hodges, 1990).

Cabe señalar que la vía de síntesis de las poliaminas y la del etileno comparten un precursor común, la metionina, por lo que un aspecto fundamental que deberá aclararse en el futuro es el efecto mutuo entre estas dos familias de compuestos.

En estudios previos se ha demostrado que el uso de poliaminas tales como la espermina, la putrescina y la espermidina está relacionado con el control de la embriogénesis somática en *D. carota* (Fienberg *et al.*, 1985). Las poliaminas, incorporadas al medio de callos embriogénicos de zanahoria, inhiben el desarrollo de los embriones somáticos; los subcultivos, en cambio, en un medio libre de poliaminas pero que contenga arginina, permiten el desarrollo normal del embrión (Bradley, 1984). Sin embargo, en otros sistemas las poliaminas ejercen un efecto positivo (Kevers *et al.*, 2000; Minocha y Minocha, 1995).

El metabolismo de las poliaminas también juega, entonces, un papel fundamental (Khan y Minocha, 1991; Mengoli *et al.*, 1989). Por ejemplo, la actividad de la arginina decarboxilasa se encuentra aumentada dos veces en los cultivos durante el proceso embriogénico (Montague *et al.*, 1978).

No sólo se ha utilizado amonio como fuente de nitrógeno reducido, también se han probado la mayoría de los aminoácidos, solos y en combinación entre ellos, o con otras fuentes de nitrógeno como nitrato y amonio. La prolina estimula la embriogénesis somática en maíz (Armstrong y Green, 1985), *Agrotis alba* (Shetty y Asano, 1991) y en zanahoria (Kamada y Harada, 1984). De igual manera diversos aminoácidos y el amonio incrementan el número de embriones somáticos en alfalfa (Stuart y Strickland, 1984). La glutamina como única fuente de nitrógeno puede estimular la embriogénesis y en combinación con prolina se pueden lograr los mismos resultados que se obtienen con amonio, lo que sugiere que la glutamina puede sustituir al amonio (Stuart y Strickland, 1984).

En varios casos, la presencia de compuestos conteniendo nitrógeno reducido, junto con nitrato, es necesaria para que se lleve a cabo la embriogénesis somática. La α -alanina, la glutamina, el ácido glutámico, la asparagina y el ácido aspártico pueden estimular la embriogénesis somática en zanahoria (Wetherell y Dougall, 1976).

Recientemente Higashi *et al.*, (1996), en la única publicación que existe hasta ahora, reportaron cambios en la actividad enzimática de la glutamina sintetasa durante la embriogénesis somática de zanahoria.

1.5.3.2. Fuente de carbono

En alfalfa, la fuente de carbono es muy importante para la morfología y la eficiencia del proceso de embriogénesis, siendo maltosa la mejor fuente de carbono (Strickland *et al.*, 1987).

Wetherell (1984) ha demostrado que es posible aumentar el potencial embriogénico de los callos de zanahoria, exponiéndolos a niveles altos de sacarosa o de manitol; la sacarosa se usa en concentraciones de 2 a 3% y hasta 12%.

Los niveles altos de sacarosa parecen tener un efecto comparable al producido por el ácido abscísico. Las concentraciones elevadas de esta sustancia estimulan la formación de los callos embriogénicos (Vasil, 1982) y reducen la frecuencia de anomalías de desarrollo tales como la formación de embriones secundarios, la fasciación y la formación de policotiledones; también inhiben la germinación (Ammirato, 1984).

Después de un periodo prolongado de cultivo, el potencial embriogénico del callo declina; Halperin (1966) y Smith y Street, (1974) asociaron este hecho con la acumulación de cambios genéticos que ocurrían en las células en cultivo. Algunas veces es posible restaurar el potencial embriogénico de los cultivos incrementando la concentración de sacarosa (Jones, 1974), o alterando las proporciones de nitrógeno y de auxina (Reinert *et al.*, 1977).

1.5.3.3. Calcio y hierro

El calcio y la calmodulina son un par de factores cuyo estudio se ha iniciado muy recientemente, ambos compuestos juegan un papel central en la respuesta de las células a diferentes estímulos (Timmers, 1990; Overvoorde y Grimes, 1994). La calmodulina ha sido encontrada distribuida desigualmente dentro de la masa proembriogénica; las concentraciones mayores se encontraron en el sitio del futuro polo radical, (Timmers *et al.*, 1989); por su parte, Hirt *et al.*, (1991) señalan que los niveles elevados de transcritos de calmodulina en embriones somáticos de *Medicago sativa* en etapas tempranas de desarrollo sugiere una expresión diferencial para este gene durante la embriogénesis. El tratamiento de embriones en desarrollo con verapamil o con nifedipina, bloqueadores de canales de calcio, o con el ionóforo A23187, inhibe la formación del embrión. Estos resultados sugieren que el calcio exógeno o el mantenimiento de los gradientes de calcio son necesarios para el desarrollo adecuado de los embriones. Estos últimos tienen un mayor contenido de calcio, particularmente en las fases de globular tardío a torpedo (Timmers *et al.*, 1996).

El hierro es también esencial para la embriogénesis somática (Vagera y Havranek, 1982) ya que en ausencia de este elemento, los embriones somáticos globulares no son capaces de desarrollarse hasta la madurez.

Por su parte, Monnier (1976) al investigar con embriones de *Capsella*, señala la concentración del hierro en el medio de cultivo influye en la supervivencia de los embriones. El hierro siempre es agregado como Fe-EDTA, porque es más fácilmente absorbido por el tejido vegetal. Duplicar la concentración en el medio de cultivo MS provocó un disminución significativa de la supervivencia, en tanto que al reducirla a la mitad, se observó que la supervivencia aumentó en forma regular. Cabe señalar que el hierro no puede ser removido completamente del medio de cultivo porque este elemento es esencial para el crecimiento de los embriones. Por lo regular una concentración de 60-70 mM, en el medio de cultivo reduce la toxicidad sin afectar demasiado el crecimiento de los embriones.

1.5.3.4. Reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento son, por definición, compuestos orgánicos sintetizados por las plantas superiores, que influyen sobre su crecimiento y desarrollo; actúan generalmente en lugares diferentes de donde se producen, y se encuentran presentes y activos en cantidades muy pequeñas.

En el cultivo *in vitro* de plantas superiores, los reguladores del crecimiento, especialmente las auxinas y las citocininas, juegan un papel muy importante.

1.5.3.4.1. Auxinas

De acuerdo con Evans *et al.*, (1981) la mayoría de los sistemas requieren de una concentración alta de auxina (generalmente 2, 4-D) en el medio para la inducción del proceso. Para las gramíneas, el 2, 4-D es la única auxina que se usa. En *D. carota* han sido efectivas varias auxinas, por ejemplo ANA (Vagera y Havranek, 1982), AIA (Sussex, 1998) y 2, 4-D (Halperin y Wetherell, 1965). Otras auxinas sintéticas tales como el picloram, el 2, 4, 5-T, el ácido 2-benzothiazol acético y el ácido paraclorofenoxiacético también han demostrado ser bastante efectivas.

La concentración usual de 2, 4-D está en el rango de 0.5-27.6 µM (Lang *et al.*, 1988), aunque se deben usar concentraciones más altas, por ejemplo 450 µM de 2, 4-D, en caso de incorporar carbón activado al medio de cultivo (Reynolds y Murashige, 1979).

Ammirato (1974) señaló que las auxinas son las que generalmente inician el crecimiento de los callos, así como la inducción de la embriogénesis, en tanto que las citocininas son promotoras de la maduración de los embriones pero no promueven su iniciación, excepto en casos excepcionales como en el caso de la metodología de Yasuda (Quiroz-Figueroa *et al.*, 2002; Yasuda *et al.*, 1985).

1.5.3.4.2. Citocininas

El papel de las citocininas en el medio primario o en el de inducción de embriogénesis, es menos claro, aunque normalmente se incluye una de ellas. Hay datos que sugieren que las citocininas promueven la embriogénesis, en tanto que el etileno la suprime, al igual que el ácido giberélico (Nomura y Komamine, 1995); sin embargo, el fenómeno no es tan universal como el de las auxinas. Fujimura *et al.*, (1982) han sugerido que las

citocininas pueden ser esenciales para la maduración y la germinación de los embriones somáticos.

1.5.3.4.3. Giberelinas

El ácido giberélico (AG) también se ha incorporado al medio de cultivo con el fin de ayudar a la maduración de los embriones somáticos de *Panicum maximun* (Hanna et al., 1984), *Santalum album* (Lakshmi et al., 1982) y *Citrus sinensis* (Kochba et al., 1982). La adición de AG₃ al medio de cultivo LS (1965) sólido y a la mitad de su fuerza iónica, resulta indispensable para el desarrollo de embriones somáticos de *Solanum tuberosum*, obtenidos a partir de anteras.

Sin embargo, la adición de giberelinas al medio de cultivo produjo embriones alargados y delgados en embriones de *Capsella* (Raghavan, 1964; Raghavan and Torrey 1964); en tanto que para *Allium cepa*, en la inducción de embriogénesis somática a partir de ovarios y óvulos, se observó que los explantes degeneraron y el porcentaje de respuesta fue apenas de 0.28% (Campion y Alloni, 1990).

1.5.3.4.4. Otros

Se han usado inhibidores del crecimiento tales como el ácido abscísico (ABA), el cual reprime la embriogénesis somática y reduce la frecuencia de anomalías en el desarrollo como son la formación secundaria de embriones a partir de embriones somáticos y la germinación precoz (Ammirato, 1974); las concentraciones de ABA más usadas fluctúan entre 0.1 y 1.0 µM. Las antiauxinas han sido efectivas de la misma forma que el ABA (Fujimura y Komamine, 1979).

El uso del ácido abscísico suprime la presencia de embriones anormales en *Carum carvi* y se ha observado que el balance entre ácido giberélico, zeatina y ácido abscísico controla el desarrollo y la maduración del embrión (Ammirato, 1974).

El etileno en cafeto parece ser indispensable para que la embriogénesis tenga lugar (Hatanaka et al., 1995), en tanto que este mismo regulador inhibe el fenómeno en zanahoria (Roustan et al., 1994).

1.5.4. Condiciones del medio ambiente

En contraste con la cantidad de información que se ha generado sobre la optimización de los medios de cultivo y el uso de reguladores del crecimiento, poca atención se ha dedicado a los parámetros físicos que influyen en el crecimiento y el desarrollo *in vitro*.

Una alta intensidad luminosa resulta esencial para obtener embriogénesis somática en *Nicotiana tabacum* (Haccius, 1973), si bien en *D. carota* (Ammirato, 1974) fue necesaria la oscuridad para el desarrollo normal y la maduración de los embriones. Pretratamientos con frío se han usado rutinariamente para estimular la embriogénesis somática a partir de anteras cultivadas (Nitsch, 1983).

Los medios de cultivo semisólidos se han empleado para el crecimiento de callos y para estimular la embriogénesis somática; Ammirato (1983) demostró que cuando se

utilizan medios líquidos, el tipo de recipiente usado para el cultivo tiene un efecto muy grande sobre la embriogénesis. Es preferible agitar suavemente el medio porque así se obtienen menos anomalías en el desarrollo que cuando se agita vigorosamente.

En resumen la inducción de la embriogénesis somática es afectada por una serie de factores, los cuales incluyen el origen del explante, el medio de cultivo y las condiciones medio ambientales.

REFERENCIAS

- Acuna J. R. and M. de Pena, PLANT REGENERATION FROM PROTOPLASTS OF EMBRYOGENIC CELL SUSPENSIONS OF COFFEA ARABICA L. CV. CATURRA, *Plant Cell Rep.*, 10: 345-348, (1991).
- Ammirato P. V., EMBRYOGENESIS, en: HANDBOOK OF PLANT CELL CULTURE., VOL. I. TECHNIQUES FOR PROPAGATION AND BREEDING, (Evans D. A. W. R. Sharp P. V. Ammirato y Y. Yamada, eds.), Macmillan, New York, 82-123. (1983).
- Ammirato P. V., INDUCTION, MAINTENANCE, AND MANIPULATION OF DEVELOPMENT IN EMBRYOGENIC CELL SUSPENSION CULTURES, en: CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS VOL. 1. LABORATORY PROCEDURES AND THEIR APPLICATIONS, (Vasil I. K., ed.), Academic Press Inc., Orlando, 139-151, (1984).
- Ammirato P. V., THE EFFECTS OF ABSCISIC ACID ON THE DEVELOPMENT OF SOMATIC EMBRYOS FROM CELLS OF CARAWAY (CARUM CARVIL. L.), *Bot. Gaz.*, 135: 328, (1974).
- Aponte A. M. E. SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCED BY CULTURE ON SINGLE MEDIA IN COFFEE PLANTS CROSSES OF COFFEA ARABICA BY TIMOR HYBRID, en: 15^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café, Montpellier, 82-88, (1993).
- Armstrong C. L. y C. E. Green, ESTABLISHMENT AND MAINTENANCE OF FRIABLE EMBRYOGENIC MAIZE CALLUS AND THE INVOLVEMENT OF L-PROLINE, *Planta*, 164: 207-214, (1985).
- Ascanio E. C. E. and M. M. A. Arcia, EFECTO DEL ESTADO DE DESARROLLO DE LAS ANTERAS Y DE UN SHOCK TÉRMICO SOBRE LA ANDROGÉNESIS EN COFFEA ARABICA L. VAR. GARNICA, *Café Cacao Thé*, 38: 75-80, (1994).
- Banks M. S., PLANT REGENERATION FROM CALLUS OF TWO GROWTH PHASES OF ENGLISH IVY, HEDERA HELIX L., Z. *Pflanzenphysiol.*, 92: 349-353, (1979).
- Barton C. R., T. L. Adams, and M. A. Zarwitz, STABLE TRANSFORMATION OF FOREING DNS INTO COFFEA ARABICA PLANTS, en: 14^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café, San Francisco, 460-464, (1991).
- Baumann T. W. and B. Neuenschwander, TISSUE CULTURE IN COFFEE BIOTECHNOLOGY, *Café Cacao Thé*, 34: 159-164, (1990).

- Baumann T. W. BIOTECHNOLOGY, ITS POTENTIAL FOR THE GROWTH AND MANUFACTURE OF COFFEE, en: *11º Colloque Scientifique International sur le café*, Lomé, 55-68, (1985).
- Berthouly M., N. Guzman, and P. Chatelet. MICROPROPAGATION IN VITRO DE DIFFÉRENTES LIGNÉES DE COFFEA ARABICA V. CATIMOR, en: Paris, France, 462-467, (1987).
- Bertrand-Desbrunais A., J. Fabre, F. Engelmann, J. Dereuddre and A. Charrier, ADVENTIVE EMBRYOGENESIS RECOVERY FROM COFFEE (COFFEA ARABICA L.) SOMATIC EMBRYOS AFTER FREEZING IN LIQUID NITROGEN, *C. R. Acad. Sci. (Paris) Sér. III*, 307: 795-801, (1988).
- Bhojwani S. S., CULTURE OF ENDOSPERM, en: CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS VOL. 1. LABORATORY PROCEDURES AND THEIR APPLICATIONS, (Vasil I. K., ed.), Academic Press Inc., Orlando, 258-268, (1984).
- Bieysse D., A. Gofflot and N. Michaux-Ferrière, EFFECT OF EXPERIMENTAL CONDITIONS AND GENOTYPIC VARIABILITY ON SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEA ARABICA, *Can. J. Bot.*, 71: 1496-1502, (1993).
- Boxus P., J. M. Terzi, C. Lievens, M. Pylyser, P. Ngaboyamahina and K. Duhem, IMPROVEMENT AND PERSPECTIVES OF MICROPROPAGATION TECHNIQUES APPLIED TO SOME HOT CLIMATE PLANTS, *Acta Horticul.*, 289: 55-64, (1991).
- Bradley P. M., IN VITRO MODELS FOR PLANT DEVELOPMENT, *Dissertation Abstr.*, 44: 3595, (1984).
- Branton R. L. y J. Blake, DEVELOPMENT OF ORGANIZED STRUCTURES IN CALLUS DERIVED FROM EXPLANTS OF COCOS NUCIFERA L., *Ann. Bot.*, 52: 673-678, (1983).
- Bravo J. E. y D. A. Evans, PROTOPLAST FUSION FOR CROP IMPROVEMENT, en: PLANT BREEDING REVIEWS, VOL. 3, Anonymous, AVI Publishing Co., 193-218, (1985).
- Buffard-Morel J., J.-L. Verdeil y C. Pannetier, EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE DU COCOTIER (COCOS NUCIFERA L.) À PARTIR D'EXPLANTS FOLIAIRES: ÉTUDE HISTOLOGIQUE, *Can. J. Bot.*, 70: 735-741, (1992).
- Calheiros M. B. P., L. G. E. Vieira and S. R. L. Fuentes, EFFECTS OF EXOGENOUS POLYAMINES ON DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEE, *R. Bras. Fisiol. Veg.*, 6: 109-114, (1994).
- Campion B. y C. Alloni, INDUCTION OF HAPLOID PLANTS IN ONION (ALLIUM CEPA) BY IN VITRO CULTURE OF UNPOLLINATED OVULES, *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 20: 1-5, (1990).
- Carman J. G., EMBRYOGENIC CELLS IN PLANT TISSUE CULTURES: OCCURRENCE AND BEHAVIOR, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 26: 746-753, (1990).
- Castillo-Ponce G., A. Contreras-Jiménez, C.A.Zamarripa, I.Méndez-López, M.Vázquez-Martínez, F.Holguín-Meléndez, and A.Fernández-Rodríguez, TECNOLOGÍA

