



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Ontogenia de la embriogénesis somática de café
(*Coffea canephora* L. Var. Robusta) inducida con
dos reguladores de crecimiento”**

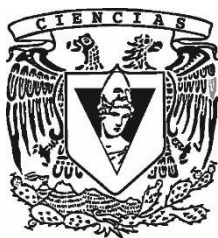
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

NAYELI GARCÍA LOZANO



DIRECTOR DE TESIS:

**ING. TERESA DE JESÚS OLIVERA FLORES
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

García
Lozano
Nayeli
55391698
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
306047084

2. Datos del tutor

Ing.
Teresa de Jesús
Olivera
Flores

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Josefina
Herrera
Santoyo

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Citlali Yuriria
Núñez
Mariel

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Estela
Sandoval
Zapotitla

6. Datos del sinodal 4

Dra.
Guillermina
Murguía
Sánchez

7. Datos del trabajo escrito

“Ontogenia de a embriogénesis somática de café (*Coffea canephora* L. Var. Robusta)
inducida con dos reguladores de crecimiento”
84 p.
2015.

El presente trabajo se derivó de un proyecto previo realizado para la empresa Derivados Industrializados del Café, S.A. de C.V. (DICAFFE), por lo cual la información sobre el protocolo para la micropropagación por embriogénesis somática no se explica ampliamente ya que tiene un convenio de confidencialidad.



***“El café ayuda a quien duerme
poco y sueña mucho”***

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por formarme como profesionista y brindarme todas las herramientas y el apoyo para ejercer esta maravillosa carrera y así poder sentirme orgullosa de haber cursado mis estudios de licenciatura en la mejor universidad del país.

A la Ing. María Teresa de Jesús Olivera Flores, que más que una tutora de tesis fue un apoyo incondicional en esta etapa de mi vida. Ella me enseñó el valor de la vida, el amor por tu profesión y que lo que en verdad importa es tu calidad como ser humano.

A la empresa Derivados Industrializados del Café, S.A. de C.V (DICAPE) que me permitió realizar este estudio y por brindarme una beca para poder llevar a cabo el trabajo de investigación.

Al Laboratorio 116 de Cultivo de Tejidos Vegetales del Dpto. de Bioquímica en la Facultad de Química, en donde se llevó a cabo parte de este proyecto, por permitirme el uso de sus instalaciones y equipo y por las becas otorgadas para la realización de éste y otros proyectos de investigación.

A la Dra. Estela Sandoval Zapotitla y al Laboratorio de Anatomía Vegetal del Jardín Botánico en el Instituto de Biología, por permitirme realizar el estudio histológico en sus instalaciones y con ayuda de su equipo.

A las integrantes del jurado: Dra. Josefina Herrera Santoyo, Dra. Estela Sandoval Zapotitla, Dra. Citlali Yuriria Núñez Mariel y Dra. Guillermina Murguía Sánchez por darme sus valiosos comentarios y correcciones que enriquecieron este trabajo.

Al M. en C. Octavio González Caballero y al Biol. Alfonso Fuentes Molina, con los que lleve a cabo la etapa de cultivo *in vitro* de este trabajo y que me ayudaron a entender y definir aspectos cruciales de este proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A mis padres Margarita Lozano Torres y Jesús Guillermo García por ser mi motor, que con todo su esfuerzo, amor y dedicación me ayudaron a terminar mi carrera universitaria. Ellos me han enseñado a ser fuerte y a vencer todas las metas que te pone la vida, y que mientras la familia esté unida todo es posible.

A mis tíos Lupita, Pepe, Alicia y Enrique por ser mis segundos padres, por apoyarme incondicionalmente, por aconsejarme y ayudarme a llegar hasta aquí.

A mi hermano Guillermo García Lozano que siempre tuvo para mí un “échale ganas hermanita”, que siempre me cuidó y procuró y sobretodo me enseñó a no rendirme.

A Selina, Amira y Maribel que a pesar de no ser hermanas de sangre si lo son de corazón y que me han acompañado en los mejores y peores momentos de mi vida, que hemos compartido risas, llanto y un sinfín de anécdotas, sé que nuestra amistad perdurará por siempre. A Jonathan que ha sido un amigo incondicional y que siempre me alegra con todas sus ocurrencias. A mi gran amigo Víctor Mendoza por su amistad que ha sido verdadera y única durante muchos años. A Lalo que me enseñó que las grandes amistades también pueden nacer en poco tiempo.

A Mariana y Ana que fueron mis grandes amigas durante toda la carrera y que ahora emprendemos una nueva aventura que nos ha llenado de satisfacciones y logros profesionales y personales. A Miguel que siempre me ha apoyado en todo y me ha enseñado que hay que trabajar muy duro para lograr tus objetivos.

A Diego por darme ese “empujoncito” que necesitaba para finalizar esta etapa, por enseñarme que a pesar de tener todo en contra puedes llegar a ser grande y triunfar, por estar conmigo y hacerme parte de su vida y logros.

A todos mis amigos de la carrera y del laboratorio 116 de CTV: Verónica, Luis, Mary, Gary, Claudia, Fredy, Toño, Alejandra, Laura, Elizabeth, Cristina, Nayeli, Diana, Josúe, Ara, Jorge y Silvia, con los que viví momentos que llevaré en mi mente por siempre.

ÍNDICE GENERAL

1. Índice de figuras	3
2. Abreviaturas	6
3. Resumen	7
4. Introducción	8
5. Antecedentes	9
5.1. Aspectos generales de <i>Coffea canephora</i>	9
5.1.1. Clasificación taxonómica	9
5.1.2. Centro de origen y distribución geográfica	9
5.1.3. Descripción botánica	10
5.2. Importancia económica del género <i>Coffea</i>	13
5.3. Cultivo de tejidos vegetales	14
5.3.1. Embriogénesis somática	18
5.3.2. Embriogénesis somática en el género <i>Coffea</i>	20
5.4. Histología vegetal	21
5.4.1. Estudios histológicos en el género <i>Coffea</i>	24
6. Justificación	25
7. Objetivos.....	26
7.1. General.....	26
7.2. Particulares.....	26
8. Materiales y métodos.....	27
8.1. Diagrama general del método	28
8.2. Etapa 1: Cultivo de tejidos vegetales.....	29
8.2.1. Material biológico y selección del explante	29
8.2.2. Desinfección del explante	30
8.2.3. Medios de cultivo y condiciones de incubación	30

8.3. Etapa 2: Histología vegetal	31
8.3.1. Material biológico.....	31
8.3.2. Fijación y lavado.....	32
8.3.3. Deshidratación	33
8.3.4. Infiltración e inclusión	34
8.3.5. Corte.....	35
8.3.6. Desparafinación y tinción	35
8.3.7. Montaje, limpieza y etiquetado.....	35
8.3.8. Observación, fotomicrografías y análisis	36
9. Resultados y discusión	37
9.1. Cultivo <i>in vitro</i>	37
9.1.1. Regeneración con BA	37
9.1.2. Inducción con 2,4-D y BA	42
9.2. Histología vegetal	44
9.2.1. Explante sin tratamiento.....	44
9.2.2. Regeneración con BA	49
9.2.3. Inducción con 2,4-D y BA	60
9.2.4. Corte de callo embriogénico.....	64
10. Conclusiones	72
11. Literatura citada.....	75
12. Anexos.....	81

1. ÍNDICE DE FIGURAS

- Fig. 1.** Distribución mundial de los cultivos de café. r) *C. canephora* a) *C. arabica* m) ambos (Tomado de Quist, 2015). Pág.10.
- Fig. 2.** Morfología de *C. canephora* (Tomado de Köhler, 1914). Pág.10.
- Fig. 3.** Sistema radicular del cafeto. a. Raíz principal. b. Raíz axial. c. Raíz lateral. d. Raíces absorbentes o alimentadoras. e. Pelos radiculares (Tomado de Wintgens, 2004). Pág.11.
- Fig. 4.** Inflorescencias de *C. canephora* (Tomado de Café de Colombia, 2014). Pág.12.
- Fig. 5.** Frutos de *C. canephora* (Tomado de Café de Colombia, 2014). Pág.12.
- Fig. 6.** Corte longitudinal y transversal del fruto y embrión del cafeto (Modificado de Wintgens, 2004). Pág.12.
- Fig. 7.** Sistema de propagación vegetativa *in vitro*. Regeneración directa e indirecta (Modificado de AGROBIOTECNOLOGÍA, 2010). Pág.17.
- Fig.8.** Regeneración vía embriogénesis somática (Modificado de AGROBIOTECNOLOGÍA, 2010). Pág.19.
- Fig. 9.** Esquema de técnicas histológicas (Modificado de Sandoval, *et. al.* 2005). Pág.23.
- Fig. 10.** Diagrama general de métodos Pág.28.
- Fig. 11.** Material biológico. a) Planta madre. b) Hojas seleccionadas para explante. Pág.29.
- Fig. 12.** Disección de explante. Pág.30.
- Fig. 13.** Muestras en fijador. Pág.32.
- Fig. 14.** Tren de deshidratación con ABT. Pág.33.
- Fig. 15.** Procedimiento de montaje. a. Hojuelas de Paraplast®. b. Moldes de papel. c. Muestras montadas en cubos de madera. Pág.34.
- Fig. 16.** Microtomo de rotación y baño de flotación. Pág.35.
- Fig. 17.** Explante de hoja a cuatro semanas en medio MS suplementado con BA. Pág.37.
- Fig. 18.** Hoja en proliferación a ocho semanas de cultivo en medio MS con BA. a. Callo en zona de corte del explante. b. Acercamiento a un embrión en estadio globular. Pág.38.
- Fig. 19.** Explantes a doce semanas en medio sin hormonas. a y b) Embriones somáticos en diferentes estadios. Pág.38.
- Fig. 20.** Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo. Pág.39.