- PARA LA PRODUCCIÓN DE CAFÉ EN MÉXICO. Folleto técnico número 8, INIFAP, México D. F., (1994).
- Cevallos-Vallejos A.M., EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN COFFEA ARABICA L. VAR. 9723: ESTUDIO MORG-BIOQUÍMICO DE LA CALLOGÉNESIS EN MEDIO SÓLIDO. CARACTERIZACIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES, Ins. Sup. Ciencias Agropecuarias, La Habana, (1995).
- Chan J. L., L. Sáenz-Carbonell, C. R. Talavera-May, R. Hornung, M. Robert y C. Oropeza, REGENERATION OF COCONUT (COCOS NUCIFERA L.) FROM PLUMULE EXPLANTS THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS, *Plant Cell Rep.*, 17: 515-521, (1998).
- Chatterjee G., G. Singh and P. Thangam, CLONAL PROPAGATION OF BAMBOO, COFFEE AND MIMOSA, *Curr. Plant Sci. Biotechnol. Agric.*, 261-264, (1991).
- Cheng Z. and P. P. Ling, MACHINE VISION TECHNIQUES FOR SOMATIC COFFEE EMBRYO MORPHOLOGICAL FEATURE EXTRACTION, *Trans. ASAE.*, 37: 1663-1669, (1994).
- Clarke R. J. and R. Macrae, COFFEE AND BIOTECHNOLOGY, *Biotechnol. Develop. Monitor*, 4: 20-22, (1990).
- Cooper D. C., HAPLOID-DIPLOID TWIN EMBRYOS IN LILIJUM AND NICOTIANA, *Am. J. Bot.*, 31: 408-413, (1943).
- Crete P., LA POLYEMBRYONIE CHEZ LA LOBELIA SYPHILITICA, *Bull. Soc. Bot. Fr.*, 85: 580-583, (1938).
- Crocomo O. J., F. J. P. C. Carvalho, W. R. Sharp, G. Bandel y P. C. T. Carvalho, HORMONAL CONTROL OF CELLULAR PHENOTYPE AND INDUCTION OF GLOBULAR EMBRYOS IN TISSUE CULTURES OF COFFEA ARABICA CV. CATUAI, *Energy Nuclear Agriculture*, 1: 41-47, (1979).
- de Garcia E. and A. Menéndez, EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DEL CAFETO 'CATIMOR', *Café Cacao Thé*, XXXI: 15-22, (1987).
- de Garcia E. and A. Menendez, SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANTLET REGENERATION IN COFFEE PLANTS CV. CATIMOR, *Int. Congr. Plasmid. Tissue Cell Cult.*, 6: 341 (1986). (Abstract)
- de Pena M. SOMATIC EMBRYO INDUCTION AND PLANT REGENERATION FROM COFFEA CANEPHORA AND C. ARABICA, in: *Proc. Simposio sobre ferrugens do cafeeiro*, Oeiras, Portugal, 493-512, (1983).
- Dougall D. K. y D. C. Verma, GROWTH AND EMBRYO FORMATION IN WILD CARROT SUSPENSION CULTURES WITH AMMONIUM ION AS A SOLE NITROGEN SOURCE, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 14: 180-182, (1978).
- Dublin P., EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE DIRECTE SUR FRAGMENTS DE FEUILLES DE CAFÉIER ARABUSTA, *Café Cacao Thé*, 25: 237-242, (1981).
- Dublin P., MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA DE CAFÉ, HEVEA Y CACAO, en: CULTIVO DE TEJIDOS EN LA AGRICULTURA. FUNDAMENTOS Y

- APLICACIONES, (Roca W. M. y L. A. Mroginski, eds.), Centro Internacional de Agricultura Tropica, Colombia, 577-619, (1991).
- Dublin P., TECHNIQUES DE REPRODUCTION VÉGÉTATIVE *IN VITRO* ET AMÉLIORATION GÉNÉTIQUE CHEZ LES CAFÉIERS CULTIVÉS, *Café Cacao Thé*, XXVIII: 231-244, (1984).
- Ducos J. P., C. A. Zamarripa, A. B. Eskes y V. Pétillard. PRODUCTION OF SOMATIC EMBRYOS OF COFFEE IN A BIOREACTOR, en: *15^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café*, Montpellier, 89-96, (1993).
- Duval Y., F. Engelmann y T. Durang-Gasselain, SOMATIC EMBRYOGENESIS IN OIL PALM (*ELAEIS GUINEENSIS* JACQ.), en: BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY. VOL. 30. SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED I, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 335-352, (1995).
- Eichholtz D., H. A. Robitaille y P. M. Hasegawa, ADVENTIVE EMBRYOLOGY IN APPLE, *HortScience*, 14: 699-700, (1979).
- Etienne H., W. Solano, A. Pereira, B. Bertrand and M. Berthouly, PROTOCOLE D'ACCLIMATATION DE PLANTULES DE CAFÉIERS PRODUITES *IN VITRO*, *Plantations, Recherche, Développement*, 4: 304-306, (1997).
- Etienne-Barry D., B. Bertrand, N. Vasquez and H. Etienne, DIRECT SOWING OF *COFFEA ARABICA* SOMATIC EMBRYOS MASS-PRODUCED IN A BIOREACTOR AND REGENERATION OF PLANTS, *Plant Cell Rep.*, 19: 111-117, (1999).
- Evans D. A., W. R. Sharp y C. E. Flick, GROWTH AND BEHAVIOR OF CELL CULTURES: EMBRYOGENESIS AND ORGANOGENESIS, en: PLANT TISSUE CULTURE. METHODS AND APPLICATIONS IN AGRICULTURE, (Thorpe T. A., ed.), Academic Press, New York, 45-113, (1981).
- Fienberg A. A., J. H. Choi, W. P. Lubich y Z. R. Sung, DEVELOPMENTAL REGULATION OF POLYAMINE METABOLISM IN GROWTH AND DIFFERENTIATION OF CARROT CULTURE, *Planta*, (1985).
- Florin B., H. Tessereau, and V. Pétillard. CONSERVATION À LONG TERM DES RESSOURCES GÉNÉTIQUES DE CAFÉIER PAR CRYOCONSERVATION D'EMBRYONS ZYGOTIQUES ET SOMATIQUES ET DE CULTURES EMBRYOGÈNES, in: *14^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café*, Montpellier, 106-114, (1993).
- Fujimura T. y A. Komamine, INVOLVEMENT OF ENDOGENOUS AUXIN IN SOMATIC EMBRYOGENESIS IN A CARROT CELL SUSPENSION CULTURE, *Z. Pflanzenphysiol.*, 95: 13-19, (1979).
- Fujimura T. y A. Komamine, MOLECULAR ASPECTS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN A SYNCHRONOUS SYSTEM, en: PLANT TISSUE CULTURE 1982, (Fujiwara A., ed.), The Japanese association for Plant Tissue Culture, Japan, 105-106, (1982).

Gresshoff P. M. *Plant Biotechnology and Development*, Boca Raton:CRC Press. 171 pages. (1992).

Grimes H. D. y T. K. Hodges, THE INORGANIC NO₃-:NH₄⁺ RATIO INFLUENCES PLANT REGENERATION AND AUXIN SENSITIVITY IN PRIMARY CALLUS DERIVED FROM IMMATURE EMBRYOS OF INDICA RICE (*ORYZA SATIVA* L.), *J. Plant Physiol.*, 136: 362-367, (1990).

Guha S. y S. C. Maheshwari, IN VITRO PRODUCTION OF EMBRYOS FROM ANTHERS OF DATURA, *Nature*, 204: 497, (1964).

Guimaraes M. L., M. C. Pimenta and J. Montezuma De Carvalho, PROBLEMS OF SOIL ADAPTATION IN PLANTLETS OF *COFFEA ARABICA* L. OBTAINED VIA SOMATIC EMBRYOGENESIS, *Acta Horticul.*, 212: 315-321, (1987).

Guzmán-Vargas N., ESTUDIO DE ALTERNATIVAS PARA LA CONSERVACIÓN IN VITRO DE CAFÉ (*COFFEA* spp.), CATIE, Turrialba, Costa Rica, (1989).

Haccius B., LES PREMIERS STAGES DES EMBRYONS VÉGÉTAUX ZYGOTIQUES ET SOMATIQUES SONT-ILS DIFFERENTS OÙ NON?, en: MEMOIRES COLL. MORPHOLOGIE, Anonymous, Société Botanique de France, 201-206, (1973).

Halperin W. y D. F. Wetherell, AMMONIUM REQUIREMENT FOR EMBRYOGENESIS IN VITRO, *Nature*, 205: 519-520, (1965).

Halperin W., ALTERNATIVE MORPHOGENETIC EVENTS IN CELL SUSPENSIONS, *Am. J. Bot.*, 53: 443-453, (1966).

Halperin W., EMBRYOS FROM SOMATIC PLANT CELLS, en: CONTROL MECHANISMS IN THE EXPRESSION OF CELLULAR PHENOTYPES, (Padykula H. A., ed.), Academic Press, New York, 169-191, (1970).

Halperin W., IN VITRO EMBRYOGENESIS: SOME HISTORICAL ISSUES AND UNRESOLVED PROBLEMS, en: IN VITRO EMBRIOGENESIS IN PLANTS, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1-16, (1995).

Hanna W. W., C. Lu y I. K. Vasil, UNIFORMITY OF PLANTS REGENERATED FROM SOMATIC EMBRYOS OF *PANICUM MAXIMUM* JACQ. (GUINEA GRASS), *Theor. Appl. Genet.*, 67: 155-159, (1984).

Hatanaka T., E. Sawabe, T. Azuma, N. Uchida y T. Yasuda, THE ROLE OF ETHYLENE IN SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM LEAF DISKS OF *COFFEA CANEPHORA*, *Plant Sci.*, 107: 199-204, (1995).

Herman E. B. y G. J. Haas, CLONAL PROPAGATION OF *COFFEA ARABICA* L. FROM CALLUS CULTURE, *HortScience*, 10: 588-589, (1975).

Higashi K., H. Kamada y H. Harada, THE EFFECTS OF REDUCED NITROGENOUS COMPOUNDS SUGGESTS THAT GLUTAMINE SYNTHETASE ACTIVITY IS INVOLVED IN THE DEVELOPMENT OF SOMATIC EMBRYOS IN CARROT, *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 45: 109-114, (1996).

Hirt H., A. Páy, J. Györgyey, L. Bakó, K. Németh, L. Bögör, R. J. Schwelyn, E. Heberle-Bors y D. Dudits, COMPLEMENTATION OF A YEAST CELL CYCLE MUTANT

BY AN ALFALFA CDNA ENCODING A PROTEIN KINASE HOMOLOGOUS TO P34CDC2, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 88: 1636-1642, (1991).

Hurtado D. V. M. y M. E. M. Merino, CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, Trillas, México, (1987).

Jaffé W. R. and M. Rojas, Biotechnology opportunities in Guatemala and Costa Rica, *Biotechnol. Develop. Monitor*, 20: 16-18, (1994).

Jones L. H., LONG-TERM SURVIVAL OF EMBRYOIDS OF CARROT (DAUCUS CAROTA L.), *Plant Sci. Lett.*, 2: 221-224, (1974).

Juma C., J. M. Magambo and H. Monteith, TISSUE CULTURE FOR COFFEE: THE CASE OF UGANDA, *Biotechnol. Develop. Monitor*, 20: 19-20, (1994).

Kamada H. y H. Harada, STUDIES ON NITROGEN METABOLISM DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CARROT. I. UTILIZATION OF α -ALANINE AS A NITROGEN SOURCE, *Plant Sci. Lett.*, 33: 7-13, (1984).

Kevers C., N. Le Gal, M. Monteiro, J. Dommes y T. Gaspar, SOMATIC EMBRYOGENESIS OF PANAX GINSENG IN LIQUID CULTURES: A ROLE FOR POLYAMINES AND THEIR METABOLIC PATHWAYS, *Plant Growth Reg.*, 31: 209-214, (2000).

Khan A. J. y S. C. Minocha, POLYAMINES AND SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CARROT. 2. THE EFFECTS OF CYCLOHEXYLAMMONIUM PHOSPHATE, *J. Plant Physiol.*, 137: 446-452, (1991).

Kochba J., G. Ben-Hayyim, P. Spiegel-Roy, S. Saad y H. Neumann, SELECTION OF STABLE SALT-TOLERANT CALLUS CELL LINES AND EMBRYOS IN CITRUS SINENSIS AND C. AURANTIUM., *Z. Pflanzenphysiol.*, 106: 111-118, (1982).

Krikorian A. D. y L. K. Simola, TOTIPOTENCY, SOMATIC EMBRYOGENESIS, AND HARRY WARIS (1893-1973), *Physiol. Plant.*, 105: 348-355, (1999).

Kunitake H. y M. Mii, SOMATIC EMBRYOGENESIS IN CITRUS SPECIES, en: BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY. VOL. 30. SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED I, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 280-298, (1995).

Lakshmi S. G., C. S. Vaidyanath y T. Ramakrishnan, APPLIED ASPECTS OF PLANT TISSUE CULTURE WITH SPECIAL REFERENCE TO TREE IMPROVEMENT, *Curr. Sci.*, 51: 88-92, (1982).

Lang J., R. Hamilton, H. Pedersen y C.-K. Chin, ALKALOIDS FROM ORGANIZED ATROPA BELLADONNA CULTURES, en: PLANT CELL BIOTECHNOLOGY, (Pais M. S. S. F. Mavituna y J. M. Novais, eds.), Springer-Verlag, Berlin, 245-249, (1988).

Ling P. P., Z. Cheng, and D. J. Musacchio, SOMATIC COFFEE EMBRYO QUALITY QUANTIFICATION USING MACHINE VISION, *In Vitro Cell.Dev.Biol.*, 30A: Pt.2 52 (1994). (Abstract)

Linsmaier E. M. y F. Skoog, ORGANIC GROWTH FACTOR REQUIREMENTS OF TOBACCO TISSUE CULTURES, *Physiol. Plant.*, 18: 100-127, (1965).

- Litz R. E. y R. L. Jarret, REGENERACIÓN DE PLANTAS EN EL CULTIVO DE TEJIDOS: EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y ORGANOGENÉSIS, en: CULTIVO DE TEJIDOS EN LA AGRICULTURA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES, (Roca W. M. y L. A. Mroginski, eds.), Centro Internacional de Agricultura Tropica, Colombia, 143-172, (1991).
- Litz R. E. y V. S. Jaiswal, MICROPROPAGATION OF TROPICAL AND SUBTROPICAL FRUITS, en: MICROPROPAGATION, (Debergh P. C. y R. H. Zimmerman, eds.), Kluwer Academic Publishers, Holanda, 247-263, (1991).
- Litz R. E., V. H. Mathews, P. A. Moon, F. Pliego-Alfaro, C. Yurgalevitch y S. G. DeWald, SOMATIC EMBRYOS OF MANGO (MANGIFERA INDICA L.), en: SYNTHETIC SEEDS. APPLICATIONS OF SYNTHETIC SEEDS TO CROP IMPROVEMENT, (Redenbaugh K., ed.), CRC Press, Boca Ratón, 409-425, (1993).
- Marques D. V., STUDY OF SOME FACTORS INVOLVED ON IN VITRO CALLUS GROWTH AND SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEE TISSUES, *Int. Congr. Plant Tissue Cell Cult.*, 6: 42 (1986). (Abstract)
- Meijer E. G. M. y D. C. W. Brown, 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, (1988).
- Menéndez A., E. G. de García and M. S. Nieto, COMPARATIVE STUDY OF PROTEIN ELECTROPHORETIC PATTERNS DURING EMBRYOGENESIS IN COFFEA ARABICA CV CATTIMOR, *Plant Cell Rep.*, 13: 197-202, (1994).
- Menéndez-Yuffá A. and E. G. de García, MORPHOGENIC EVENTS DURING INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEE "CATIMOR", *Protoplasma*, 199: 208-214, (1997).
- Mengoli M., N. Bagni, G. Luccarini, R. V. Nuti y D. Serafini-Fracassini, DAUCUS CAROTA CELL CULTURES: POLYAMINES AND EFFECT OF POLYAMINE BIOSYNTHESIS INHIBITORS IN THE PREEMBRYOGENIC PHASE AND DIFFERENT EMBRYO STAGES, *J. Plant Physiol.*, 134: 389-394, (1989).
- Michaux-Ferrière N. and J. Schwendiman, HISTOLOGY OF SOMATIC EMBRYOGENESIS, in: *13th Eucarpia Congress*, Berlin, 247-259, (1992).
- Michaux-Ferrière N. and P. Dublin, EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE CHEZ COFFEA ARABICA INDUCTION ET DÉVELOPPEMENT DES CELLULES EMBRYOGÈNES, in: *12^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café*, Montreux, 418-425, (1987).
- Michaux-Ferrière N., D. Bieyssé, D. Alvard and P. Dublin, ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE CHEZ COFFEA ARABICA, INDUISTE PAR CULTURE SUR MILIEUX UNIQUES DE FRAGMENTS FOLIAIRES DE GÉNOTYPES DIFFÉRENTS, *Café Cacao Thé*, 33: 207-217, (1989).