- Fig. 21.** Inducción de la embriogénesis somática en medio MS adicionado con 2,4-D y BA. a) Cuatro semanas de cultivo. b) Ocho semanas de cultivo. Pág.42.
- Fig. 22.** Sección transversal de la lámina foliar (LF) tomada directamente de la planta madre mostrando la vena media (VM). Pág.44.
- Fig. 23.** Acercamiento a la sección transversal de la lámina foliar compuesta por epidermis adaxial (EAd), parénquima en empalizada (PEm), parénquima esponjoso (PEs) y epidermis abaxial (EAb). Pág.45.
- Fig. 24.** Sección transversal de la vena media mostrando el tejido dérmico compuesto por epidermis adaxial (EAd) y epidermis abaxial (EAb), el tejido fundamental y el tejido vascular con un haz vascular de tipo anticribal compuesto por la médula (Me), el xilema (Xi) y el floema (FI). Pág.46.
- Fig. 25.** Acercamiento a la sección trasversal de la zona de corte (ZC) del explante mostrando proliferación celular (PC) o callo de cicatrización. Pág.49.
- Fig. 26.** Lámina foliar en sección transversal a cuatro semanas en medio de cultivo MS con BA. La epidermis adaxial (EAd), la abaxial (EAb) y el parénquima en empalizada (PEs) conservan su organización inicial, el parénquima esponjoso (PEs) muestra espacios intercelulares y desorganización. Pág.50.
- Fig. 27.** Acercamiento a la sección transversal del explante a cuatro semanas en medio MS con BA en donde se puede observar una zona meristemática (ZM) inmersa en el parénquima esponjoso (PEs). Pág.51.
- Fig. 28.** Sección transversal de la lámina foliar (LF) a ocho semanas en medio MS con BA, la proliferación celular (PC) se da en la zona de corte (ZC), se observa un embrión somático (Es). Pág.52.
- Fig. 29.** Acercamiento a proliferación celular en donde se observan embriones en etapa globular (EmGl). Pág.53.
- Fig. 30.** Acercamiento a sección transversal de una zona meristemática (ZM). Embriones somáticos (Es) mostrando suspensor (Su). Pág.54.
- Fig. 31. a.** Sección transversal de un embrión somático en la zona de proliferación celular (PC). b. Acercamiento al procámbium del embrión (PCa). Pág.56.
- Fig. 32.** Sección de lámina foliar (LF) a doce semanas de incubación, proveniente de medio MS adicionado con BA, en donde se observan remanencias de proliferación celular (PC) y embriones somáticos (Es). Pág.57.

Fig. 33. Sección longitudinal de embrión somático en etapa cotiledonar, se observan los cotiledones (Co), el ápice (Ap), el procambium (PCa) y remanencias de la lámina (LF).

Pág.58.

Fig. 34. Sección transversal de la lámina foliar (LF) a cuatro semanas de inducción en medio MS adicionado con BA y 2,4-D en donde el callo (Ca) proliferó en gran parte de la lámina quedando sólo remanencias de ésta.

Pág.60.

Fig. 35. a. Sección de la lámina de hoja mostrando proliferación de callo (Ca) en todos los estratos celulares excepto en vena media (VM). **b.** Acercamiento a vena media mostrando que no hubieron cambios estructurales en el xilema (Xi).

Pág.62.

Fig.36. Sección de callo mostrando embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo, desde embriones globulares (EmGl), embriones acorazonados (EmAc), hasta cotiledonarios (EmCo).

Pág.64.

Fig. 37. Acercamiento a zona meristemática (ZM) en donde se observan las células con núcleos (Nu) prominentes.

Pág.65.

Fig. 38. Acercamiento a proembriones (PrEm) en etapa bicelular mostrando un núcleo (Nu) prominente.

Pág.67.

Fig. 39. Sección longitudinal de embriones en etapa globular (EmGl) de los cuales se observa su protodermis (PDe), el procámbium (PCa) y el suspensor (Su).

Pag.68.

Fig. 40. Sección longitudinal de embrión somático en etapa cotiledonar. **a.** Se observan los cotiledones (Co), el procámbium (PCa) y el suspensor (Su). **b.** Acercamiento al meristemo apical (MeAp). **c.** Acercamiento al suspensor. **d.** Acercamiento a las células que forman el procámbium.

Pág.70.

Fig. 41. Embriogénesis somática secundaria. **a.** Sección longitudinal de embrión somático secundario derivado de otro en etapa cotiledonar (EmCo). **b.** Sección transversal de embriones somáticos secundarios (EsSe) derivados de la zona del suspensor (Su).

Pág.71.

2. ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético	Su	Suspensor
ABT	Alcohol butílico terciario	VM	Vena media
Ap	Ápice	Xi	Xilema
BA	Benciladenina	ZC	Zona de corte
Ca	Callo	ZM	Zona meristemática
Co	Cotiledones		
CTV	Cultivo de tejidos vegetales		
EAb	Epidermis abaxial		
EAd	Epidermis adaxial		
EmAc	Embrión acorazonado		
EmCo	Embrión cotiledonar		
EmGl	Embrión globular		
ES	Embriogénesis somática		
Es	Embrión somático		
ESD	Embriogénesis somática directa		
ESI	Embriogénesis somática indirecta		
EsSe	Embrión somático secundario		
FI	Floema		
LM	Lámina foliar		
Me	Médula		
MeAp	Meristemo apical		
Nu	Núcleo		
PC	Proliferación celular		
PCa	Procámbium		
PDe	Protodérmis		
PEm	Parénquima en empalizada		
PEs	Parénquima esponjoso		
RCV	Regulador de crecimiento vegetal		

3. RESUMEN

El café (*Coffea* sp.) es una planta leñosa perteneciente a la familia Rubiaceae, dentro de este género existen aproximadamente 70 especies pero son sólo dos, *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, las de mayor importancia económica debido a su uso como bebida y por sus metabolitos secundarios. La importancia del cultivo de *C. canephora* radica en la extracción de cafeína para diferentes fines, debido a que esta especie presenta una mayor producción de dicho alcaloide. Siendo esta una planta de tanta importancia y con creciente demanda mundial se ha apostado por las herramientas biotecnológicas para su propagación, a su vez, la implementación de otras herramientas que aporten datos que optimicen su producción.

Este estudio partió de un protocolo previamente establecido para la propagación de café vía embriogénesis somática, el cual abarcó desde la etapa de elección de explantes, la desinfección, inducción y mantenimiento de cultivos, hasta la obtención de plantas completas y aclimatadas. Se seleccionaron los dos medios más prolíferos para realizar un estudio histológico con el fin de conocer la ontogenia de la embriogénesis somática del café, comparando dos medios adicionados con dos tipos de reguladores de crecimiento vegetal (RCV), auxinas y citocininas. Se utilizó un medio de cultivo MS con Benciladenina (BA) (0-1mg/L), se tomaron muestras de los explantes foliares a cuatro, ocho y doce semanas de cultivo *in vitro* y se pudo observar el desarrollo de embriones somáticos en diferentes estadios. Se observó que la proliferación se da en la zona de corte de los explantes y que ésta se deriva del parénquima esponjoso. En la epidermis tanto adaxial como abaxial y en el parénquima en empalizada no hubo cambio en su organización inicial en todo el periodo de regeneración. Por otro lado, en el medio MS con BA y Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (0-1mg/L y 0-5mg/L, respectivamente) el callo se observó desde las primeras cuatro semanas. Se pudo observar en la sección histológica que tanto el parénquima esponjoso como el parénquima en empalizada formaron callo, el xilema de la vena media no tuvo cambios en su organización. Con las secciones de callo se demostró que éste era de tipo embriogénico, también se encontraron masas proembriogénicas, proembriones y embriones somáticos en todas sus etapas de desarrollo. En este medio, también se pudo observar embriogénesis somática secundaria derivada de la zona del suspensor. Para fines de propagación a gran escala, este último tratamiento resulta ser el más prolífero.

4. INTRODUCCIÓN

El café es de los cultivos más importantes a nivel mundial, siendo uno de los productos primarios más valiosos como fuente de divisas para los países en desarrollo (Fuentes, 2012). Año con año, el consumo y la demanda ha ido en aumento lo que ha hecho que se invierta y se apueste por nuevas tecnologías que ayuden a aumentar la producción de este cultivo (ICO, 2013).

La importancia de las plantas de café no sólo radica en su producción para consumo como bebida, sino también en la extracción de cafeína, un alcaloide utilizado en diversos fármacos y bebidas (Pardo, *et. al.*, 2007).

El café se propaga comúnmente de forma vegetativa por medio de estacas, pero esta técnica no es suficiente para cubrir la demanda mundial ya que la producción se ve limitada por el poco material que se puede obtener. Ante esto la biotecnología ha jugado un papel de suma importancia como una técnica ampliamente utilizada para la micropropagación de café. La embriogénesis somática (ES) es la vía de regeneración que se ha preferido en muchos protocolos debido a que se obtienen plantas completas y llega a ser una técnica muy productiva (Wintgens, 2004; Zamarripa & Pétiard, 2004; Etienne, *et. al.*, 2006; Ducos, *et. al.*, 2007; Santana, *et. al.*, 2007;).

Conocer el desarrollo ontogenético del café regenerado *in vitro*, con base en estudios anatómicos, puede brindar datos útiles sobre las diferentes etapas de desarrollo que atraviesan los embriones somáticos (Es), a su vez para definir si las condiciones de cultivo son las óptimas para la obtención de Es bien formados.

5. ANTECEDENTES

5.1. Aspectos generales de *Coffea canephora*

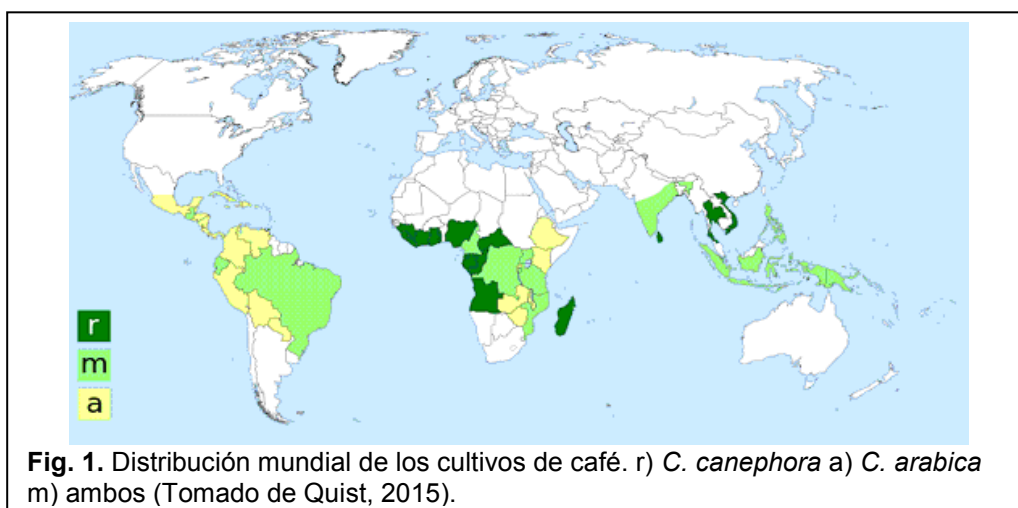
5.1.1. Clasificación taxonómica

El cafeto es una angiosperma dicotiledónea perteneciente a la familia Rubiaceae y al género *Coffea* (Tabla 1). Dentro de este género existen aproximadamente 70 especies pero son *Coffea arabica* y *Coffea canephora* las que lideran el cultivo a nivel mundial debido a su importancia económica, ya que por la calidad del grano, son las especies seleccionadas para consumo como bebida, a su vez por su alto contenido en alcaloides (Wintgens, 2004; Mora, 2008; Priyono, *et. al.* 2010).

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Rubiaceae
Género:	<i>Coffea</i>
Especie:	<i>Coffea canephora</i> L.

5.1.2. Centro de origen y distribución geográfica

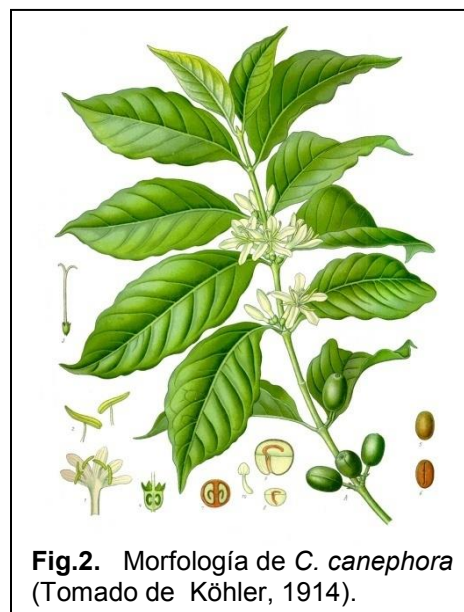
El centro de origen del café es Etiopía, África, y el de *C. canephora* se encuentra extensamente distribuido en la parte tropical de África a altitudes por debajo de los 1,000 m s.n.m. Los cultivos de *C. canephora* (Fig. 1) se encuentran distribuidos en las tierras bajas de la zona occidental y central de África; en regiones de altitud baja y media de Asia; y en las regiones tropicales del noroeste de Brasil, Ecuador y México en América (Wintgens, 2004; Duicela, *et. al.* 2005; Cárdenas, 2007; Mora, 2008).



5.1.3. Descripción botánica

El cafeto es un árbol perenne que llega a crecer hasta 10m de altura, el desarrollo de la parte aérea implica el alargamiento vertical del tallo principal (ortotrópico) y la formación de pares de hojas opuestas en cada nudo (Wintgens, 2004; Café de Colombia, 2014).

Las hojas del cafeto son brillosas, enceradas, de color verde oscuro, tienen forma elíptica y generalmente presentan venación conspicua (Fig. 2). El área foliar de un árbol adulto abarca de 22 a 45m² y las hojas tienen una vida útil de entre 7 y 10 meses (Wintgens, 2004; Duicela, *et. al.* 2005)



El sistema radicular consiste en cinco tipos de raíces: la central que llega a medir hasta 1m; las axiales que penetran hasta 3m de profundidad y se ramifican hacia todas direcciones; las raíces laterales que crecen horizontalmente y pueden cubrir un área de hasta 1.8m desde el tronco; las raíces absorbentes o alimentadoras y los pelos radiculares (Fig. 3) que son los principales proveedores de nutrición mineral de la planta y que crecen a diferentes profundidades (Wintgens, 2004; Duicela, *et. al.* 2005).

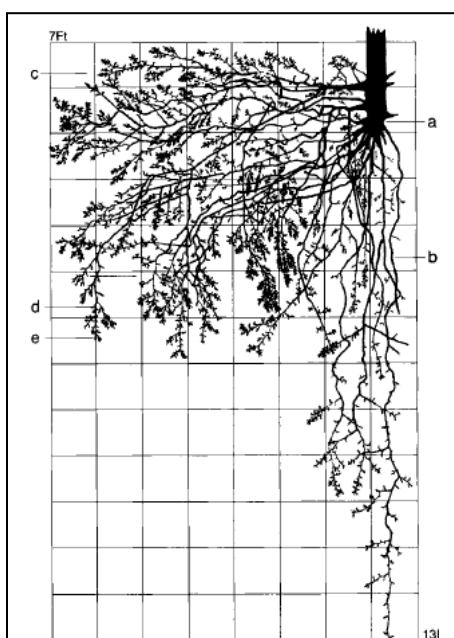


Fig.3. Sistema radicular de caféto.
a. Raíz principal. b. Raíz axial.
c. Raíz lateral. d. Raíces absorbentes o alimentadoras.
e. Pelos radiculares (Tomado de Wintgens, 2004).

El caféto, desde su germinación, tarda alrededor de tres a cuatro años en desarrollar la primera flor y fruto (Fig. 4). Las flores son blancas y crecen en racimos (inflorescencias) en las axilas de las hojas (Duicela, *et. al.* 2005; Café de Colombia, 2014). La polinización en *C. canephora* es estrictamente cruzada y se lleva a cabo por abejas. El tiempo transcurrido desde la floración hasta la maduración de los frutos toma de 9 a 11 meses (Wintgens, 2004).

Cerca de seis a ocho semanas después de la polinización, comienza el desarrollo del fruto (Fig. 5) el cual es una drupa que produce dos semillas las cuales miden aproximadamente 10mm de longitud y 6mm de ancho (Fig. 6), tienen endospermo córneo y un embrión de 3 a 4mm de longitud que se compone del hipocótilo y dos cotiledones (Wintgens, 2004; Café de Colombia, 2014).



Fig.4. Inflorescencias de *C. canephora* (Tomado de Café de Colombia, 2014).



Fig.5. Frutos de *C. canephora* (Tomado de Café de Colombia, 2014).

La germinación es epigea, toma de 30 a 60 días y se da sólo bajo condiciones muy favorables, como una alta humedad, temperatura ambiental de 30 a 35°C y una temperatura del suelo de 28 a 30°C (Wintgens, 2004).

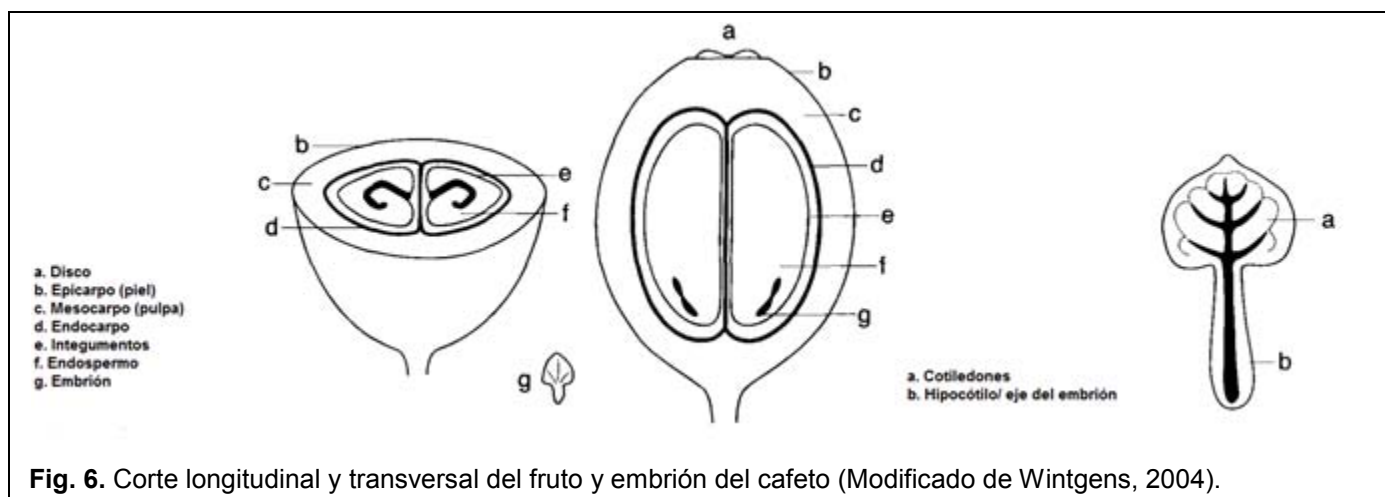


Fig. 6. Corte longitudinal y transversal del fruto y embrión del cafeto (Modificado de Wintgens, 2004).