- Michaux-Ferrière N., P. Dublin and J. Schwendiman, ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE À PARTIR D'EXPLANTS FOLIAIRES DE COFFEA ARABICA L., *Café Cacao Thé*, 31: 103-111, (1987a).
- Michaux-Ferrière N., P. Dublin and J. Schwendiman, HISTOLOGICAL STUDY OF SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM FOLIAR EXPLANTS OF COFFEA ARABICA, *Café Cacao Thé*, 31: 112-114, (1987b).
- Minocha S. C. y R. Minocha, ROLE OF POLYAMINES IN SOMATIC EMBRYOGENESIS, en: BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY. VOL. 30. SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED I, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 53-70, (1995).
- Monaco L. C., M. R. Söndahl, A. Carvalho, O. J. Crocomo, and W. R. Sharp, APPLICATION OF TISSUE CULTURE IN THE IMPROVEMENT OF COFFEE, in: Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue, and organ culture, (Reinhard E. and Y. P. S. Bajaj, eds.), Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 109-129, (1977).
- Monnier M., CULTURE IN VITRO DE L'EMBRYON IMMATURE DE CAPSELLA BURSA-PASTORIS MOENCH (1), *Rev. Cyt. Biol. Veget.*, 39: 1-120, (1976).
- Montague M. J., J. W. Koppenbrink y E. G. Jaworski, POLYAMINE METABOLISM IN EMBRYOGENIC CELLS OF DAUCUS CAROTA I. CHANGES IN INTRACELLULAR CONTENT AND RATES OF SYNTHESIS, *Plant Physiol.*, 62: 430-433, (1978).
- Montes S., CULTIVO IN VITRO DE EMBRIONES DE COFFEA ARABICA L. VARIEDAD CATURRA, *Cultivos Tropicales*, 4: 49-55, (1982).
- Montezuma De Carvalho J. and M. L. Guimaraes, PLANT EMBRYOGENESIS VERSUS ANIMAL EMBRYOGENESIS: THE EXPERIMENTAL APPROACH, *Int. Congr. Plant. Tissue Cell Cult.*, 6: 42 (1986). (Abstract)
- Mullins M. G., PROPAGATION AND GENETIC IMPROVEMENT TO TEMPERATE FRUITS: THE ROLE OF TISSUE CULTURE, en: PLANT BIOLOGY VOL. 3. PLANT TISSUE AND CELL CULTURE, (Green C. E. D. A. Somers W. P. Hackett y D. D. Biesboer, eds.), Alan R. Liss, Co., New York, 395-406, (1987).
- Muniyamma A., TRIPLOID EMBRYOS FROM ENDOSPERM IN VIVO, *Ann. Bot.*, 41: 1077-1079, (1977).
- Murashige T. y F. Skoog, A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, (1962).
- Myccock D. J., J. Wesley Smith and P. Berjak, CRYOPRESERVATION OF SOMATIC EMBRYOS OF FOUR SPECIES WITH AND WITHOUT CRYOPROTECTANT PRE-TREATMENT, *Ann. Bot.*, 75: 331-336, (1995).
- Nagai C., Z. Mai, and J. Jong, DEVELOPMENT OF TRANSFORMATION SYSTEM FOR COFFEA ARABICA USING PARTICLE GUN METHOD, *Hortscience*, 27: 661 (1992). (Abstract)

- Nakamura T., T. Taniguchi and E. Maeda, STUDIES ON SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEE BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPE, *Jpn. J. Crop. Sci.*, 61: 476-486, (1992).
- Neuenschwander B. and T. W. Baumann, A NOVEL TYPE OF SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEA ARABICA, *Plant Cell Rep.*, 10: 608-612, (1992).
- Nishibata T., T. Azuma, N. Uchida, T. Yasuda, and T. Yamaguchi. AMINO ACIDS ON SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEA ARABICA, in: 839-844, (1995).
- Nitsch C., PROGRESS IN ANTER AND POLLEN CULTURE TECHNIQUES, en: CELL AND TISSUE CULTURE TECHNIQUES FOR CEREAL CROP IMPROVEMENT, Anonymous, Science Press, China, 1-10, (1983).
- Nomura K. y A. Komamine, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS, en: IN VITRO EMBRYOGENESIS IN PLANTS, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 249-265, (1995).
- Noriega C. and M. R. Söndahl. ARABICA COFFEE MICROPROPAGATION THROUGH SOMATIC EMBRYOGENESIS VIA BIOREACTORS, in: 15^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café, Montpellier, 73-81, (1993).
- Nouaille C. and V. Petiard, ARTIFICIAL SEEDS: DREAMS AND REALITIES, *Biofutur.*, 67: 33-38, (1988).
- Overvoorde P. J. y H. D. Grimes, THE ROLE OF CALCIUM AND CALMODULIN IN CARROT SOMATIC EMBRYOGENESIS, *Plant Cell Physiol.*, 35: 135-144, (1994).
- Pedersen H., G. H. Cho, D. Kim, D. Cazzulino, and C. K. Chin. MASS TRANSFER IN PLANT CELL SYSTEMS, in: 480-488, (1988).
- Pétiard V., H. Bollon, J. P. Ducos, B. Florin, M. Paillard, J. Spiral, and C. A. Zamarripa. BIOTECHNOLOGIES APPLIQUÉES AU CAFÉIER, in: 15^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café, Montpellier, 56-66, (1993).
- Price H. J. y R. H. Smith, SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SUSPENSION CULTURES OF GOSSYPIUM KLOTZSCHIANUM, *Planta*, 145: 305-307, (1979).
- Quiroz-Figueroa F. R., C. F. J. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera y V. M. Loyola-Vargas, HISTOLOGICAL STUDIES ON ONTOGENESIS, DEVELOPMENT STAGES AND DIFFERENTIATION OF TWO DIFFERENT SOMATIC EMBRYOGENESIS SYSTEMS OF COFFEA ARABICA, *Plant Cell Rep.*, (2002). (Sometido)
- Raghuramulu Y., K. Purushotham, M. S. Sreenivasan and P. K. Ramaiah, IN VITRO REGENERATION OF COFFEE PLANTLETS IN INDIA, *J. Coffee Res.*, 17: 57-64, (1987).
- Rangan T S., CLONAL PROPAGATION: SOMATIC EMBRYOS OF CITRUS, en: CELL CULTURE AND SOMATIC CELL GENETICS OF PLANTS VOL. 1. LABORATORY PROCEDURES AND THEIR APPLICATIONS, (Vasil I. K., ed.), Academic Press Inc., Orlando, 68-73, (1984).

- Rayns F. W., G. D. Weston, J. F. Hall, P. Harper and M. C. Elliot, SOMATIC EMBRYOGENESIS FOR COFFEE PROPAGATION, *Plant Physiol.*, 102: 181, (1993).
- Redenbaugh K., APPLICATION OF ARTIFICIAL SEED TO TROPICAL CROPS, *Hortscience.*, 25: 251-255, (1990).
- Reinert J., UBER DIE KONTROLLE DER MORPHOGENESE UND DIE INDUKTION VON ADVENTIVEMBRYONEN AN GEWEBEKULTUREN AUS KAROTTEN, *Planta*, 53: 318-333, (1959).
- Reinert J., Y. P. S. Bajaj y B. Zbell, ASPECTS OF ORGANIZATION ORGANOGENESIS, EMBRYOGENESIS, CYTODIFFERENTIATION, en: PLANT TISSUE AND CELL CULTURE. BOTANICAL MONOGRAPHS VOL. 11, (Street H. E., ed.), University of California Press, Berkeley, 389-427, (1977).
- Reynolds J. F. y T. Murashige, ASEXUAL EMBRYOGENESIS IN CALLUS CULTURES OF PALMS, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 15: 383-387, (1979).
- Rose D. y S. M. Martin, EFFECT OF AMMONIUM ON GROWTH OF PLANT CELLS (IPOMOEA SP.) IN SUSPENSION CULTURES, *Can. J. Bot.*, 53: 1942-1949, (1975).
- Roustan J.-P., A. Latché y J. Fallot, ROLE OF ETHYLENE ON INDUCTION AND EXPRESSION OF CARROT SOMATIC EMBRYOGENESIS: RELATIONSHIP WITH POLYAMINE METABOLISM, *Plant Sci.*, 103: 223-229, (1994).
- Santana N., EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL CULTIVO DEL CAFETO (COFFEA SP.), INCA, La Habana, (1993).
- Santana N., O. Martinez and M. C. Gonzales, EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL CULTIVO DEL CAFÉ (COFFEA ARABICA). (PARTE I.), *Cultivos Tropicales*, 10: 36-43, (1988).
- Santana N., S. Cortés, J. V. Martín and S. Montes, ADAPTACIÓN DE VITROPLANTAS DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE CAFETO (C. ARABICA L.) VARIEDAD CATIMOR (9722), *Cultivos Tropicales*, 11: 429-435, (1996).
- Sargent P. A. y J. King, INVESTIGATIONS OF GROWTH-PROMOTING FACTORS IN CONDITIONED SOYBEAN ROOT CELLS AND IN THE LIQUID MEDIUM IN WHICH THEY GROW: CYTOKININ-LIKE COMPOUNDS, *Can. J. Bot.*, 52: 2459-2463, (1974).
- Schwann Th., MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN UBER DIE UBERREINSTIMMUNG INDERSTRUKTURUNDEM WASHSTUME DER TIERE UND PFLANZEN, *Oswalds*, 1910, (1839).
- Sharp W. R., L. S. Caldas, O. J. Crocomo, L. C. Monaco y A. Carvalho, PRODUCTION OF COFFEA ARABICA CALLUS OF THREE PLOIDY LEVELS AND SUBSEQUENT MORPHOGENESIS, *Phyton*, 31: 67-74, (1973).
- Shetty K. y Y. Asano, THE INFLUENCE OF ORGANIC NITROGEN SOURCES ON THE INDUCTION OF EMBRYOGENIC CALLUS IN AGROSTIS ALBA L., *J. Plant Physiol.*, 139: 82-85, (1991).

- Skoog F. y C. O. Miller, CHEMICAL REGULATION OF GROWTH AND ORGAN FORMATION IN PLANT TISSUES CULTURED IN VITRO, *Symp. Soc. Exp. Bot.*, 11: 118-130, (1957).
- Skoog F. y C. Tsui, CHEMICAL CONTROL OF GROWTH AND BUD FORMATION IN TOBACCO STEM SEGMENTS AND CALLUS CULTURED IN VITRO, *Am. J. Bot.*, 35: 782-787, (1948).
- Smith S. M. y H. E. Street, THE DECLINE OF EMBRYOGENIC POTENTIAL AS CALLUS AND SUSPENSION CULTURES OF CARROT (*DAUCUS CAROTA L.*) ARE SERIALLY SUBCULTURED, *Ann. Bot.*, 38: 223-241, (1974).
- Smith W. K. y L. H. Jones, PLANT PROPAGATION THROUGH CELL CULTURES, *Chem. Ind.*, 44: 1399, (1970).
- Söndahl M. R. and A. Bragin, SOMACLONAL VARIATION AS A BREEDING TOOL FOR COFFEE IMPROVEMENT, in: *14^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café*, San Francisco, 701-710, (1991).
- Söndahl M. R. and C. Noriega, COFFEE SOMATIC EMBRYOGENESIS IN LIQUID CULTURES, *In Vitro Cell.Dev.Biol.*, 28: 93A (1992). (Abstract)
- Söndahl M. R. and J. A. Lauritis, COFFEE, *Biotechnol. Agric.*, 401-420, (1992).
- Söndahl M. R. and W. R. Sharp, HIGH FREQUENCY INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN CULTURED LEAF EXPLANTS OF *COFFEA ARABICA L.*, *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408, (1977).
- Söndahl M. R. and W. R. Sharp, 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 and V. Raghavan, eds.), Ohio State University Press, Columbus, 527-584, (1979).
- Söndahl M. R., D. Spahlinger and W. R. Sharp, 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, (1979b).
- Söndahl M. R., J. L. Salisbury and W. R. Sharp, SEM CHARACTERIZATION OF EMBRYOGENIC TISSUE AND GLOBULAR EMBRYOS DURING HIGH FREQUENCY SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEE CALLUS CELLS, *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 185-188, (1979a).
- Söndahl M. R., L. C. Monaco, and W. R. Sharp, *IN VITRO METHODS APPLIED TO COFFEE*, in: *Plant tissue culture. Methods and applications in agriculture*, (Thorpe T. A., ed.), Academic Press, New York, 325-347, (1981).
- Söndahl M. R., T. Nakamura and W. R. Sharp, PROPAGATION OF COFFEE, *Basic. Life Sci.*, 32: 215-232, (1985).
- Söndahl M. R., T. Nakamura, and W. R. Sharp, PROPAGACIÓN *IN VITRO* DEL CAFÉ, in: *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*, (Roca W. and L. A. Mroginski, eds.), CIAT, Cali, Colombia, 621-642, (1991).