5.2. Importancia económica del género *Coffea*

El café es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, se encuentra en segundo lugar sólo después del petróleo, como la principal fuente de divisas de los países en vías de desarrollo. Hoy en día alrededor de 70 países producen café, siendo Brasil (36%, 2010) y Vietnam (14%, 2010) los principales productores (Fuentes, 2012; ICO, 2013).

México aporta el 3.3% de la producción mundial, teniendo una área total sembrada de 769,786ha que se concentran principalmente en los estados de Chiapas, Veracruz, Puebla y Oaxaca. Esto convierte a México en uno de los diez principales productores de café a nivel mundial (Fuentes, 2012).

La producción de café está concentrada en dos especies, *C. arabica* y *C. canephora*, siendo la primera la que representa más del 70% de la producción mundial (Priyono, *et. al.*, 2010). A pesar de esto, *C. canephora* es la que se utiliza para la extracción de cafeína debido a que presenta mayor producción en comparación con *C. arabica* (1.7% y 1.0%, respectivamente). La cafeína es un alcaloide altamente empleado en la producción de fármacos (analgésicos y antipiréticos), refrescos de cola y bebidas energéticas (Pardo, *et. al.*, 2007).

5.3. Cultivo de tejidos vegetales

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es una herramienta biotecnológica que tiene dos bases teóricas: por un lado en la *Teoría celular* propuesta por los científicos alemanes Theodor Schwann y Jakob Schleiden (1838-1839), la cual menciona que: 1) una célula es la unidad básica de organización de la vida; 2) que todos los seres vivos están formados por células y por sus productos de secreción y que 3) una célula tiene la capacidad de desarrollar un organismo completo y funcional ya que contiene la información genética para esto. Por otro lado, se encuentra la totipotencialidad celular que retoma el tercer punto de la *Teoría celular*, debido a que las células vegetales tienen toda la información genética necesaria, éstas pueden adquirir la habilidad de crear una planta completa (Merkle, *et. al.*, 1995; López, *et. al.*, 2005).

El CTV se puede definir de manera general como “*el conjunto de técnicas que permiten el establecimiento, mantenimiento y desarrollo de cualquier parte de una planta, desde una célula hasta un organismo completo, bajo condiciones artificiales, asépticas y controladas*” (Pérez, *et al.*, 1999).

Esta técnica sigue una serie de etapas que son cruciales y de suma importancia para el éxito de los protocolos de propagación:

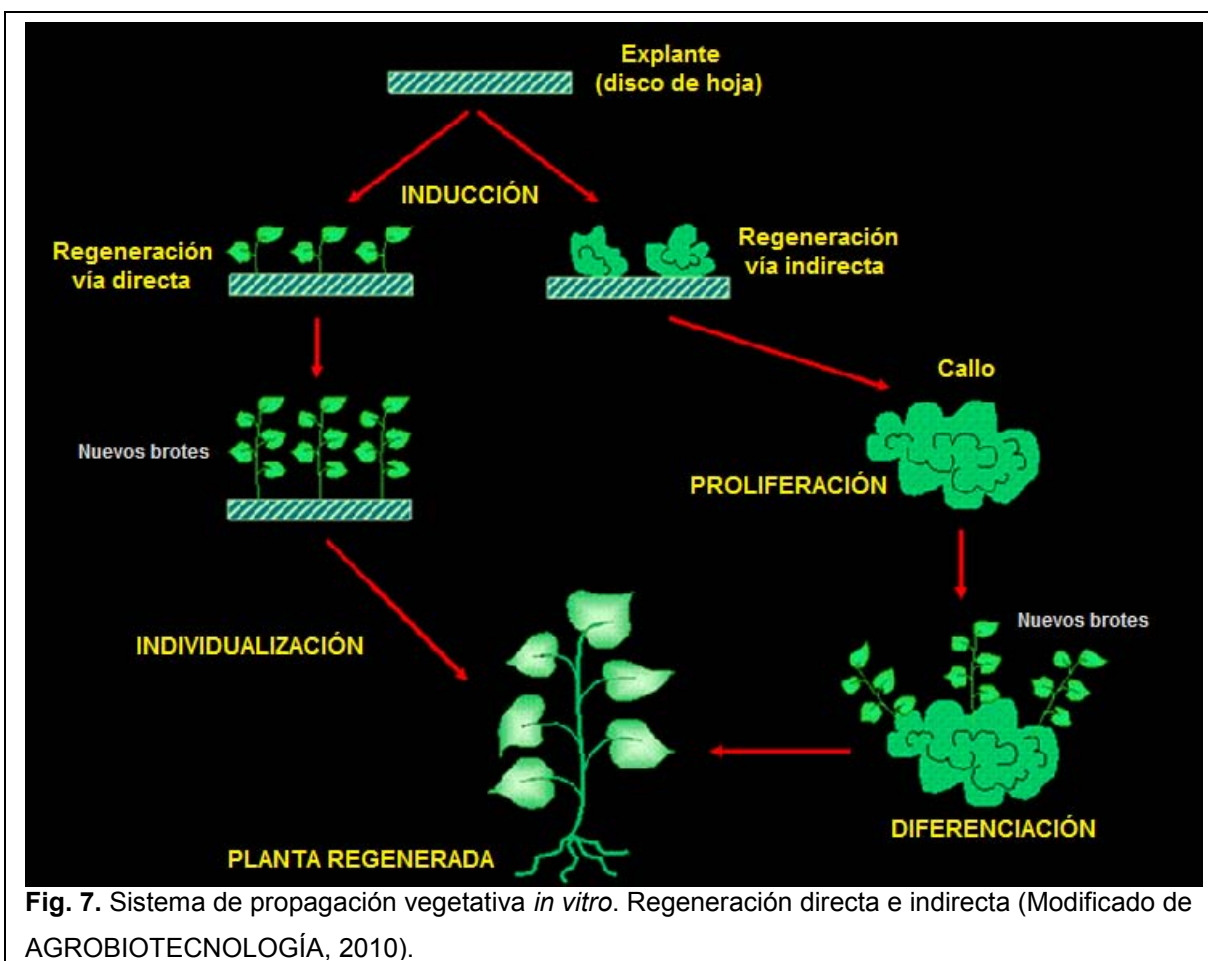
- **Selección de material vegetal y explantes:** En la selección del material vegetal se elegirá la planta madre, ésta será la fuente de explantes que se cultivarán *in vitro*. Esta etapa es importante debido a que gran parte de las respuestas que se obtengan estarán estrechamente relacionadas con las características fisiológicas y genéticas de la planta madre y del explante. Lo ideal es que estas plantas estén en buenas condiciones fitosanitarias, sanas, y vigorosas.

El explante es el órgano, tejido o segmento vegetal que será utilizado para iniciar el cultivo. La selección del explante, la edad de éste y su posición y función dentro de la planta madre son aspectos de suma importancia y que se deben tener en consideración al elegirlos ya que cada explante se comportará de manera diferente en el cultivo (Pérez, *et. al.*, 1999)

- **Establecimiento aséptico:** Para que el cultivo *in vitro* prospere es necesario eliminar los agentes contaminantes (hongos y/o bacterias). Éste es uno de los principales retos que afronta el CTV ya que no siempre es fácil erradicarlos porque el medio de cultivo está adicionado con una alta concentración de carbohidratos. Debido a esto es necesario trabajar bajo condiciones de asepsia, para lograrlo se requiere la esterilización del material que se va a utilizar, la desinfección del material biológico y el uso de una campana de flujo laminar (Pérez, *et. al.*, 1999).
- **Inducción y regeneración vía organogénesis o embriogénesis somática:** Un aspecto importante en esta etapa es la elección del medio de cultivo y condiciones de incubación. El medio de cultivo es el que tendrá todos los elementos necesarios para el desarrollo de las plantas: los macronutrientes y micronutrientes, la fuente de carbono, las vitaminas, el agua, fuentes de nitrógeno orgánico, complejos inorgánicos, reguladores de crecimiento vegetal (RCV), materiales de soporte, entre otros. Los medios de cultivo son elegidos según la planta que se quiera propagar, el tipo de explante y la respuesta que queramos inducir (Fig. 7). Otro aspecto importante son las condiciones de incubación en las que se van a mantener los cultivos, como el fotoperiodo y la temperatura (Pérez, *et. al.*, 1999).