- Söndahl M. R., TISSUE CULTURE OF MORPHOLOGICAL MUTANTS OF COFFEE, *Plant Tissue Culture*, 5: 417 (1982). (Abstract)
- Söndahl M. R., W. R. Romig and A. Bragin, INDUCTION AND SELECTION OS SOMACLONAL VARIATION IN COFFEE, 2699648, 5436395, New Jersey, USA, (1995).
- Spiral J. and V. Pétiard. DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE DE TRANSFORAMTION APPLIQUÉE À DIFFÉRENTES EAPÈCES DE CAFÉIER ET RÉGÉNÉRATION DE PLANTULES TRANSGÉNIQUES, in: *15º Colloque de la Association Scientifique Internationale du café*, Montpellier, 115-122, (1993).
- Staritsky G., EMBRYOID FORMATION IN CALLUS TISSUES OF COFFEE, *Acta Bot. Need.*, 19: 509-514, (1970).
- Stemmer W., RESULTS OF RECENT RESEARCH ON COFFEE TISSUE CULTURE, *News Lett.*, 21-28, (1979).
- Steward F. C., M. O. Mapes y J. Smith, GROWTH AND ORGANIZED DEVELOPMENT OF CULTURED CELLS. I. GROWTH AND DIVISION OF FREELY SUSPENDED CELLS, *Am. J. Bot.*, 45: 693-703, (1958b).
- Steward F. C., M. O. Mapes y K. Mears, GROWTH AND ORGANIZED DEVELOPMENT OF CULTURED CELLS. II.ORGANIZATION IN CULTURES GROWN FROM FREELY SUSPENDED CELLS, *Am. J. Bot.*, 45: 705-708, (1958a).
- Steward F. C., M. O. Mapes, A. E. Kent y R. D. Holsten, GROWTH AND DEVELOPMENT OF CULTURED PLANT CELLS, *Science*, 143: 20-22, (1964).
- Street H. E. y L. A. Withers, THE ANATOMY OF EMBRYOGENESIS IN CULTURE, en: TISSUE CULTURE AND PLANT SCIENCE, (Street H. E., ed.), Academic Press, London, 71-100, (1970).
- Street H. E., CELL CULTURES: A TOOL IN PLANT BIOLOGY, en: CELL GENETICS IN HIGHER PLANTS, (Dudits D. G. L. Farkas y P. Maliga, eds.), House Hungarian Academy of Sciences; Budapest, Hungría, 7-38, (1976).
- Strickland S. G., J. W. Nichol, C. M. McCall y D. A. Stuart, EFFECT OF CARBOHYDRATE SOURCE ON ALFALFA SOMATIC EMBRYOGENESIS, *Plant Sci.*, 48: 113-121, (1987).
- Stuart D. A. y S. G. Strickland, SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM CELL CULTURES OF MEDICAGO SATIVA L. II. THE INTERACTION OF AMINO ACIDS WITH AMMONIUM, *Plant Sci. Lett.*, 34: 175-181, (1984).
- Sung Z. R., J. M. Smith, J. H. Choi, M. Krauss, C. Borkird y J.-S. Liu, GENE EXPRESSION IN EMBRYOGENESIS, *HortScience*, 23: 513-515, (1988).
- Sussex I., THEMES IN PLANT DEVELOPMENT, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 49: xiii-xxii, (1998).
- Tahara M., T. Nakanishi, T. Yasuda, and T. Yamaguchi. HISTOLOGICAL AND BIOLOGICAL ASPECTS IN SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEA

- ARABICA, in: 16^e Colloque Scientifique International sur le café. Kyoto. 860-867. (1995).
- Tahara M., T. Yasuda, N. Uchida and T. Yamaguchi. FORMATION OF SOMATIC EMBRYOS FROM PROTOPLASTS OF COFFEA ARABICA L. *Hortscience*. 29: 172-174. (1994).
- Taylor R. L., THE FOLIAR EMBRYOS OF MALAXIS PALUDOSA. *Can. J. Bot.* 45: 1553-1556. (1967).
- Tessereau H., DÉVELOPPEMENT D'UNE MÉTHODE SIMPLIFIÉE DE CRYOCONSERVATION DE TISSUS ET D'EMBRYONS SOMATIQUES VÉGÉTAUX ET ÉTUDE DE L'ACQUISITION DE LA TOLÉRANCE À LA CONGÉLATION. Université Paris VI. Paris. (1993).
- Thomas E., P. J. King y I. Potrykus, SHOOT AND EMBRYO-LIKE STRUCTURES FROM CULTURED TISSUES OF SORGHUM BICOLOR. *Naturwissenschaft*. 64: 587. (1977).
- Thorpe T. A., FRONTIERS OF PLANT TISSUE CULTURE 1978, International Association for Plant Tissue Culture 1978. Calgary. (1978).
- Thorpe T. A., ORGANOGENESIS. STRUCTURAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ASPECTS, en: PLANT AGING: BASIC AND APPLIED APPROACHES, (Rodriguez R. R. S. Tames y J. Durzan, eds.), Plenum Press. New York. 191-197. (1990).
- Timmers A. C. J., CALCIUM AND CALMODULIN DURING CARROT SOMATIC EMBRYOGENESIS, en: THE IMPACT OF BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE, (Sangwan R. S. y B. S. Sangwan-Norreel, eds.), Kluver Academic Publishers. Netherlands, 215-234. (1990).
- Timmers A. C. J., H. D. Reiss, J. Bohsung, K. Traxel y J. H. N. Schel, LOCALIZATION OF CALCIUM DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CARROT (DAUCUS CAROTA L). *Protoplasma*. 190: 107-118. (1996).
- Timmers A. C. J., S. C. De Vries y J. H. N. Schel, DISTRIBUTION OF MEMBRANE-BOUND CALCIUM AND ACTIVATED CALMODULIN DURING SOMATIC EMBRYOGENESIS OF CARROT (DAUCUS CAROTA L.). *Protoplasma*. 153: 24-31. (1989).
- Tisserat B., EMBRYOGENESIS, ORGANOGENESIS AND PLANT REGENERATION, en: PLANT CELL CULTURE. A PRACTICAL APPROACH, (Dixon R. A.. ed.). IRL Press. Oxford. 79-105. (1985)
- Toala-Menéndez M., ESTUDIO DE LA ASINCRONÍA EN EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN EL CULTIVO DEL CAFETO (COFFEA SPP.). INCA, San José de las Lajas, Cuba. (1994).
- Toruan-Mathius N., ISOLATION AND PROTOPLASTS CULTURE OF COFFEA ARABICA L. *Biotechnol. Forest. Tree Improvement*. 89-98. (1992).
- Vagera J y P. Havranek, EFFECT OF MINIMIZATION OF CULTURE MEDIUM ON THE PROCESS OF ANDROGENESIS IN VITRO (NICOTIANA TABACUM L.

- VAR. WHITE BURLEY DATURA INNOXIA MILL.), *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 177: 266-274, (1982).
- Van Boxtel J. and M. Berthouly, 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, (1996).
- Vasil I. K., SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION IN CEREALS AND GRASSES, en: PLANT TISSUE CULTURE 1982, (Fujiwara A., ed.), The Japanese association for Plant Tissue Culture, Japan, 101-104, (1982).
- Vasil V. y I. K. Vasil, ISOLATION AND CULTURE OF CEREAL PROTOPLASTS; 2: EMBRYOGENESIS AND PLANTLET FORMATION FROM PROTOPLASTS OF PENNISETUM AMERICANUM, *Theor. Appl. Genet.*, 56: 97-100, (1980).
- Vasil V. y I. K. Vasil, SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM TISSUE CULTURES OF PENNISETUM AMERICANUM, AND P. AMERICANUM X P. PURPUREUM HYBRID, *Am. J. Bot.*, 68: 864-872, (1981a).
- Vasil V. y I. K. Vasil, SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM SUSPENSION CULTURES OF PEARL MILLET (PENNISETUM AMERICANUM), *Ann. Bot.*, (1981b).
- Velicky I. A. y D. Rose, NITRATE AND AMMONIUM AS NITROGEN NUTRIENTS FOR PLANT CELL CULTURES, *Can. J. Bot.*, 51: 1837-1844, (1973).
- Villalobos A. V. M., HISTORIA DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, en: FUNDAMENTOS TEÓRICOS-PRÁCTICOS DEL CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES, (Rosell C. H. y A. V. M. Villalobos, eds.), FAO, Roma, 3-7, (1990).
- Vöchting H., UBER ORGANBILDUNG IM PFLANZENREICH, Verlag von Max Cohen & Sohn, Bonn, (1878).
- Walker K. A. y S. J. Sato, MORPHOGENESIS IN CALLUS TISSUE OF MEDICAGO SATIVA: THE ROLE OF AMMONIUM ION IN SOMATIC EMBRYOGENESIS, *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 1: 109-121, (1981).
- Wetherell D. F. y D. K. Dougall, SOURCES OF NITROGEN SUPPORTING GROWTH AND EMBRYOGENESIS IN CULTURED WILD CARROT TISSUE, *Physiol. Plant.*, 37: 97-103, (1976).
- Wetherell D. F., ENHANCED ADVENTIVE EMBRYOGENESIS RESULTING FROM PLASMOLYSIS OF CULTURED WILD CARROT CELLS, *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 5: 221-227, (1984).
- Yasuda T., M. Tahara, N. Uchida, and T. Yamaguchi, SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM COFFEE CALLUS AND PROTOPLAST, *Int. Congr. Plant. Tissue Cell Cult.*, 6: 137 (1986). (Abstract)
- Yasuda T., Y. Fujii y T. Yamaguchi, EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION FROM COFFEA ARABICA LEAF EXPLANTS BY BENZYLADENINE, *Plant Cell Physiol.*, 26: 595-597, (1985).

Yeung E. C., ESTRUCTURAL AND DEVELOPMENT PATTERNS IN SOMATIC EMBRYOGENESIS, en: IN VITRO EMBRYOGENESS IN PLANTS, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 205-247, (1995).

Zamarripa C. A., J. P. Ducos, H. Tessereau, H. Bollon, A. B. Eskes, and V. Pétiard. DÉVELOPPEMENT D'UN PROCÉDÉ DE MULTIPLICATION EN MASSE DU CAFÉIER PAR EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE EN MILIEU LIQUIDE, in: 14^e Colloque de la Association Scientifique Internationale du café, San Francisco, 392-402, (1991).

Zamarripa C. A., OPTIMIZACIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE CAFÉ ARABUSTA (COFFEA CANEPHORA P. COFFEA ARABICA L.) A PARTIR DE UNA SUSPENSIÓN CELULAR, *Agric. Téc. Méx.*, 20: 27-41, (1994).

Zamarripa C.A., ETUDE ET DÉVELOPPEMENT DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE EN MILIEU LIQUIDE DU CAFÉIER (COFFEA CANEPHORA P., COFFEA ARABICA L. ET L'HYBRIDE ARABUSTA, Centre de Biotechnologie Végétale Francereco, Francia, (1993).

Zatyko J. M., I. Simon, I. Szalay y I. Molnar, MIXED CULTURE OF CALLUS HOMOGENATES OF DIFFERENT PLANT SPECIES IN VITRO, en: PLANT TISSUE CULTURE 1982, (Fujiwara A., ed.), The Japanese association for Plant Tissue Culture, Japan, 61-62, (1982).

Zimmerman J. L., SOMATIC EMBRYOGENESIS: A MODEL FOR EARLY DEVELOPMENT IN HIGHER PLANTS. *The Plant Cell*, 5:1411-1423, (1993).

Objetivos

General

- Establecer y caracterizar un sistema eficiente de embriogénesis somática de *Coffea arabica* L.

Específicos

- Evaluar protocolos publicados en la literatura para discriminar cual es el más reproducible y eficiente.
- Seleccionar un protocolo como modelo para el estudio de la embriogénesis somática de *C. arabica* L.
- Caracterizar histológica y morfológicamente el sistema seleccionado.
- Establecer el efecto de la variación en la concentración inicial de nitrógeno total en el medio de cultivo sobre la respuesta del tejido inoculado.
- Analizar el efecto de la relación nitrato/amonio sobre la respuesta del explante utilizado.

Hipótesis

Si el metabolismo nitrogenado influye sobre la embriogénesis somática *in vitro*, entonces, la variación de la concentración inicial del nitrógeno total, así como la relación entre el nitrógeno oxidado y reducido en el medio de cultivo, modificarán la respuesta de los explantes a la inducción de la embriogénesis somática en *Coffea arabica L.*

CAPÍTULO 2

Coffee Tissue Culture as a New Model for the Study of Somatic Variation.

Fuentes-Cerda, C.F.J., Monforte-González, M., Méndez-Zeel, M., Rojas-Herrera, R., Mijangos-Cortés, J., Loyola-Vargas., V.M. (1999). ASIC'99. 18th International Conference on Coffee Science. Helsinki, Finland, pp 302 - 307.

2.1. INTRODUCTION

Somatic embryogenesis is the process by which somatic cells differentiate into embryos, which are capable to germinate and produce a new plant. Somatic embryogenesis was discovered 40 years ago by two independent groups. Since then the applied potential of the discovery was visualized. Actually there are hundred of hectares planted with different crops that were obtained by somatic embryogenesis.

In vitro somatic embryogenesis of *C. canephora* was first reported by Staritsky (1970), who described the induction of callus tissue from orthotropic internodes; later, Herman and Hass (1975) obtained somatic embryogenesis in *C. arabica* from callus cultures derived from leaf explants. Söndahl and Sharp (1977; 1979), developed a two phases experimental protocol for somatic embryogenesis from leaves of *C. arabica* of the 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 µM benzylamino purine (BAP), white and friable calli were obtained after 16 weeks and somatic embryos were obtained four weeks following calli initiation.

Vigorous research using both *C. canephora* and *C. arabica*, has allowed the use of different explants such as orthotropic stem fragments, plagiotropic branches, leaves, ovules, etc., (Dublin, 1980a; Dublin, 1980b; Dublin, 1981). Leaves has proved to be the best explants for this purpose. The systems proposed by Dublin (1980a; 1980b; 1981) and Söndhal and Sharp (1977; 1979) are among the most successful; in both methods indirect somatic embryogenesis is promoted.

The ASIC conferences had been the forum during the last years where the advances in the study of somatic embryogenesis has been presented, including the scale-up of the process.

The somatic embryogenesis in coffee is very different from somatic embryogenesis in other species. The somatic embryogenesis process in carrot takes only a few days, while in coffee takes several weeks in the better of the cases. In the other hand, in some cases, as the one described by Söndhal group, the process takes place in two steps; after several weeks a small amount of somatic embryos are produced in a process that Söndahl called Low Frequency Somatic Embryogenesis (LFSE), after this and on the top of the brown tissue a new production of somatic embryos takes place. This was called High Frequency Somatic Embryogenesis (HFSE).

Morphogenesis in tissue culture dependent mainly of two major parameters: the kind and amount of growth regulators and the nature of the nitrogen source used.

In general, the research on coffee somatic embryogenesis had been focused in the use of different growth regulators and nothing has been done with the nitrogen source.

We are interesting in to answer question such as: why it takes so long the somatic embryogenesis process in coffee? Which is the role of the nitrogen source on coffee somatic embryogenesis? Does the coffee tissue culture secrete proteins into the culture medium? If so, are they involve in the somatic embryogenesis process?

The protocol described here is a simple one step system for the induction of direct somatic embryogenesis of *C. arabica*, which can be used to answer some of the questions addressed before.

2.2. RESULTS

For the induction of somatic embryogenesis, leaf fragments (0.25 cm^2) from plants cultivated in vitro, under aseptic conditions, were cultured in the medium previously described by Yasuda et al., (1985), using Gelrite as gelling agent.

Two weeks after the explants were colocated under the incubation conditions, a callus was formed in some of the injured edges of the leaves. On other sites of the leaf edges, globular somatic embryo-like structures began to form. These structures developed in true somatic embryos after day 21. These structures were separated and colocated in Magenta boxes containing the germination medium. The somatic embryos germinated and produced plants after a few weeks. Actually we have more than 700 plants, produced by this method, under greenhouse conditions, and several thousands more in Magenta boxes (Figure 2.1).

More than 100 plants has been analyzed by the AFLP technique, looking for somaclonal variation. However, all plants had showed exactly the same pattern, suggesting that there are not genetic differences between them. Similar results, no somaclonal variation, has been obtained by the french group in Central America and by Dr. Söndhal in Brasil in plants obtained by different somatic embryogenesis methods.

A thousand plants will be planted into the field next september, in order to follow their development under field conditions.

Histological studies showed the formation of proembryos directly from cells rather than from the callus. Although Dublin (1981) had reported direct somatic embryogenesis from Arabusta (*C. arabica* x *C. canephora*), no histological evidence supported his results. As can be seen in figure 2 (A – D), proembryos originated from the mesophyll cells and in some few cases, from epidermal cells. Indirect embryo formation was also observed from microcalli.

It is known that the origin of the explant has a strong influence in the response of the explants to somatic embryogenesis. We tested if coffee is the case.

The leaf number 3 showed the best results to the induction of somatic embryogenesis in the number of embryos per explant. Explants obtained near the apex showed a diminished response compared to those obtained from the basis of the leaf.

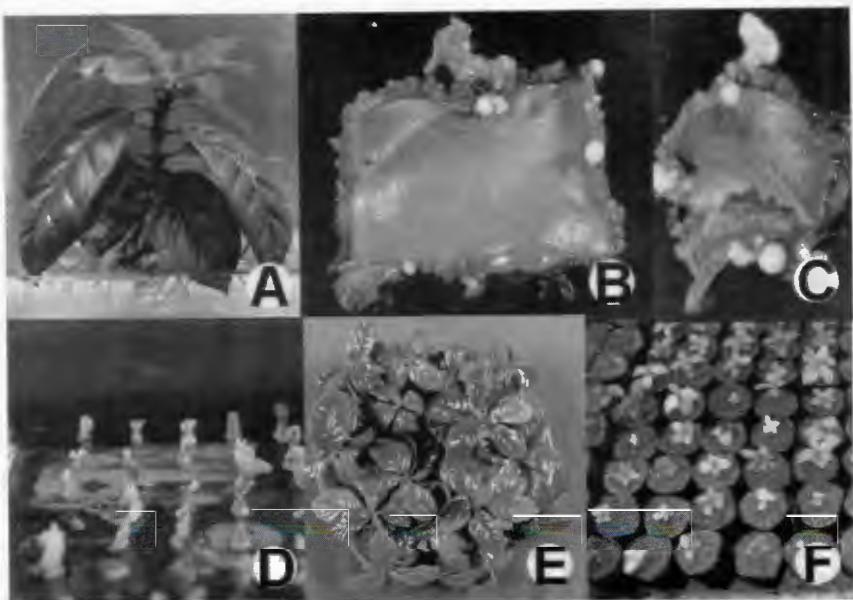


Figure 2.1. Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. A) In vitro cultured plant used as explant source. B and C) Embryos at different stages of development. D) Germination of somatic embryos. E and F) Plants at greenhouse.

Since the early 60s it is known that the nitrogen source has an important effect on plant differentiation. The total nitrogen, the nitrate/ammonium ratio and the type of the nitrogen source, have a deep effect on the response of the explants to the somatic embryogenesis process. However, as already was mentioned, the effect of nitrogen source on somatic embryogenesis has not been studied in coffee.

As the total nitrogen in the medium increased, the response to somatic embryogenesis decreased. A 60 mM nitrogen concentration had a strong inhibitory effect as well as the number of embryos-explant (Figure 2.3), the lowest concentrations, between 4-9 mM gave the maximum response (Figure 2.4).

The nitrate/ammonium ratio also modified the response. The presence of ammonium is essential to obtain a response and nitrate has an inhibitory effect. In fact, both nitrogen sources are essential to induce the phenomenon.

When the effect of the nitrogen source was measured 100 days after the induction, it was clear that nitrogen concentrations over 30 mM are inhibitory, and that the presence of ammonium is very important for the development of the process.



Figure 2.2. Histological study of direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. A) Development center at the edge of the leaf. B) Somatic embryos at initial development stage.

CONCLUSIONS

Direct somatic embryogenesis is the formation of somatic embryos from the explant without the formation of an intermediate calliphase (Raghavan y Sharmá, 1995). The production of callus is usually undesirable if embryogenesis is the goal of the research. Unfortunately, in most plants, direct somatic embryogenesis is difficult to obtain. This process in leaves does not happen frequently. Conger *et al.*, (1995) and Trigiano *et al.*, (1987) have reported direct somatic embryogenesis from leaves of *Dactylis glomerata* and Dubois *et al.*, (1991) in *Cichorium*.

To our knowledge this is the first report of direct somatic embryogenesis from explants of leaves in *Coffea arabica* supported by histological evidence. We had modified the protocol described by Yasuda *et al.*, (1985) to create a model that allows us:

- To use in vitro cultured plants as starting material and this generate lines from selected plants.
- A fast and responsive system (globular embryos are obtained at day 22) in contrast with other systems where embryos take 2 or 3 months to develop.

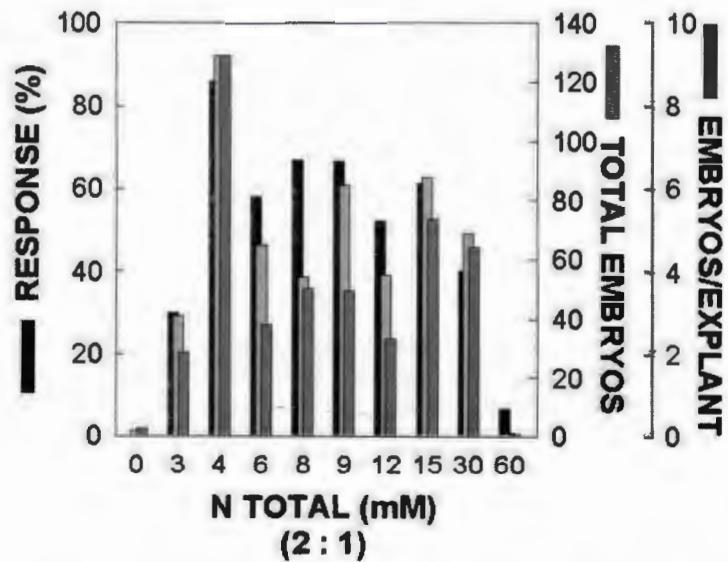


Figure 2.3. Effect of nitrogen source on somatic embryogenesis induction in *Coffea arabica*.

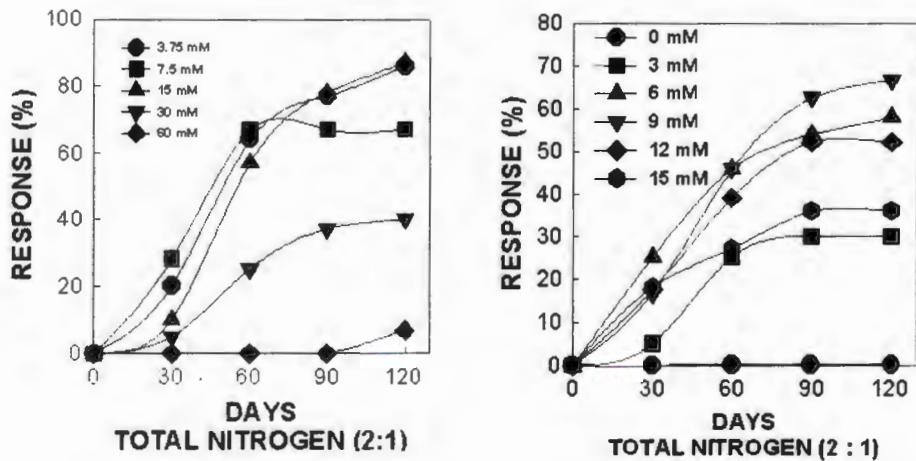


Figure 2.4. Effect of nitrogen source on somatic embryogenesis induction in *Coffea arabica* after 120 days of culture.

The separation between the leaf tissue, the callus and the somatic embryos, let to obtained a pure sample to analyze what is happened at the biochemistry and molecular level!

Using this model and usign differential display and RT-PCR, we isolated 5 cDNA, that are involved in the response of the tissue to somatic embryogenesis. Three of them has been sequenced. One of them has a high homology with quitinase, this sequence has been already registered in the Gene Bank; a second one with an oxygenase; the third is an unknown gene. The other two are actualy been sequenciated.

Actually we are studying the enzymes of nitrogen assimilation as well as the expression of their genes in orden to learn how the genetic program of the tissue is changed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks Dr. Teresa Hernández for the revision of the English version of the manuscript. The work of the authors has been supported by CONACyT, México, grant 4123P-N and Consejo Mexicano del Café.

REFERENCES

- Conger B. V., R. N. Trigiano, D. J. Gray y J. K. McDaniel, SOMATIC EMBRYOGENESIS IN ORCHARDGRASS (DACTYLIS GLOMERATA L.), en: BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY, VOL. 31. SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED II, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 70-80, (1995).
- Dublin P., INDUCTION DE BOURGEONS NÉOFORMÉS ET EMBRYOGENÉSE SOMATIQUE. DEUX VOIES DE MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE IN VITRO DES CAFÉIERS CULTIVÉS, *Café Cacao Thé*, XXIV: 121-130, (1980a).
- Dublin P., MULTIPLICATION VÉGÉTATIVE IN VITRO DE L'ARABUSTA, *Café Cacao Thé*. XXIV: 281-290, (1980b).
- Dublin P., EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE DIRECTE SUR FRAGMENTS DE FEUILLES DE CAFÉIER ARABUSTA, *Café Cacao Thé*, 25: 237-242, (1981).
- Dubois T., M. Guedira y J. Vasseur, DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN LEAVES OF CICHORIUM. A HISTOLOGICAL AND SEM STUDY OF EARLY STAGES, *Protoplasma*, 162: 120-127, (1991).
- Herman E. B. y G. J. Haas, CLONAL PROPAGATION OF COFFEA ARABICA L. FROM CALLUS CULTURE, *HortScience*, 10: 588-589, (1975).
- Raghavan V. y K. K. Sharma, ZYGOTIC EMBRYOGENESIS IN GYMNOSPERMS AND ANGIOSPERMS, en: IN VITRO EMBRYOGENESS IN PLANTS, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 73-115, (1995).
- Söndahl M. R. y W. R. Sharp, HIGH FREQUENCY INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN CULTURED LEAF EXPLANTS OF COFFEA ARABICA L., *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408, (1977).

Söndahl M. R. y W. R. Sharp, RESEARCH IN COFFEA SPP. AND APPLICATIONS OF TISSUE CULTURE METHODS, en: PLANT CELL AND TISSUE CULTURE PRINCIPLES AND APPLICATIONS, (Sharp W. R. P. O. Larsen E. F. Paddock y V. Raghavan, eds.), Ohio State University Press, Columbus, 527-584, (1979).

Staritsky G., EMBRYOID FORMATION IN CALLUS TISSUES OF COFFEE, *Acta Bot. Need.*, 19: 509-514, (1970).

Trigiano R. N. y B. V. Conger, REGULATION OF GROWTH AND SOMATIC EMBRYOGENESIS BY PROLINE AND SERINE IN SUSPENSION CULTURES OF DACTYLIS GLOMERATA, *J. Plant Physiol.*, 130: 49-55, (1987).

Yasuda T., Y. Fujii y T. Yamaguchi, EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION FROM COFFEA ARABICA LEAF EXPLANTS BY BENZYLADENINE, *Plant Cell Physiol.*, 26: 595-597, (1985).

CAPÍTULO 3

Morphological and Histological Analysis of Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea arabica*.

Fuentes-Cerda C.F.J., Rojas-Herrera R. and Loyola-Vargas V.M.

SUMMARY

Histocytological analysis during the somatic embryogenesis process on leaf explants of *C. arabica* showed that, with the culture method involving a single medium, the entire region surrounding the edge of the plant-derived leaf explants, cultured on gelrite-containing semisolid medium, showed the differentiation of organized structures with little or no callusing. Histological examination of the embryogenesis process without callus formation revealed that about one week after the explant was placed in culture, the development of the embryo began with a small, isodiametric, densely cytoplasmic cell, undergoing a series of organized divisions. Our histological observations enable us to assume that both direct and indirect somatic embryos of coffee, formed on explanted leaf segments and callus respectively, have an unicellular origin.

3.1. INTRODUCTION

Somatic or asexual embryogenesis is the process whereby somatic cells develop into plants through characteristic morphological stages (Bredemeijer *et al.*, 1985). For dicotyledonous plants these are globular-, heart-, torpedo- and cotyledonary-shaped stages.

The ability to produce morphologically well formed and normally developed embryos and, indeed, whole plants from undifferentiated somatic cells in culture, through the process of somatic embryogenesis, resides uniquely within the plant kingdom (Zimmerman, 1993). In addition, development of somatic and zygotic embryos is highly similar, (Dodeman *et al.*, 1997; Hood y Jilka, 1999; Zimmerman, 1993). Therefore somatic embryogenesis provides a useful model to study embryo development in plants.

Somatic embryogenesis is an ideal system for the study of the differentiation process in plants. In contrast to zygotic embryogenesis, somatic embryogenesis can easily be observed, the culture conditions of the embryos can be controlled, and large quantities of embryos can be easily obtained (Kawahara y Komamine, 1995). Somatic embryogenesis can serve as a model system, as well as a material source for the study at molecular and morphogenetic levels, of the early events that occur during the embryogenesis in higher plants.

Two types of somatic embryogenesis are recognized. The term "direct" is applied to explants which undergo a minimum of proliferation before forming somatic embryos. The term "indirect" corresponds to explants which undergo an extensive period of

disorganized proliferation before the development of somatic embryos occurs (Meijer y Brown, 1988). In others words, it is suggested that in direct embryogenesis pre-embryonic determined cells are present and require favorable inductive conditions to initiate the embryo development, while indirect embryogenesis requires re-determination of differentiated cells to acquire the embryogenic status, prior to the initiation of embryo development (Yeung, 1995). However, the terms "direct" and "indirect" are still useful in describing cases where either very little or a great deal of explant proliferation proceeds embryogenesis, but does not necessarily indicate the fundamental differences in the cells involved (Halperin, 1995).

There is no doubt that for direct somatic embryogenesis, the somatic embryo has a unicellular origin, whereas, with indirect somatic embryogenesis there are different opinions regarding the unicellular or multicellular origin of the somatic embryos. Histological studies of somatic embryos of different species have described both unicellular (Faure *et al.*, 1996; Jones y Rost, 1989; Trigiano *et al.*, 1989) and multicellular (Fernandez *et al.*, 1999; Rodriguez y Wetzstein, 1998; Taylor y Vasil, 1996) pathways. In both cases a metabolic co-operation could occur between neighboring cells.

Somatic embryogenesis in *C. canephora* was first reported by Staritsky, (1970), and in *C. 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), Bieysse *et al.* (1993) and Menéndez-Yuffá and de García (1996).

Although the histological description has been extensively recorded in several models, there is no histological study in coffee that shows the development from one single cell to a somatic embryo. The aim of the present study is to compare the most relevant characteristics of the induction of somatic embryogenesis with and without callus formation. In this work, we present the ontogenesis, the developmental stages and the differentiation of the somatic embryogenesis process of *C. arabica* cv. Caturra Rojo and demonstrate that the sequential events in the embryo development are conserved and arise through symmetric one unicellular pathway.

3.2. MATERIALS AND METHODS

3.2.1. PLANT MATERIAL

Seeds of *C. arabica* cv. "Caturra Rojo" were collected from several productive plots at Chiapas, Mexico. Seeds were washed and soaked for 24 - 48 hours in sterile distilled water, disinfected with commercial bleach (1.25% v/v sodium hypochlorite) for 20 minutes and finally rinsed with sterile water. The zygotic embryos were germinated in MS medium (Murashige y Skoog, 1962), supplemented with thiamine (29.6 µM), myo-inositol (0.555 µM), biotin (0.41 µM), L-cysteine (0.15 µM), glucose (166.48 mM), NAA (0.53 µM), Kin (2.32 µM) and Gelrite® (0.25% w/v); pH was adjusted to 5.7 before autoclaving (20 min, 110°C). Ten embryos were placed on each Magenta® plastic box. The embryos were cultivated under photoperiod (16 h/8 h, light/darkness) and 25 ± 2°C. Plantlets were grown in Magenta® boxes, containing 40 mL of MS medium, supplemented with thiamine (11.86 µM), myo-inositol (0.56 µM), L-cysteine (0.16 µM),

sucrose (87.64 mM), NAA (0.54 µM), Kin (2.32 µM) and Gelrite® (0.25% w/v); pH was adjusted to 5.8 before autoclaving (20 min, 110°C). The plantlets were cultured under photoperiod (16 h/8 h light/darkness) and 25 ± 2°C. Plantlets were transferred to fresh medium every 90 days.

3.2.2. SOMATIC EMBRYOGENESIS

Leaf fragments (0.25 cm²) were cultured in the medium previously described by Yasuda *et al.* (1985), using Gelrite® (0.25% w/v) as gelling agent and incubated under photoperiod (16 h/8 h light/darkness) at 25 ± 2°C of temperature.

3.2.3. HISTOLOGICAL STUDY

Foliar explants of the first system were collected 60 days after induction conditions; while for the second system, representative samples of embryogenic clusters cells were taken to carried out the study. Both set of samples were fixed with FAA (10% formalin, 5% acetic acid, 50% ethanol v/v) for 24 h under negative pressure (5 to 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 (plastic resin) JB-4 (JB-4® Embedding Kit, Poliscience). Sections (6 µm thick) were stained with 0.5% toluidine blue in 200 µM acetate buffer. Macroscopic features were photographed using a stereoscope (Stemi SV11, ZEISS) with Kodak Plus-X-Pan film at ASA 125. Photographs of the histological study were taken on a standard Axioplan microscope (Axioplan, ZEISS) and Kodak Plus-X-Pan film at ASA 125 with green filter.

3.3. RESULTS

3.3.1. EMBRYOGENESIS INDUCTION

Direct somatic embryogenesis process was induced with BAP like only growth regulator. Induction of direct somatic embryogenesis, using only cytokinin as growth regulator, has been observed in species like *Brassica campestris* (Maheswaran y Williams, 1986a; Maheswaran y Williams, 1986b), *Linum usitatissimum* (Pretova y Williams, 1986), *Trifolium* spp. (Cui *et al.*, 1988; Majewska-Sawka y Nothnagel, 2000), *Abies alba* (Schuller *et al.*, 1989), *Helianthus annus* (Jeanning y Hahne, 1991), *Solanum tuberosum* (Pretova y Dedikova, 1992), *Ipomoea batatas* (Desamero *et al.*, 1994), *Lycopersicon esculentum* (Gill *et al.*, 1998), *Vitis vinifera* (Faure *et al.*, 1996), *Begonia gracilis* (Castillo y Smith, 1997) and *Triticum durum* (Fernandez *et al.*, 1999).

In this case, plant age was critical for embryogenic response, with an optimal time presence of growth regulators was critical. Explants did not show any embryogenic response when they came from plants cultured in the absence of growth regulators. Position of the leaves on the plant was very important, since the first two pairs of leaves did not show any response to the induction of somatic embryogenesis. Also the explants coming from the distal part of the leaf were less responsive.