En CTV existen dos vías de regeneración que van a estar mediadas por las condiciones del medio de cultivo pero en mayor instancia por los RCV. La organogénesis o formación de *novo* de órganos vegetales (tallos, raíces, hojas) y la embriogénesis somática (ES) o formación de embriones sin fusión gamética. En los dos casos puede ser de manera directa, es decir, que los brotes o los embriones deriven directamente del explante o indirecta con una etapa previa de formación de células indiferenciadas denominadas *callo* (Pérez, *et. al.*, 1999).

- **Alargamiento, maduración, germinación y enraizamiento:** En esta etapa los brotes obtenidos vía organogénica se alargan y enraízan para obtener una planta completa y en el caso de los embriones somáticos, es necesario germinarlos, para que estos crezcan, se desarrollen y maduren. Todas estas etapas de desarrollo y respuestas están mediadas por los RCV (Pérez, *et. al.*, 1999).
- **Aclimatación y pase a suelo:** La aclimatación es donde se prepara a las plantas regeneradas para pasarlas a condiciones *ex vitro*, esta etapa es crucial ya que las plantas en condiciones *in vitro* tienen parcial o totalmente atrofiados sus sistemas (fotosintético, radicular, entre otros) por lo cual presentan deficiencias en su funcionalidad; el objetivo final de esta etapa es asegurar la supervivencia del mayor porcentaje posible de plantas regeneradas (Pérez, *et. al.*, 1999).



El CTV tiene una gran diversidad de usos y ventajas, entre las cuales podemos mencionar: el estudio básico de la anatomía, fisiología, genética, bioquímica, y ciencias afines (investigación básica); la propagación a gran escala; la bioconversión y producción de compuestos útiles (los metabolitos secundarios); obtención de plantas libres de patógenos; propagación de plantas con características seleccionadas; generación de plantas independientemente de las condiciones ambientales; conservación e intercambio de germoplasma; cultivo de especies en peligro de extinción, entre otras (Segretín, 2000).

5.3.1. Embriogénesis somática

La ES se puede definir como la formación de un embrión a partir de células en donde no hubo fusión gamética. Este no es un fenómeno artificial ya que es una estrategia de reproducción apomíctica conocida como embrionía adventicia (Merkle, *et al.*, 1995).

El CTV se basa en esto para la regeneración de embriones y plantas completas a partir de células somáticas, debido a la totipotencialidad y plasticidad de las células vegetales. (Abdelnour y Escalant, 1994).

Un embrión somático es morfológicamente igual a uno cigótico ya que pasa por las mismas etapas de desarrollo, son bipolares, no poseen conexiones vasculares con el tejido madre y son capaces de generar una planta nueva, completa y funcional (Abdelnour y Escalant, 1994).

La ES se da en cinco etapas: 1) la inducción del tejido embriogénico, 2) la proliferación, 3) la premaduración de los embriones somáticos, 4) la maduración de estos y 5) la germinación y obtención de plantas completas (Fig. 8) (Abdelnour & Escalant *et. al.*, 1994).

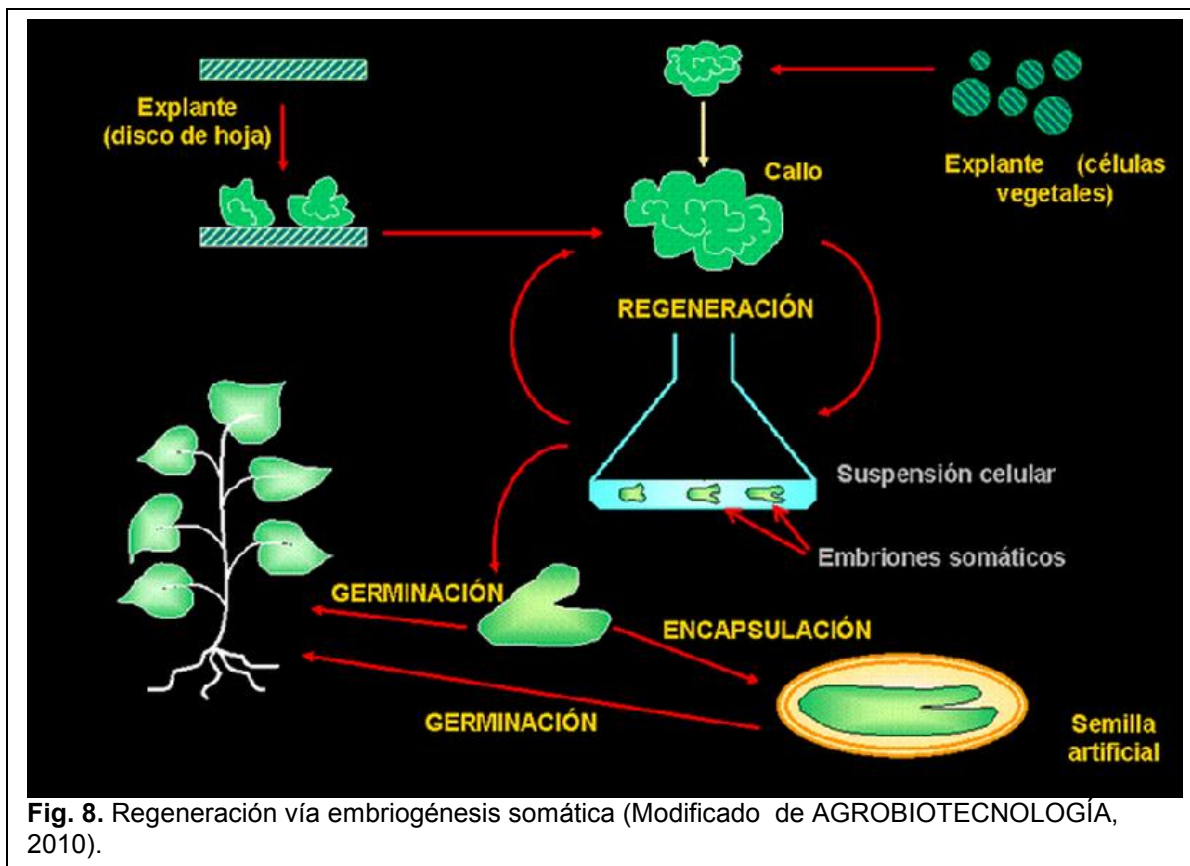


Fig. 8. Regeneración vía embriogénesis somática (Modificado de AGROBIOTECNOLOGÍA, 2010).

5.3.2. Embriogénesis somática en el género *Coffea*

Debido a la creciente demanda e importancia comercial de la planta de café se ha apostado por la biotecnología y el CTV para su propagación a gran escala, siendo la embriogénesis somática la principal vía de regeneración (Santana, *et. al.* 2007).

El primer reporte de ES en café fue publicado por Staritsky en 1970, en el cual utilizó un protocolo de un paso para la inducción de esta vía de regeneración. A partir de este protocolo hasta la fecha, se han reportado muchos otros más en los cuales prueban protocolos de un paso (Dublin, 1981; Yasuda, *et al.* 1985) y de dos o varios pasos secuenciales (Söndahl, *et. al.* 1979; Dublin, 1984; Zamarripa, *et al.* 1991; Neuenschwander y Baumann 1992).

También se han reportado estudios en donde se compara la embriogénesis somática directa e indirecta del café (Zamarripa, *et. al.*, 2004; Etiene, *et. al.*, 2006; Ducos, *et. al.*, 2007; Santana, *et. al.*, 2007; Priyono, *et. al.*, 2010). En estos protocolos han probado y comparado diferentes RCV: dentro de las auxinas el 2,4-D y dentro de las citocininas el BA y la Kinetina. Para la embriogénesis somática directa el uso de BA como único RCV ha dado resultados satisfactorios, pero para la formación de callo es esencial la adición de auxinas exógenas (Boxtel Berthouly, 1996; Santana, *et. al.* 2007).

Algunos protocolos abarcan todas las etapas de la embriogénesis, desde la inducción, la proliferación, la maduración y germinación de embriones hasta la obtención de plántulas, su aclimatación y pase a suelo (Santana, *et. al.* 2007).

5.4. Histología vegetal

La histología vegetal se puede definir como el estudio de las estructuras microscópicas (tejidos o células), su relación topográfica y entre células, utilizando técnicas histológicas para observar, analizar y examinar los componentes morfológicos de éstas. Varias técnicas histológicas son comúnmente utilizadas para examinar los tejidos vegetales (Montalvo, 2010; Trigiano, *et. al.*, 2011) pero todas ellas llevan un patrón de pasos en común (Fig. 9) de las cuales se hacen modificaciones (López, *et. al.*, 2005; Sandoval, *et. al.* 2005 & Trigiano, *et. al.*, 2011):

- **Recolecta de material:** En esta etapa se seleccionan las muestras de material biológico a las cuales se les hará el estudio histológico, dicho material pueden ser hojas, tallos, raíces, frutos, flores, embriones, callos, entre otros (Sandoval, *et. al.* 2005).
- **Fijación:** La fijación es el proceso mediante el cual se preserva la organización morfológica y el contenido químico de una célula o un tejido, en esta etapa se requiere que el agente fijador interrumpa el proceso de vida dentro de las células pero conservando sus propiedades y evitando la distorsión del arreglo de células y tejidos lo mejor posible (Sandoval, *et. al.* 2005).
- **Deshidratación:** Debido a que las estructuras vegetales tienen un alto contenido de agua, es necesario removerla al máximo para que éstas puedan ser infiltradas e incluidas en un medio insoluble al agua para endurecerlas previo a su corte (Sandoval, *et. al.* 2005).