3.3.2. MORPHOLOGICAL STAGES

Histocytological analysis during the somatic embryogenesis process on leaf explants of *C. arabica* showed that, with the culture method involving a single medium, the entire region surrounding the edge of the plant-derived leaf explants, cultured on gelrite-containing semisolid medium, showed the differentiation of organized structures with little or no callusing after 3 weeks in culture (Fig. 3.1A). These organized outgrowths resembled the globular- and early heart-shaped stages of somatic embryo development (Fig. 3.1B).

Well formed somatic embryos at the cotyledonary stage also were clearly visible between 3 or 4 weeks of culture (Fig. 3.1C). Histological examination revealed somatic embryos forming without connection to mother tissue (Fig. 3.1D). Removal of the somatic embryos and their subsequent culture, either on the same medium or without BAP, resulted in the development of plantlets with a strong root system. Later these plantlets were successfully transplanted to soil. About 80% of the regenerated plants survived in the greenhouse environment and developed in adult plants.

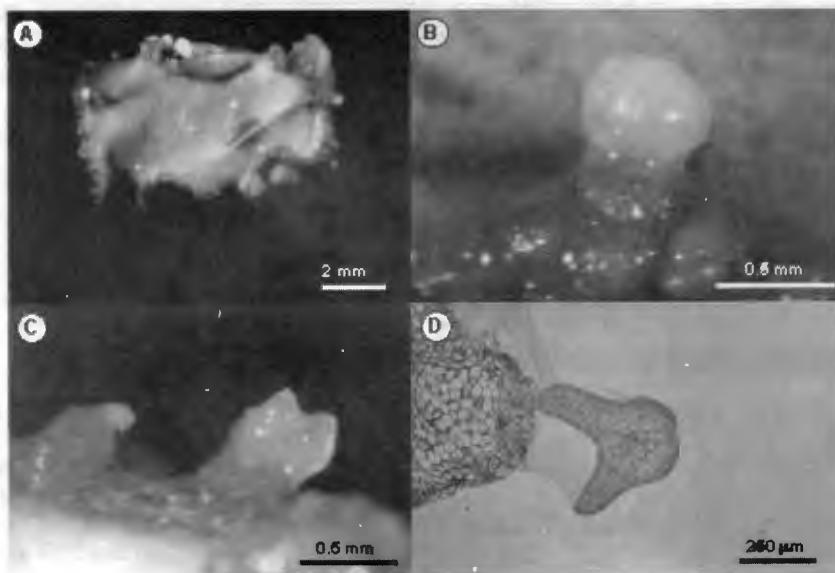


Figure 3.1. Morphological stages of direct somatic embryos and adventitious shoot. A) General view of leaf explant after four weeks of culture. B) Close-up of globular embryo development at the edge of the explant shown in A. C) Somatic embryos at the cotyledonary stage. D) Somatic embryos forming without connection to mother tissue.

3.3.3. ONTOGENESIS OF SOMATIC EMBRYO

Histological examination of the embryogenesis process without callus formation revealed that about one week after the explant was placed in culture, the development of the embryo began with a small, isodiametric, densely cytoplasmic cell, undergoing a series of organized divisions (Fig. 3.2A), identical to those observed during zygotic embryogenesis (Moens, 1964). Meristematic centers leading to globular stage somatic embryos originated from single cells in the mesophyll region. These presumably embryogenic cells showed slight cytoplasmic shrinkage, with no visible plastids and a enlarged spherical nucleus (Fig. 3.2A). After one week, pro-embryos (Fig. 3.2B) were still inside the foliar explants and showed homogeneous small dense cells with large nuclei. Somatic embryos, enclosed in their own boundary and embedded in sub-epidermal parenchymatous cells, were frequently observed, and these had no apparent vascular connections with the mother tissue (Figs. 3.2C - E). Somatic embryos in different developmental stages are shown in figures 3.2F – I. High cell-division activity was observed in the region of the somatic embryos after 3 weeks in culture (Fig. 3.2H).

3.4. DISCUSSION

This study presents a detailed histological and morphological description of the initiation and development of coffee somatic embryos induced on media with BAP. This will provide a basis for further experimentation for studying the effect of changes in the cultivation procedure.

Coffee has been the subject of several histological studies (Menéndez-Yuffá y de Garcia, 1996; Menéndez-Yuffá y de Garcia, 1997; Michaux-Ferrière et al., 1987; Michaux-Ferrière et al., 1989; Nakamura et al., 1992; Nassuth et al., 1980; Söndahl et al., 1979a; Söndahl et al., 1979b; Tahara et al., 1995). These studies have been very valuable, however none of them show a complete histological study of the embryo development: from one single cell to the final stages. Michaux-Ferriere et al. (1989) and Menéndez-Yuffá and de Garcia (1997) provided evidence for the idea that somatic embryos in *Coffea* come from unicellular origins. However, in both papers, the main stages of the ontogenesis were not observed.

The physiological and morphological maturity of tissue, as well 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) with greatest embryogenesis obtained when the mother plants were 2 months old (on culture medium with growth regulators). The explant tissue was composed primarily of parenchymatous cells. The embryogenic regions were formed from the more mitotically active subepidermal cell layers through rapid division and proliferation of cells. Approximately, 90% of the initial divisions observed in our study were periclinal to the leaf surface. Trigiano et al. (1989) reported similar initial periclinal divisions in cultured leaves of *Dactylis glomerata*. No proliferation giving rise to somatic embryos was observed in the more internal mesophyll cells.

Divisions of the daughter cells occurred 6-8 days after the initiation of the cultures. These divisions occurred in random planes. The basal cells of the suspensor was typically surrounded by brown tissue and/or large vacuolated cells (Fig. 3.2B).

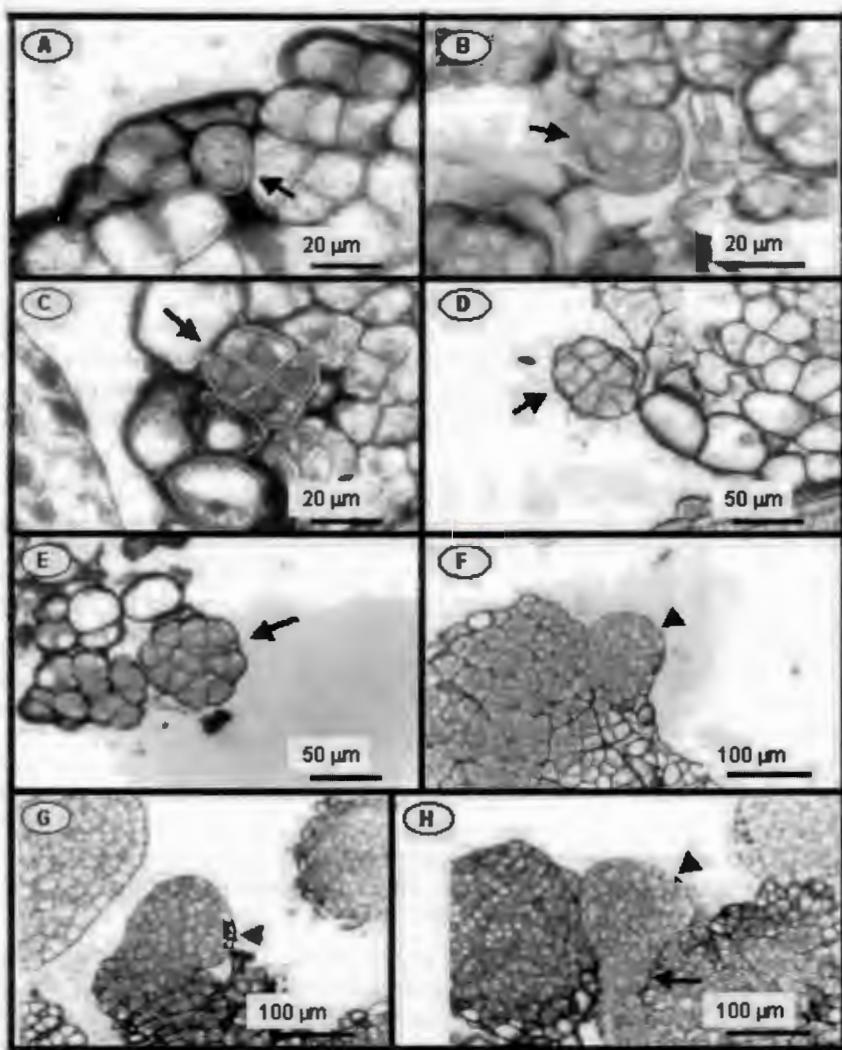


Figure 3.2. Ontogenesis of somatic embryo of *Coffea arabica* obtained by direct embryogenesis.
A) Embryogenic cell. B) Four-celled stage. C) 16-celled stage. D) Transversal cross-section of C. E) Proembryogenic stage containing approximately 32 cells. F) Proembryo with first cellular out-layer that will be the protoderm of the embryo. G) Proembryo in a more developed state. H) Somatic embryo from subjacent epidermal cells. I) globular embryos.

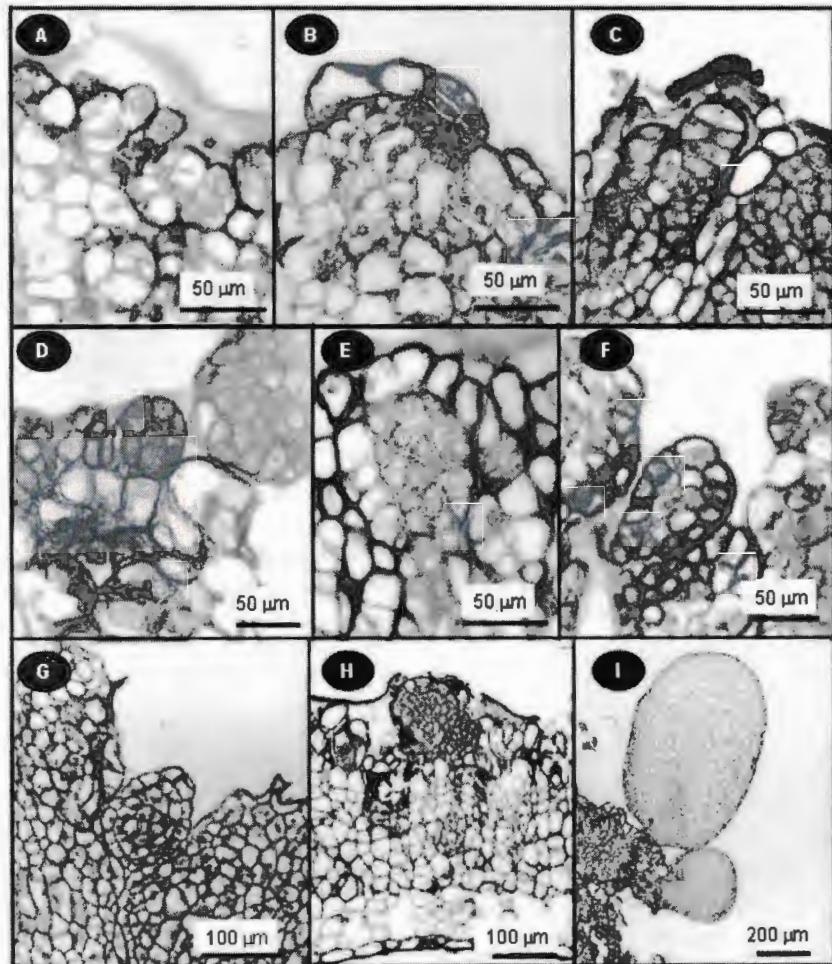


Figure 3.2. Ontogenesis of somatic embryo of *Coffea arabica* obtained by direct embryogenesis. A) Embryogenic cell. B) Four-celled stage. C) 16-celled stage. D) Transversal cross-section of C. E) Proembryogenic stage containing approximately 32 cells. F) Proembryo with first cellular out-layer that will be the protoderm of the embryo. G) Proembryo in a more developed state. H) Somatic embryo from subjacent epidermal cells. I) globular embryos.

Induction with 2,4-D appeared to promote diverse forms of cell proliferation, leading to heterogeneous cell types composed of embryogenic and callus cells (Rodriguez y Wetzstein, 1998). In contrast, cultures induced on BAP had embryogenic regions composed of homogeneous, isodiametric, meristematic cells. Callus proliferation was restricted to cut or wounded areas of the explant. These observations concur with those made in pecan (Rodriguez y Wetzstein, 1998).

By contrast, the use of BAP appeared to promote only the proliferation of one type of cell (Fig. 3.2) from segments of the cell layer of the leaf mesophyll subjacent to the adaxial leaf surfaces (Fig. 3.2H). Few divisions were observed in the epidermis and the bundle sheets and no divisions were seen in vascular tissue.

Formation of embryogenic centers and emergence of the embryos in the presence of 2,4-D was preceded by pronounced accumulation of starch granules. Presumably, starch was rapidly used during the formation of embryogenic regions and was absent from globular- and heart-shaped embryos with exception of suspensor zone cells. This pattern of starch accumulation and use has been reported earlier in other embryogenic systems (Rodriguez y Wetzstein, 1998).

A well-defined procambium was observed from the globular stage (Fig. 3.3A). In *D. carota* the procambium was beginning to be seen at the oblong stage and a well-defined procambium was not observed until the heart-shaped stage (Schiavone y Cooke, 1985).

Our histological observations enable us to assume that direct somatic embryos of coffee, formed on explanted leaf segments have an unicellular origin.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks to Dr. T. Hernández-Sotomayor for the critical reading of the manuscript. M. Méndez-Zeel and M. Monforte-Gonzalez, for technical assistance on tissues culture and F. Barredo-Pool and A. Guzman-Antonio for technical assistance on histological studies. FQF (116916), RRH (117155) and CFC (89534) acknowledge their PhD scholarships from CONACYT. This work was supported by National Council for Science and Technology (CONACYT) grants Nos. 4123P-N and 31816-N.

REFERENCES

- Bieysse D., A. Gofflot y N. Michaux-Ferrière, EFFECT OF EXPERIMENTAL CONDITIONS AND GENOTYPIC VARIABILITY ON SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEA ARABICA, *Can. J. Bot.*, 71: 1496-1502, (1993).
- Bredemeijer G. M. M., H. C. J. Burg, K. Sree Ramulu y P. Dijkhuis, RELEASE OF PEROXIDASES BY CULTURED POTATO CELLS, *Acta Bot. Need.*, 34: 325-335, (1985).
- Castillo B. y M. A. L. Smith, DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM BEGONIA GRACILIS EXPLANTS, *Plant Cell Rep.*, 16: 385-388, (1997).