- **Infiltración:** Como los tejidos vegetales no son lo suficientemente rígidos para poder hacer secciones delgadas de ellos es necesario darles soporte, para esto las muestras se deben poner en contacto con un medio de infiltración (Sandoval, *et. al.* 2005).
- **Inclusión:** El medio de infiltración debe de penetrar todo el tejido para lograr darle el soporte y rigidez necesaria para el subsecuente corte (Sandoval, *et. al.* 2005).
- **Microtomía:** Para poder llevar a cabo el análisis de los tejidos internos es necesario utilizar un microscopio, por lo cual las secciones de estos deben de ser lo suficientemente delgadas para permitir el paso de la luz, esto sólo se consigue con el uso de micrótomos que hacen secciones a nivel de micrómetros (μm) (Sandoval, *et. al.* 2005).
- **Tinción y montaje:** Algunas estructuras vegetales son altamente transparentes o sin color por esto es necesarios hacerlas visibles por medio de colorantes, a esto se le conoce como tinción. Las tinciones no sólo sirven para dar color, también pueden ser utilizadas para contrastar y resaltar estructuras celulares de interés. Existe una amplia variedad de colorantes y cada uno de estos se utiliza para partes o contenidos celulares específicos (Sandoval, *et. al.* 2005).
- **Observación:** Por último, es necesaria la observación y análisis de las muestras utilizando el tipo de microscopía que sea óptima para el estudio que se quiera realizar (Sandoval, *et. al.* 2005).

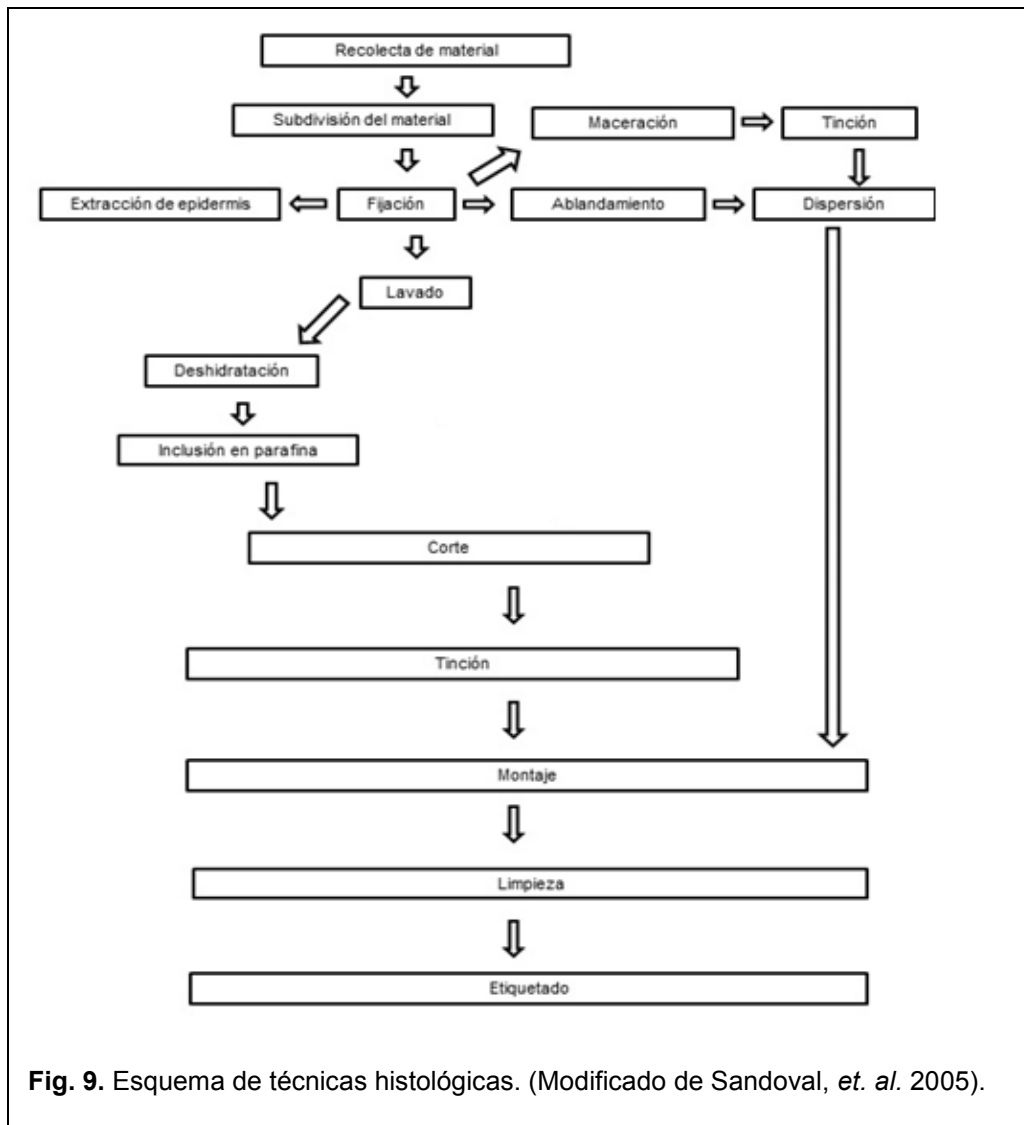


Fig. 9. Esquema de técnicas histológicas. (Modificado de Sandoval, *et. al.* 2005).

5.4.1. Estudios histológicos en el género *Coffea*

Diversos estudios histológicos de embriones somáticos (Es) de café se han llevado a cabo para conocer su desarrollo en condiciones *in vitro* (Pierson, *et. al.*, 1983; Michaux, *et. al.*, 1987; Michaux & Dublin, 1987; Michaux, *et. al.*, 1989; Quiroz, *et. al.*, 2002).

Se ha seguido el desarrollo y cambio de las células somáticas de tejidos foliares cultivadas *in vitro* hasta la formación de Es, esto se llevó a cabo en diferentes genotipos de *C. arabica* con el fin de ver los cambios a través del tiempo (Michaux, *et. al.*, 1989).

Otro estudio realizado en *C. arabica* a partir de tejido foliar tuvo como objetivo poder determinar las condiciones óptimas para la inducción de células embriogénicas y definir los mejores tiempos para transferir los cultivos a los subsecuentes medios para el mejor desarrollo de los embriones (Michaux, *et. al.*, 1987). Un estudio muy parecido se llevó a cabo pero para conocer todo el desarrollo de *C. arabica* desde el inicio del cultivo de explantes foliares hasta la formación de Es, en dicho estudio se llega a la conclusión de que el desarrollo de estos es “perfectamente comparable” al de un embrión cigótico (Michaux, *et. al.*, 1987).

Otro estudio llevó a cabo el análisis histológico de Es comparando la vía directa y la indirecta de la ES, se hizo con explantes de hoja de *C. arabica* llegando a la conclusión que ambos embriones desarrollados por vía directa e indirecta tienen un origen unicelular (Quiroz, *et. al.*, 2002).

En una revisión realizada de todos estos estudios reportados se llega a la conclusión de que aún no están bien claros los factores que afectan los patrones de desarrollo de los embriones somáticos (Santana, *et. al.*, 2007).

6. JUSTIFICACIÓN

Debido a la gran importancia económica que tiene el cultivo de café y a la incapacidad de los métodos convencionales para satisfacer la creciente demanda mundial, se ha optado por el uso de la biotecnología para su propagación a gran escala. El cultivo *in vitro* es una herramienta que ha dado muy buenos resultados para conseguir su micropropagación. Las técnicas histológicas son otra herramienta muy útil que puede ir de la mano con el CTV para conocer los eventos morfogénicos que se producen durante el desarrollo, estos datos pueden ayudar a mejorar la eficiencia del proceso de la ES (Menéndez y de García, 1997).

El estudio histológico de la ES ayuda a conocer y entender algunos problemas fundamentales en el crecimiento de los embriones, este tipo de investigaciones proveen una excelente oportunidad para el estudio de embriogénesis básica incluyendo la posibilidad de cambiar el desarrollo del embrión y su metabolismo con la modificación en la nutrición, condiciones ambientales y RCV (Yeung, 1995).

Conocer el desarrollo ontogenético del café regenerado por CTV puede brindar datos muy útiles sobre las diferentes etapas de desarrollo embrionario y así ayudar a determinar las mejores condiciones de cultivo *in vitro* según el estado de desarrollo que presenten. La histología también nos brinda datos sobre el desarrollo de los embriones de café ya que las etapas que se llevan a cabo vía ES son las mismas por las que pasa un embrión cigótico (Quiroz, *et. al.*, 2002).

7. OBJETIVOS

7.1. General

Comparar histológicamente el desarrollo ontogénico de la embriogénesis somática de *C. canephora* L. var. *robusta* derivada de dos medios de cultivo, uno adicionado con citocininas (benciladenina) y otro con la mezcla de citocininas y auxinas (benciladenina con ácido 2,4-diclorofenoxiacético).