- Cui D., J. R. Myers, G. B. Collins y P. A. Lazzeri, IN VITRO REGENERATION OF TRIFOLIUM. 1. DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN *T. RUBENS* (L.), *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 15: 33-45, (1988).
- Desamero N. V., B. B. Rhodes, D. R. Decoteau y W. C. Bridges, PICOLINIC ACID-INDUCED DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SWEET POTATO, *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 37: 103-111, (1994).
- Dodeman V. L., G. Ducreux y M. Kreis, ZYGOTIC EMBRYOGENESIS VERSUS SOMATIC EMBRYOGENESIS, *J. Exp. Bot.*, 48: 1493-1509, (1997).
- Faure O., J. Aarrouf y A. Nougarede, ONTOGENESIS, DIFFERENTIATION AND PRECOCIOUS GERMINATION IN ANther-DERIVED SOMATIC EMBRYOS OF GRAPEVINE (*VITIS VINIFERA* L): PROEMBRYOGENESIS, *Ann. Bot.*, 78: 23-28, (1996).
- Fernandez S., N. Michaux-Ferrière y M. Coumans, THE EMBRYOGENIC RESPONSE OF IMMATURE EMBRYO CULTURES OF DURUM WHEAT (*TRITICUM DURUM* DESF.): HISTOLOGY AND IMPROVEMENT BY AGNO₃, *Plant Growth Reg.*, 28: 147-155, (1999).
- Gill R., K. A. Malik, M. H. M. Sanago y P. K. Saxena, SOMATIC EMBRYOGENESIS AND PLANT REGENERATION FROM SEEDLING CULTURES OF TOMATO (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.), *J. Plant Physiol.*, 147: 273-276, (1998).
- Halperin W., IN VITRO EMBRYOGENESIS: SOME HISTORICAL ISSUES AND UNRESOLVED PROBLEMS, en: IN VITRO EMBRIOGENESS IN PLANTS, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 1-16, (1995).
- Hood E. E. y J. M. Jilka, PLANT-BASED PRODUCTION OF XENOGENIC PROTEINS, *Curr. Op. Biotechnol.*, 10: 382-386, (1999).
- Jeanning G. y G. Hahne, DONOR PLANT GROWTH CONDITIONS AND REGENERATION OF FERTILE PLANTS FROM SOMATIC EMBRYOS INDUCED ON IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS OF SUNFLOWER (*HELIANTHUS ANNUUS* L.), *Plant Breed.*, 107: 280-287, (1991).
- Jones T. J. y T. L. Rost, THE DEVELOPMENTAL ANATOMY AND ULTRASTRUCTURE OF SOMATIC EMBRYOS FROM RICE (*ORYZA SATIVA* L.) SCUTELLUM EPITHELIAL CELLS, *Bot. Gaz.*, 150: 41-49, (1989).
- Kawahara R. y A. Komamine, MOLECULAR BASIS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS. en: BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY. VOL. 30. SOMATIC EMBRYOGENESIS AND SYNTHETIC SEED I, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 30-40, (1995).
- Loyola-Vargas V. M., C. Fuentes, M. Monforte-González, M. Méndez-Zeel, R. Rojas y J. Mijangos-Cortés. COFFEE TISSUE CULTURE AS A NEW MODEL FOR THE STUDY OF SOMACLONAL VARIATION, en: 18^e Colloque Scientifique International sur le café, Helsinsky, 302-307, (1999).
- Maheswaran G. y E. G. Williams, PRIMARY AND SECONDARY DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS OF *BRASSICA*

- CAMPESTRIS, *J. Plant Physiol.*, 124: 455-463, (1986a).
- Maheswaran G. y E. G. Williams, SOMATIC EMBRYOIDS AS A TOOL FOR RAPID PROPAGATION OF BRASSICA CAMPESTRIS, *HortScience*, 21: 851, (1986b).
- Majewska-Sawka A. y E. A. Nothnagel, THE MULTIPLE ROLES OF ARABINOGLALACTAN PROTEINS IN PLANT DEVELOPMENT, *Plant Physiol.*, 122: 3-9, (2000).
- Meijer E. G. M. y D. C. W. Brown, 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, (1988).
- Menéndez-Yuffá A. y E. de Garcia, COFFEA SPECIES (COFFEE), en: BIOTECHNOLOGY IN AGRICULTURE AND FORESTRY. VOL. 35. TREES IV, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 95-119, (1996).
- Menéndez-Yuffá A. y E. G. de Garcia, MORPHOGENIC EVENTS DURING INDIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEE "CATIMOR", *Protoplasma*, 199: 208-214, (1997).
- Michaux-Ferrière N., D. Bieysse, D. Alvard y P. Dublin, ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE CHEZ COFFEA ARABICA, INDUISTE PAR CULTURE SUR MILIEUX UNIQUES DE FRAGMENTS FOLIAIRES DE GÉNOTYPES DIFFÉRENTS, *Café Cacao Thé*, 33: 207-217, (1989).
- Michaux-Ferrière N., P. Dublin y J. Schwendiman, ÉTUDE HISTOLOGIQUE DE L'EMBRYOGENÈSE SOMATIQUE À PARTIR D'EXPLANTS FOLIAIRES DE COFFEA ARABICA L., *Café Cacao Thé*, 31: 103-111, (1987).
- Moens P., DÉVELOPPEMENT DE L'OVULE ET EMBRYOGENÈSE CHEZ COFFEA CANEPHORA PIERRE, *La Cellule*, 129-147, (1964).
- Murashige T. y F. Skoog, A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, (1962).
- Nakamura T., T. Taniguchi y E. Maeda, STUDIES ON SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEE BY SCANNING ELECTRON MICROSCOPE, *Jpn. J. Crop. Sci.*, 61: 476-486, (1992).
- Nassuth A., T. M. Wormer, F. Bouman y G. Staritsky, THE HISTOGENESIS OF CALLUS IN COFFEA CANEPHORA STEM EXPLANTS AND THE DISCOVERY OF EARLY EMBRYOID INITIATION, *Acta Bot. Need.*, 29: 49-54, (1980).
- Pretova A. y B. Dedikova, SOMATIC EMBRYOGENESIS IN SOLANUM TUBEROSUM L. CV. DÉSIRÉE FROM UNRIPE ZYGOTIC EMBRYOS, *J. Plant Physiol.*, 139: 539-542, (1992).
- Pretova A. y E. G. Williams, DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM IMMATURE ZYGOTIC EMBRYOS OF FLAX (LINUM USITATISSIMUM L.), *J. Plant Physiol.*, 126: 155-161, (1986).

CAPÍTULO 4

Modification of the Embryogenic Response of *Coffea arabica* by the Nitrogen Source

Fuentes-Cerda C. F. J., M. Monforte-González, M. Méndez-Zeil, R. Rojas-Herrera, V. M. Loyola-Vargas. (2001) Biotechnology Letters. 23 (16): 1341-1343.

ABSTRACT

Somatic embryogenesis was induced in coffee from *in vitro* cultured plants as starting material, and the faster response obtained allowed the generation of lines from selected plants more quickly. In contrast to other systems, where embryos take 2 or 3 months to develop, globular embryos were obtained after 3 weeks. The optimum nitrogen concentrations for embryogenesis were between 3.75 and 15 mM nitrogen with a nitrate/ammonium molar ratio of 2:1 or 1:2.

4.1. INTRODUCTION

Nitrate and NH_4^+ are especially important for plant differentiation (Halperin y Wetherell, 1965; Reinert *et al.*, 1967), and for promoting embryo development (Joy *et al.*, 1996). The total nitrogen content, the nitrate/ammonium ratio and the inorganic/organic ratio, as well as the nature of the nitrogen source have a great effect on the response of explants to somatic embryogenesis induction (Grimes y Hodges, 1990; Mordhorst y Lörz, 1993; Wetherell y Dougall, 1976).

Cultures maintained on NO_3^- as the sole nitrogen source did not form embryos when placed under inductive conditions (Joy *et al.*, 1996). A reduced nitrogen source is always required, at least as a supplement of nitrate, for rapid growth and *in vitro* embryogenesis of cultured wild carrot tissue (Wetherell y Dougall, 1976). In alfalfa there is an absolute requirement for the ammonium ion during embryo induction and differentiation (Meijer y Brown, 1987).

Growth, embryogenesis, the morphology of the regenerated plants and plant regeneration from *in vitro* cultured tissues can be manipulated independently through the nitrogen supply (Grimes y Hodges, 1990; Mordhorst y Lörz, 1993). To increase the yield of these processes, manipulation of the nitrogen source, or the addition of conditioned medium into the culture medium can be used as a biotechnological tool (Chung *et al.*, 1992).

However, the exact role and the mechanism by which the nitrogen source influences the differentiation process is still unknown. For instance, nothing is known of this process in tropical plants, such as coffee, which has its own characteristic somatic embryogenesis process. The aim of this research was to study the effect of the nitrogen source on coffee somatic embryogenesis.

4.2. MATERIALS AND METHODS

4.2.1. PLANT MATERIAL

Seeds of *Coffea arabica* cultivar Caturra Rojo were collected in Chiapas, Mexico. Seeds were washed and soaked for 24-48 h in sterile distilled water, disinfected with 6% NaClO₃ for 20 min and finally rinsed with sterile water. The MS (Murashige and Skoog (1962) medium was used for zygotic embryo germination, and was augmented with thiamine (29.6 µM), myo-inositol (0.555 µM), biotin (0.41 µM), L-cysteine (0.15 µM), glucose (166.48 mM), naphthalene acetic acid (NAA, 0.53 µM), kinetin (Kin, 2.32 µM) and Gelrite (0.25%) and the pH was adjusted to 5.7 before autoclaving (20 min, 110°C). Ten embryos were placed in each Magenta plastic box and cultured at 25°C with a photoperiod of 16 h/8 h.

4.2.2. PLANTLET CULTURE

Plantlets were grown in Magenta boxes, containing 40 ml supplemented MS medium at 25°C with a photoperiod of 16 h/8 h and were transferred to fresh medium every 90 days.

4.2.3. SOMATIC EMBRYOGENESIS INDUCTION

Leaf fragments (0.25 cm²) were cultured in the medium previously described by Yasuda *et al.*, (Yasuda *et al.*, 1985), with Gelrite (0.25%). Culture conditions were a photoperiod of 16 h/8 h and at 25°C.

4.3. RESULTS AND DISCUSSION

Within the first two weeks after leaf explants were put in the Yasuda culture medium scarring was observed at the wounded edges. Between the third and fourth week, globular somatic embryos were observed on the edges of explants.

Nitrogen concentration played a crucial role in embryo induction as elevated levels of nitrate and ammonium decreased culture embryogenecity. As the total nitrogen in the medium increased, the response to somatic embryogenesis decreased (Figure 4.1). Nitrogen concentrations of 60 and 30 mM had a strong inhibitory effect, while concentrations between 4 and 15 mM gave a response higher than 70% and reached values near to 90%.

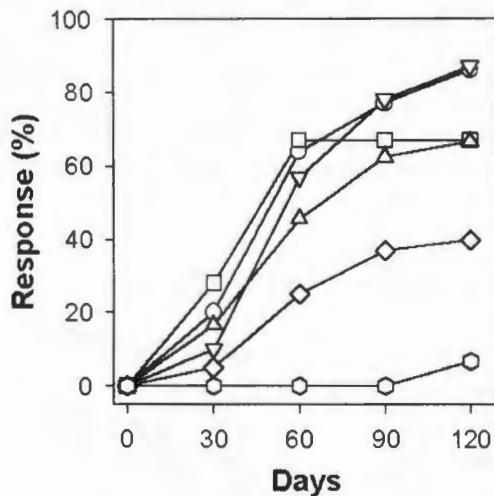


Figure 4.1. Effect of the total nitrogen source on direct somatic embryogenesis induction in *C. arabica*, 120 days after induction. (○) 3.75 mM, (□) 7.5 mM, (△) 9 mM, (▽) 15 mM, (◇) 30 mM and (○) 60 mM. The nitrate/ammonium molar ratio was kept constant at 2:1. In all experiments, 20 explants per treatment were used and each experiment was repeated three times.

When counted 120 days after the start of the experiment, the number of embryos per explant and the total embryos per experiment varied as a function of total nitrogen content. The presence of nitrogen was indispensable for an embryogenic response. When the total nitrogen source increased, the number of embryos per explant and the total embryos per experiment decreased. The response was almost zero when 60 mM of nitrogen was used (Table 4.1).

Table 4.1. Effect of nitrogen source on direct somatic embryogenesis induction, total embryos per explant and total embryos per experiment in *C. arabica*, 120 days after induction. In all experiments, 20 explants per treatment were used and each experiment was repeated three times. An ANOVA was performed and the media is shown. The standard deviation is shown in parenthesis. Similar letters correspond to media with no statistical significance.

Nitrogen Concentration	Response (%)	Total Embryos	Embryos/Explant
0.00	1.67 (2.89) d	2 (2.00) c	0.18 (0.08) c
3.75	86.00 (7.37) a	129 (20.07) a	9.20 (4.70) a
7.50	65.00 (2.64) b	54 (4.58) b	3.60 (1.65) b
9.00	66.67 (4.16) b	85 (5.00) b	3.54 (0.84) b
15.00	61.50 (2.00) a	88 (15.13) b	5.27 (0.66) b
30.00	40.00 (4.00) c	69 (16.52) b	4.60 (1.25) b
60.00	6.70 (1.53) d	1 (1.00) c	0.06 (0.04) c

Since the molar ratio of oxidized nitrogen to reduced nitrogen can modify differentiation status of the tissues, several nitrate/ammonium molar ratios were tested at 15 mM of total nitrogen. The use of either nitrate or ammonium as nitrogen source at a nitrate/ammonium molar ratio of 1:0, produced a response around 50% (Fig. 4.2). However, the response was at a maximum when the nitrate/ammonium molar ratio was 2:1 or 1:2. The maximum response with the 2:1 molar ratio was reached 60 days from the start of the experiment, whereas for the 1:2 molar ratio the same maximum values were reached 60 days later.

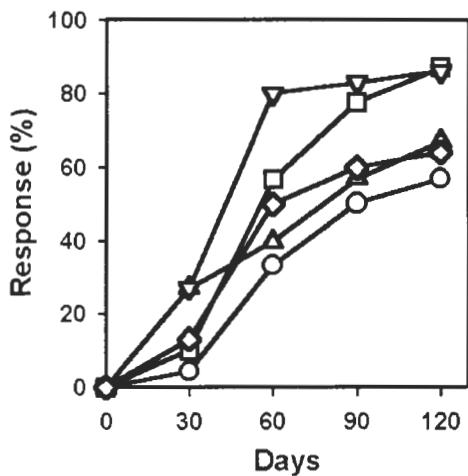


Figure 4.2. Effect of different nitrate/ammonium molar ratios on direct somatic embryogenesis induction in *C. arabica*, 120 days after induction. (□) 10:5, (▽) 5:10, (△) 7.5:7.5, (◇) 0:15, and (○) 15:0. The total nitrogen source was constant at 15 mM. In all experiments, 20 explants per treatment were used and each experiment was repeated three times.

The number of embryos per explant and total embryos per experiment also changed as a function of the nitrate/ammonium molar ratio when counted 120 days after the beginning of the experiment. When the ammonium was absent from the medium, only 4 embryos per explant and a maximum of 66 embryos per experiment were obtained. With only ammonium as the nitrogen source, 8 embryos per explant and around 120 total embryos per experiment were obtained, whereas only 65% of the explant formed embryos (Table 4.2). In coffee, as in carrot (Wetherell y Dougall, 1976) and alfalfa (Meijer y Brown, 1987) there was an absolute requirement for ammonium in the culture medium for an optimal response to somatic embryogenesis.

Table 4. 2. Effect of different nitrate/ammonium molar ratio on direct somatic embryogenesis induction, total embryos per explant and total embryos per experiment in *C. arabica*, 120 days after induction. In all experiments, 20 explants per treatment were used and each experiment was repeated three times. An ANOVA was performed and the media is shown. The standard deviation is shown in parenthesis. Similar letters correspond to media with no statistical significance.

Nitrogen molar Concentration (NO ₃ : NH ₄)	Response (%)	Total Embryos	Embryos/Explant
15 : 00	57 (4.58) b	67 (6.08) c	4.47 (0.55) b
10 : 5	87 (3.00) a	118 (7.21) a	7.90 (2.27) a
7.5 : 7.5	67 (2.64) b	72 (5.29) c	5.14 (1.00) b
5 : 10	86 (7.54) a	100 (2.00) b	6.67 (0.58) a
00 : 15	64 (5.00) b	119 (10.54) a	8.5 (0.50) a

Until now there has been no difference in the development of plants coming from somatic embryos produced with different amounts of nitrogen and different nitrate/ammonium ratios (data not shown). This contrasts with rice, in which the morphology of the regenerated plants was strongly influenced by the nitrogen ratio (Grimes y Hodges, 1990).

To summarize, we modified the protocol described by Yasuda *et al.* (Yasuda *et al.*, 1985) to create a model that allowed us the use of *in vitro* cultured plants as starting material and the faster response obtained allowed the generation of lines from selected plants more quickly. This model will also allow experiments in coffee that previously were difficult to carry out because of the long somatic embryogenesis protocols.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks to Dr. T. Hernández-Sotomayor for the critical reading of the manuscript. CFC (89534) and RRH (117155) acknowledge CONACYT for their PhD scholarships. This work was supported by National Council for Science and Technology (CONACYT) grants Nos. 4123P-N and 31816-N, as well as by Consejo Mexicano del Café.

REFERENCES

- Chung W. J., Henrik P., Chin C.K., ENHANCED SOMATIC EMBRYO PRODUCTION BY CONDITIONED MEDIA IN CELL SUSPENSION CULTURES OF *DAUCUS CAROTA*. Biotechnol. Lett. 14: 837-840, (1992).
- Grimes H. D., Hodges T. K., THE INORGANIC NO₃:NH₄⁺ RATIO INFLUENCES PLANT REGENERATION AND AUXIN SENSITIVITY IN PRIMARY CALLUS DERIVED FROM IMMATURE EMBRYOS OF INDICA RICE (*ORYZA SATIVA L.*). *J. Plant Physiol.* 136: 362-367, (1990).

- Halperin W., Wetherell D. F., AMMONIUM REQUIREMENT FOR EMBRYOGENES
IN VITRO. *Nature* 205: 519-520, (1965).
- Joy R. W., McIntyre D. D., Vogel H. J., Thorpe T. A., STAGE-SPECIFIC NITROG
METABOLISM IN DEVELOPING CARROT SOMATIC EMBRYOS. *Phys
Plant.* 97: 149-159, (1996).
- Meijer E. G. M., Brown D. C. W., ROLE OF EXOGENOUS REDUCED NITROGEN AND
SUCROSE IN RAPID HIGH FREQUENCY SOMATIC EMBRYOGENESIS
MEDICAGO SATIVA. *Plant Cell Tissue Org. Culture* 10: 11-19, (1987).
- Mordhorst A. P., Lörz H., EMBRYOGENESIS AND DEVELOPMENT OF ISOLATEL
BARLEY (*HORDEUM VULGARE* L.) MICROSPORES ARE INFLUENCED BY
THE AMOUNT AND COMPOSITION OF NITROGEN SOURCES IN CULTURE
MEDIA. *J. Plant Physiol.* 142: 485-492, (1993).
- Murashige T., Skoog F., A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND
BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES. *Physiol. Plant.* 15: 473-
497, (1962).
- Reinert J., Tazawa M., Semenoff S., NITROGEN COMPOUNDS AS FACTORS OF
THE EMBRYOGENESIS *IN VITRO*. *Nature* 216: 1215-1216, (1967).
- Wetherell D. F., Dougall D. K., SOURCES OF NITROGEN SUPPORTING GROWTH
AND EMBRYOGENESIS IN CULTURED WILD CARROT TISSUE. *Physiol.
Plant.* 37: 97-103, (1976).
- Yasuda T., Fujii Y., Yamaguchi T., EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION FROM
COFFEA ARABICA LEAF EXPLANTS BY BENZYLADENINE. *Plant Cell Physiol.*
26: 595-597, (1985).

- Rodriguez A. P. y H. Y. Wetzstein, A MORPHOLOGICAL AND HISTOLOGICAL COMPARISON OF THE INITIATION AND DEVELOPMENT OF PECAN (CARYA ILLINOINENSIS) SOMATIC EMBRYOGENIC CULTURES INDUCED WITH NAPHTHALENEACETIC ACID OR 2,4-DICHLOROPHENOXYACETIC ACID, *Protoplasma*, 204: 71-83, (1998).
- Schiavone F. M. y T. J. Cooke, A GEOMETRIC ANALYSIS OF SOMATIC EMBRYO FORMATION IN CARROT CELL CULTURE, *Can. J. Bot.*, 63: 1573-1578, (1985).
- Schuller A., G. Reuter y T. Geier, SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM SEEDS EXPLANTS OF ABIES ALBA, *Plant Cell Tissue Org. Culture*, 17: 53-58, (1989).
- Söndahl M. R., J. L. Salisbury y W. R. Sharp, SEM CHARACTERIZATION OF EMBRYOGENIC TISSUE AND GLOBULAR EMBRYOS DURING HIGH FREQUENCY SOMATIC EMBRYOGENESIS IN COFFEE CALLUS CELLS, *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 185-188, (1979a).
- Söndahl M. R. y W. R. Sharp, HIGH FREQUENCY INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN CULTURED LEAF EXPLANTS OF COFFEA ARABICA L., *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408, (1977).
- Söndahl M. R., D. Spahlinger y W. R. Sharp, 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, (1979b).
- Staritsky G., EMBRYOID FORMATION IN CALLUS TISSUES OF COFFEE, *Acta Bot. Need.*, 19: 509-514, (1970).
- Tahara M., T. Nakanishi, T. Yasuda y T. Yamaguchi. HISTOLOGICAL AND BIOLOGICAL ASPECTS IN SOMATIC EMBRYOGENESIS OF COFFEA ARABICA, en: *16º Colloque Scientifique International sur le café*, Kyoto, 860-867, (1995).
- Taylor M. G. y I. K. Vasil, THE ULTRASTRUCTURE OF SOMATIC EMBRYO DEVELOPMENT IN PEARL MILLET (PENNISETUM GLAUCUM; POACEAE), *Am. J. Bot.*, 83: 28-44, (1996).
- Trigiano R. N., D. J. Gray, B. V. Conger y J. K. McDaniel, ORIGIN OF DIRECT SOMATIC EMBRYOS FROM CULTURED LEAF SEGMENTS OF DACTYLIS GLOMERATA, *Bot. Gaz.*, 150: 72-77, (1989).
- Yasuda T., Y. Fujii y T. Yamaguchi, EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION FROM COFFEA ARABICA LEAF EXPLANTS BY BENZYLADENINE, *Plant Cell Physiol.*, 26: 595-597, (1985).
- Yeung E. C., ESTRUCTURAL AND DEVELOPMENT PATTERNS IN SOMATIC EMBRYOGENESIS, en: *IN VITRO EMBRIOGENESIS IN PLANTS*, (Thorpe T. A., ed.), Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 205-247, (1995).
- Zimmerman J. L., SOMATIC EMBRYOGENESIS: A MODEL FOR EARLY DEVELOPMENT IN HIGHER PLANTS, *The Plant Cell*, 5: 1411-1423, (1993).

CAPÍTULO 5

Conclusiones Generales y Perspectivas

En esta tesis se presentan resultados importantes sobre la inducción y desarrollo de embriones somáticos de manera directa para *Coffea arabica* L. Los explantes de hojas son el tejido más utilizado en este género, y los materiales más jóvenes en general son los más responsivos; es por ello que se decidió establecer líneas axénicas de plántulas cultivadas *in vitro* provenientes tanto de embriones cigóticos, como de embriones somáticos. De manera simultánea, se establecieron ensayos para inducir la embriogénesis somática por los métodos de Söndahl y Sharp (1977), Dublin (1991) y Yasuda *et al.* (1985), tal como señalan los protocolos correspondientes, en los dos casos se apreció la formación de callos, los cuales fueron transferidos a medio fresco con una nueva combinación de reguladores del crecimiento (auxina y citocinina), en ambos casos este proceso requirió de varios meses, sin embargo, en el tercer protocolo, al cabo de un par de semanas se observaron embriones somáticos en estadio globular en los bordes de los explantes, después de la cicatrización de las heridas en los bordes del tejido. Lo anterior fue importante, por dos razones, la primera fue que en el protocolo original se describe la formación de callos antes de la aparición de los embriones somáticos, por lo que se trata de embriogénesis somática indirecta en tanto que en nuestro experimento no se observó la proliferación de callos, por lo que se reconoció como embriogénesis somática directa con una respuesta en muy poco tiempo. La segunda fue que el único reporte disponible de embriogénesis somática directa para este género corresponde a Dublin (1981), pero en el híbrido Arabusta (*C. arabica* x *C. canephora*).

A continuación se procedió a caracterizar el proceso de embriogénesis somática directa en *C. arabica*, se puede señalar que los resultados sobre capacidad embriogénica de explantes foliares, mostrados en este trabajo coinciden con la mayoría de los reportes que utilizan hojas; sin embargo, es muy importante mencionar que un aspecto central a nuestro trabajo fue la posibilidad de inducir embriones en forma directa, es decir sin pasar por la etapa de callo. Nosotros consideramos que el sinergismo entre la juventud del explante y el uso exclusivo de citocinina en el medio de cultivo, como regulador del crecimiento, fue lo que permitió inducir la embriogénesis somática en forma directa y en corto tiempo, en tanto que con otros protocolos, utilizando explantes provenientes de plantas adultas se obtiene embriogénesis a partir de callos, después de varios meses de la inducción. Esto coincide con lo señalado por Merle *et al.* (1995), sobre la importancia de la edad del explante para la inducción de la embriogénesis somática directa (Parrot *et al.*, 1991), los gradientes en la capacidad embriogénica observada en el tejido de diferentes explantes, y la aparición de anomalías en embriones obtenidos en células viejas de soya (Hartweek *et al.*, 1988), lino (Pretova y Williams, 1986) y tomate (Young *et al.*, 1987).

El análisis histológico mostró evidentemente la ontogénesis de los embriones somáticos, los cuales se forman como estructuras bipolares directamente de explantes de hojas.

El medio de cultivo más utilizado para inducir la embriogénesis somática en *C. arabica* es el Murashige y Skoog (1962) o modificaciones de éste como es el caso de Yasuda *et al.*, (1985). Algunos autores emplean el medio de Linsmaier y Skoog (1965) para inducir la embriogénesis en el caso de *C. canephora* otros grupos de investigación han empleado el medio de Gamborg *et al.* (1968), o la reducción a la mitad de la fuerza iónica del medio MS. Sin embargo prácticamente nada se ha hecho con relación a la modificación de los componentes individuales de los medios de cultivo, con el fin de aumentar la respuesta embriogénica de los explantes.

En los experimentos de variación de la fuente nitrogenada se determinó que la mejor respuesta de los tejidos se dio en concentraciones bajas de nitrógeno (8-16 mM). En tanto que concentraciones iguales o mayores a 30 mM inhibieron fuertemente el proceso. También se observó que para la inducción de la embriogénesis somática indirecta se precisa, al menos en la primera etapa, concentraciones de nitrógeno total en el medio de cultivo de alrededor de 60 mM.

Otro factor crítico con relación a la fuente de nitrógeno es la relación nitrato/amonio. Es evidente de los resultados mostrados en este trabajo que se precisa tanto de nitrógeno reducido como oxidado en el medio de cultivo para que se lleve a cabo la inducción de la embriogénesis somática, la ausencia de cualquiera de ellos evita que se tenga respuesta.

La inducción de embriogénesis somática indirecta en el género *Coffea* se ha obtenido con el uso de auxinas como 2,4-D, ANA e IBA y de citocininas como 2-iP, BAP y Kin. Para obtener la embriogénesis somática directa se empleó exclusivamente la citocinina BAP (5 µM).

El aislamiento y establecimiento de las plántulas se obtuvo de manera sencilla con la transferencia a medio fresco, con o sin reguladores del crecimiento, obteniéndose hasta 90% de conversión a plantas regeneradas, las cuales fueron transferidas al invernadero para su adaptación para finalmente transferirlas a terreno definitivo.

A pesar de la gran información generada a partir de los años 60's, sobre los requerimientos para la manipulación de la embriogénesis somática *in vitro*, aún no se han establecido las bases estructurales y patrones de desarrollo, así como los estudios bioquímicos, fisiológicos y moleculares que conlleven al conocimiento de cómo una célula es capaz de diferenciarse en un embrión.

Si bien se ha alcanzado un éxito notable en la embriogénesis somática de los géneros: *Citrus*, *Elaeis*, *Larix*, *Phoenix*, *Picea*, *Pinus*, *Theobroma* y *Vitis*, aún permanece inexplorada la posibilidad de utilizar los embriones somáticos del cafeto como un recurso para preservar material genético de alto valor, ya sea a través de medios de cultivo mínimos o por criopreservación.

El cafeto, al igual que otras especies leñosas, requiere de diferentes estrategias para su mejoramiento genético. La ingeniería genética puede traer al cafeto grandes beneficios, tales como resistencia a diferentes enfermedades, bajo contenido de cafeína y una maduración uniforme y controlada de los frutos, entre otras. Para alcanzar esta posibilidad se deberá tener un sistema eficiente de transformación y regeneración a planta de los tejidos transformados. La embriogénesis somática puede hacerlo.

El potencial del modelo desarrollado incluye, no sólo un procedimiento de propagación clonal a través de la embriogénesis somática directa, sino también la posibilidad de caracterizar el proceso en sí mismo, particularmente en la fase de inducción, así como la generación de variantes que pueden ser utilizados en programas de mejoramiento genético tradicional o biotecnológico.

Un hecho importante es el de que se requiere establecer con claridad la fidelidad clonal de las plantas regeneradas y su comportamiento *ex vitro*, fundamentalmente en sus componentes agronómicos y agroecológicos. En este rubro, datos obtenidos por Sánchez-Téyer (comunicación personal) muestran que no hay variación entre las plantas obtenidas por embriogénesis somática y por semilla.

El modelo anteriormente descrito, generado a través de una metodología altamente reproducible, y haciendo a un lado su limitación más evidente en comparación a un sistema de embriogénesis somática indirecta que es el número de embriones obtenidos por gramo de tejido inoculado, tiene un alto potencial de aplicación en campos como el estudio de la estructura y fisiología celular durante el proceso de diferenciación tisular, pues estos cambios son apreciables en un breve lapso.

En el campo de la nutrición, llaman la atención los resultados obtenidos en relación a la fuente nriogenada del medio. Podrán usarse como parámetro para establecer comparaciones sobre el efecto de otros componentes en el medio de cultivo.

Para el estudio del metabolismo primario, en particular el nitrogenado, el modelo podría resultar útil después de establecer metodologías que permitieran las determinaciones enzimáticas con cantidades pequeñas de tejido, pues los explantes son pequeños y se requerirían en gran número para proporcionar el tejido necesario para los extractos.

El uso de este modelo para la propagación clonal de materiales sobresalientes representa una opción entre los métodos tradicionales y la embriogénesis somática indirecta, pues el número de individuos regenerados es bajo, pero el uso exclusivo de una citocinina en el proceso permite suponer que la variación somaclonal no ocurre en gran medida.

Otro campo de aplicación es el almacenamiento y conservación de germoplasma, pues la capacidad de regenerar individuos completos con una alta fidelidad genética, acompañada de una estrategia adicional como compuestos que reduzcan el desarrollo *in vitro* (ácido abscísico, hidrácido maleico, etc.), medios mínimos, bajas temperaturas y criopreservación.

Finalmente, el uso de este modelo para la transformación genética a través de *Agrobacterium* o bombardeo de partículas, es una alternativa real que ha empezado a llamar la atención de los biólogos moleculares.

REFERENCIAS

Dublin P., EMBRYOGENESE SOMATIQUE DIRECTE SUR FRAGMENTS DE FEUILLES DE CAFEIER ARABUSTA, *Café Cacao Thé*, XXV (4):237-242, 1981.

- Dublin P., MULTIPLICACIÓN VEGETATIVA DE CAFÉ, HEVEA Y CACAO, en: CULTIVO DE TEJIDOS EN LA AGRICULTURA. FUNDAMENTOS Y APLICACIONES, (Roca W. M. y L. A. Mroginski, eds.), Centro Internacional de Agricultura Tropica, Colombia, 577-619, (1991).
- Gamborg O. L., Miller R. A. y K. Ojima, NUTRIENT REQUIREMENTS OF SUSPENSION CULTURES OF SOYBEAN ROOT CELLS, *Exp. Cell Res.*, 50: 151-158, (1968).
- Hartweeck L. M., P. A. Lazzeri, D. Cui, G. B. Collins y E. G. Williams, AUXIN-ORIENTATION EFFECTS ON SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM INMATURE SOYBEAN COTYLEDONS, *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 24: 821-824, (1988).
- Linsmaier E. M. y F. Skoog, ORGANIC GROWTH FACTOR REQUIREMENTS OF TOBACCO TISSUE CULTURES, *Physiol. Plant.*, 18: 100-127, (1965).
- Merkle S. A., W. A. Parrot, and B. S. Flinn. MORPHOGENIC ASPECTS OF SOMATIC EMBRYOGENESIS, en: IN VITRO EMBRYOGENESIS IN PLANTS, (T. A. Thorpe, eds.), Netherlands:Kluwer Academic Publishers, 155-203, (1995).
- Murashige T. and F. Skoog, A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, (1962).
- Parrot W. A., S. A. Merkle, and E. G. Williams, SOMATIC EMBRYOGENESIS: POTENTIAL FOR USE IN PROPAGATION AND GENE TRANSFER SYSTEMS, en: ADVANCED METHODS IN PLANT BREEDING AND BIOTECHNOLOGY, (D. R. Murray, ed.), CAB International, Wallingford, 158-163, (1991).
- Pretova A. y E. G. Williams, DIRECT SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM INMATURE EMBRYOS OF FLAX (*LINUM USITATISSIMUM*), *J. Plant Physiol.*, 126: 155-157, (1986).
- Söndahl M. R. y W. R. Sharp, HIGH FREQUENCY INDUCTION OF SOMATIC EMBRYOS IN CULTURED LEAF EXPLANTS OF COFFEA ARABICA L., *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 395-408, (1977).
- Yasuda T., Y. Fuji and T. Yamaguchi, EMBRYOGENIC CALLUS INDUCTION FROM COFFEA ARABICA LEAF EXPLANTS BY BENZYLADENINE. *Plant Cell Physiol.*, 26: 595-597, (1985).
- Young R., V. Kaul y E. G. Williams, CLONAL PROPAGATION IN VITRO FROM INMATURE EMBRYOS AND FLOWER BUDS OF *LYCOPERSICON PERUVIANUM* AND *L. ESCULENTUM*, *Plant Sci.*, 52: 237-241, (1987).