7.2. Particulares

- Inducir la embriogénesis somática de café con un medio adicionado con BA y otro con BA y 2,4-D.
- Determinar anatómicamente el tipo de embriogénesis derivada en cada uno de los tratamientos.
- Realizar estudios histológicos en ambos tratamientos cada cuatro semanas durante el tiempo de regeneración *in vitro*.
- Comparar histológicamente el origen de la embriogénesis somática en ambos tratamientos.
- Determinar qué tejidos son los que derivan las respuestas al estímulo *in vitro* en ambos tratamientos.
- Observar mediante secciones histológicas los embriones somáticos e identificar los estadios de desarrollo de estos.
- Evaluar y comparar ambos tratamientos para determinar cuál puede tener mayor regeneración de embriones somáticos.
- Contrastar las respuestas obtenidas en ambos tratamientos para ver si existen diferencias y/o semejanzas en el desarrollo ontogénico.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

Para el cumplimiento de los objetivos, el presente trabajo se desarrolló en dos etapas: 1. El cultivo de tejidos vegetales, el cual se llevó a cabo en el laboratorio 116 de CTV de la Facultad de Química bajo la dirección de la Ing. Teresa de Jesús Olivera Flores y 2. Estudios histológicos que tuvieron lugar en el laboratorio de Anatomía Vegetal del Jardín Botánico en el Instituto de Biología, bajo la dirección de la Dra. Estela Sandoval Zapotitla (Figura 10).

8.1. Diagrama general de métodos

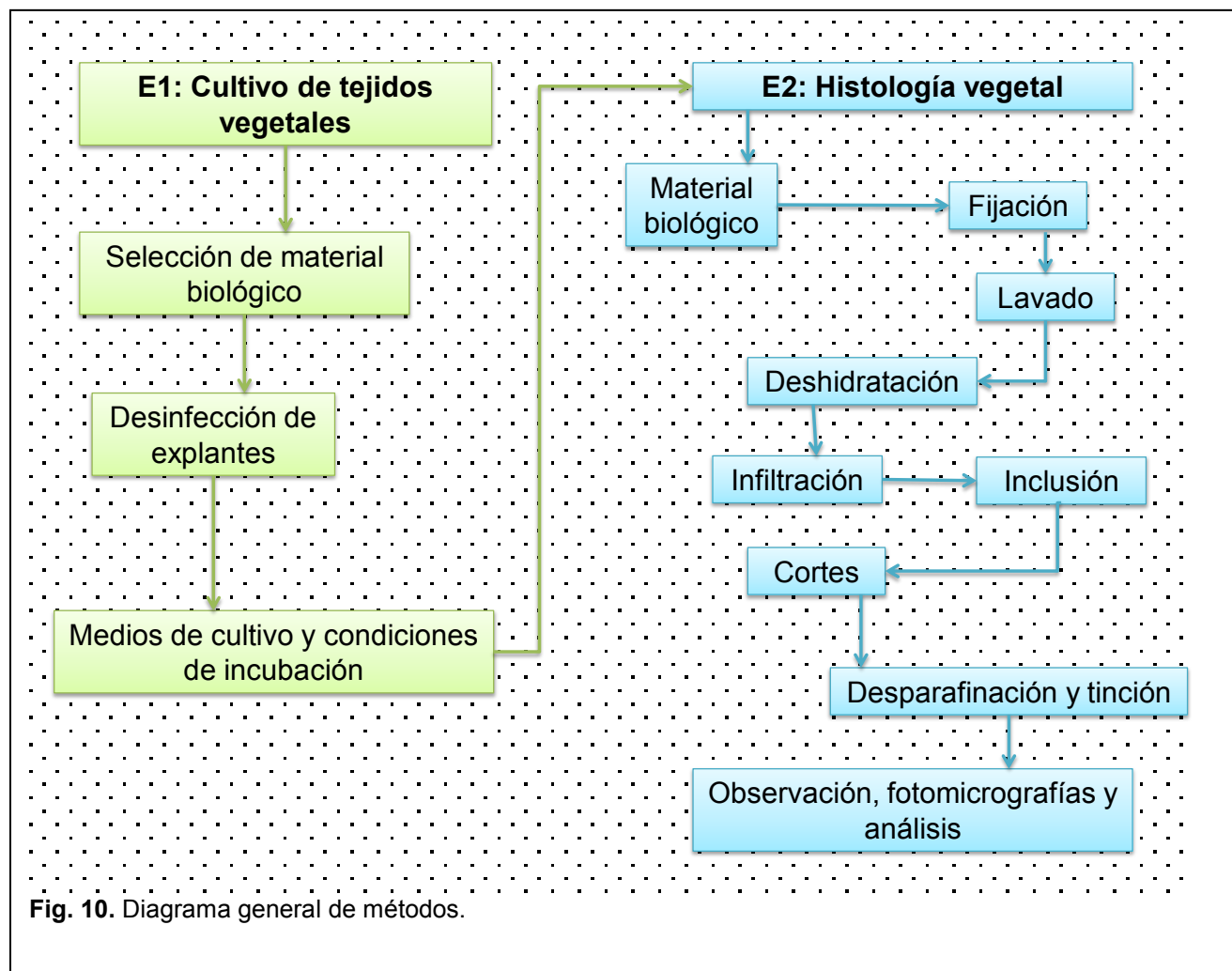


Fig. 10. Diagrama general de métodos.

8.2. Etapa 1: Cultivo de tejidos vegetales

Esta etapa se realizó en conjunto con el M. en C. Octavio González Caballero y el Biol. Alfonso Fuentes Molina, que previamente establecieron el protocolo de regeneración de café vía embriogénesis somática. El explante, los medios y las condiciones de cultivo para realizar pruebas histológicas se seleccionaron con base en este protocolo.

8.2.1. Material biológico y selección de explante

El material biológico que se utilizó fueron plantas de *C. canephora* que se encontraban en condiciones de invernadero, éstas tuvieron un previo tratamiento fitosanitario, eran plantas sanas y vigorosas (Fig. 11.a).

Se seleccionaron hojas jóvenes de aproximadamente 5cm de longitud de color verde claro, brillosas, con consistencia suave y flexibles (Fig. 11.b) las cuales se cortaron con un bisturí estéril en la base del peciolo y se pusieron en una solución antioxidante estéril que contenía ácido cítrico y ácido ascórbico (150mg/L).



Fig. 11. Material biológico. a) Planta madre. b) Hojas seleccionadas para explante.

8.2.2. Desinfección de explantes

Se llevó a cabo un tren de desinfección de los explantes el cual consistió en lavar las hojas superficialmente con solución jabonosa (jabón de manos comercial) y agua corriente. Seguido a esto y en condiciones asépticas (dentro de campana de flujo laminar) se colocaron en etanol al 70% (v/v) durante 1min con agitación suave para después pasarlas a una solución de Agri-mycín® (4g/L) durante 20min, posteriormente se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) al 20% (v/v) durante 10min. Por último, las hojas se enjuagaron con una solución antioxidante estéril (4g/L de L-Cisteína, 150mg/L de ácido cítrico y de ácido ascórbico).

Terminado el tren de desinfección se realizó la disección de las hojas para obtener segmentos de aproximadamente 1cm² (Fig. 12) que fueron puestos en medio de cultivo con la cara adaxial en contacto con el medio.

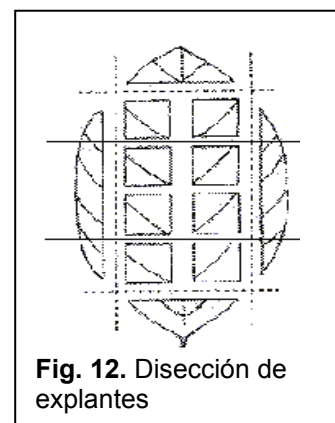


Fig. 12. Disección de explantes

8.2.3. Medios de cultivo y condiciones de incubación

El medio de cultivo que se utilizó fue Murashige y Skoog (MS) (Anexo 1) adicionado con vitaminas R2 (Anexo 2), glicina, sacarosa, reguladores de crecimiento y GelzanTM. Para llevar a cabo la embriogénesis somática se utilizaron dos tipos de reguladores de crecimiento; auxinas (2,4-D) y citocininas (BA). Los medios de cultivo y las condiciones de incubación se pueden observar en el Anexo 3.

8.3. Etapa 2: Histología vegetal

8.3.1. Material biológico

Para llevar a cabo el estudio histológico se tomaron las siguientes muestras:

- 1) Segmentos de hoja sin tratamiento tomadas directamente de la planta madre, se seleccionaron hojas con las mismas características que las que se utilizaron para llevar a cabo el cultivo *in vitro* (Fig. 11).

Las siguientes tomas de muestras se llevaron a cabo dentro de la campana de flujo laminar para evitar que se contaminaran los cultivos y seguir el estudio cada cuatro semanas, momento en que se llevaba a cabo el subcultivo.

- 2) Muestras del explante expuesto a medio MS con BA a cuatro, ocho y doce semanas de incubación.
- 3) Muestras del explante expuesto a medios MS adicionados con BA y 2,4-D a cuatro semanas.
- 4) Callo de 8 meses desde la inducción obtenido mediante el medio de cultivo adicionado con BA y 2,4-D.

Todas estas muestras se tomaron con tres repeticiones para proseguir con la fijación.

8.3.2. Fijación y lavado

Se utilizó el fijador Navashin que se compone de dos soluciones que son mezcladas en partes iguales justo antes de fijar las muestras (Anexo 4). Las muestras se quedaron en el fijador en agitación constante por 24h (Fig.13). Pasado el tiempo de fijación, éstas se lavaron en agua corriente, el lavado se llevó a cabo hasta que ya no se percibía el olor característico del fijador.



Fig.13. Muestras en fijador.

8.3.3. Deshidratación

El tren de deshidratación se llevó a cabo con Alcohol Butílico Terciario (ABT) a diferentes concentraciones (Anexo 5), en cada una estuvo 24h. A partir de ABT al 90% los frascos se colocaron en una estufa a 60°C (Fig. 14).

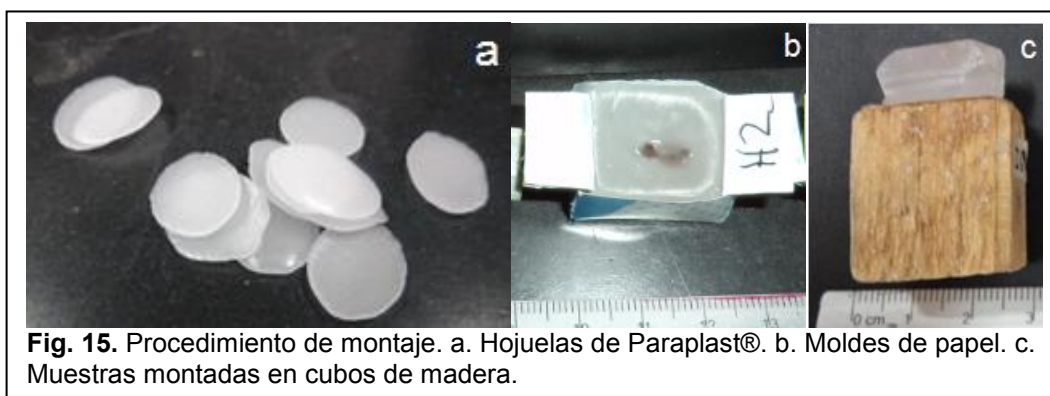


Fig.14. Tren de deshidratación con ABT

8.3.4. Infiltración e inclusión

Después del último cambio a ABT absoluto y pasadas las 24h correspondientes, se comenzó con la infiltración e inclusión. Para esto se utilizaron hojuelas de Paraplast®, de las cuales se añadieron dos por frasco cada media hora hasta tener una mezcla 1:1 de ABT absoluto:Paraplast®. Teniendo esta mezcla se dejaron los frascos en la estufa por 24h para después cambiarla a Paraplast® puro, en donde permanecieron otras 24h.

Pasado el tiempo, se colocaron las muestras en moldes de papel encerado hechos a medida en los cuales se orientó la muestra y se rellenaron con Paraplast® puro. Dichos moldes se pusieron en el refrigerador por 24h para que se endureciera el Paraplast®. Por último, las muestras endurecidas se montaron sobre cubos de madera (Fig.15.a, b y c).



8.3.5. Corte

Los cortes se llevaron a cabo con un micrótopo de rotación American Optical 820, se hicieron cortes a 10 μ m de grosor. Obtenidos los listones de Paraplast®, se pusieron en un baño de flotación el cual consiste de agua caliente (30°C) con grenetina. Los listones de Paraplast®

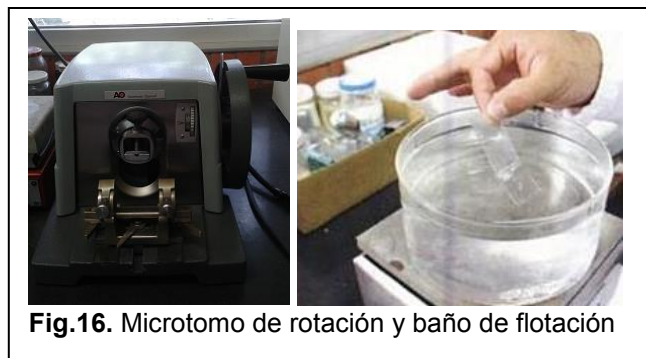


Fig.16. Microtopo de rotación y baño de flotación

permanecieron por un lapso de 7 min en el baño de flotación para permitir que los tejidos se expandan, pasado este tiempo los listones se tomaron con un portaobjetos y se dejaron secar por 24h. (Fig. 16).

8.3.6. Desparafinación y tinción

Antes de empezar con la tinción se desparafinaron los cortes con xilol y alcoholes a diferentes concentraciones. Se utilizó una tinción contrastante de Safranina “O”-Verde Rápido (Anexo 6) para destacar las estructuras y componentes celulares de los tejidos.

8.3.7. Montaje, limpieza y etiquetado

Para el montaje del cubreobjetos se utilizó resina sintética, los portaobjetos montados se dejaron en una estufa por 15 días a 60°C, para su observación.

8.3.8. Observación, fotomicrografías y análisis

Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico Carl-ZEISS-Axioskop, se tomaron fotos con los softwares de edición de vídeo Pinnacle™ Studio™ Plus (Versión 11.0) y Debut Video Capture. El procesamiento de las fotomicrografías se llevó a cabo con el editor gráfico Paint Shop Pro 8 y se puso la escala correspondiente con el software ImageJ. Por último se llevó a cabo el análisis de los resultados.

9. Resultados y discusión

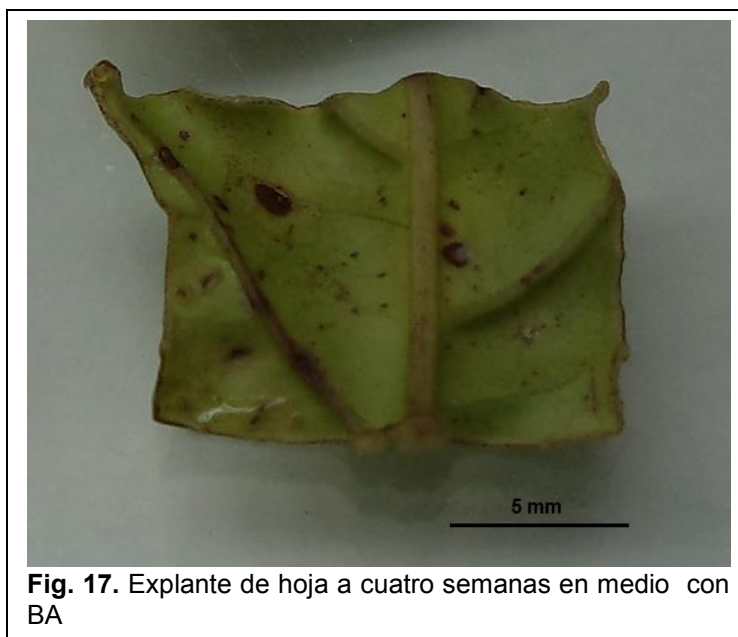
9.1. Cultivo *in vitro*

Se lograron establecer los explantes de manera aséptica, no hubo presencia de contaminación en los medios de cultivo debido a que el protocolo de desinfección ya estaba previamente establecido, probado y fue llevado a cabo de manera adecuada.

9.1.1. Regeneración con BA

Después de cuatro semanas de incubación en medio MS con BA (0-1mg/L) y en condiciones de oscuridad, los explantes se observaron ligeramente engrosados, hinchados y con ondulaciones en sus márgenes (Fig. 17). En las zonas de las heridas, se podía observar una ligera capa de callo de cicatrización ocasionado por el corte del explante.

Después de ocho semanas, en la etapa de proliferación, usando el mismo medio pero ahora en condiciones de fotoperiodo, los explantes tuvieron mayor proliferación celular. Se formó callo de color amarillo y friable (Fig. 18.a). Haciendo un acercamiento en el callo se podían ver unas protuberancias de apariencia sólida que se han reportado como embriones



somáticos en las primeras etapas de desarrollo (Fig. 18.b).

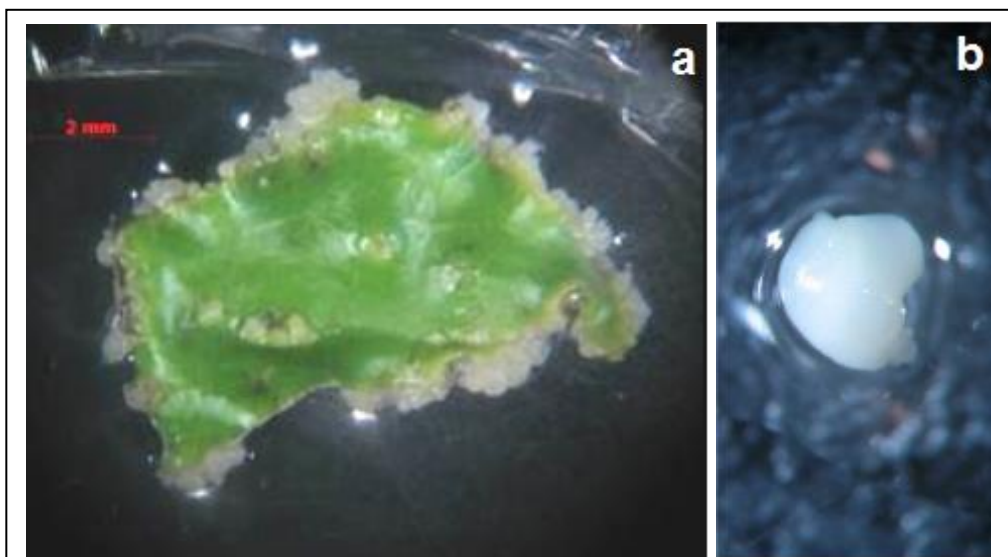


Fig. 18. Hoja en proliferación a ocho semanas de cultivo en medio MS con BA. a. Callo en zona de corte del explante. b. Acercamiento a un embrión en estadio globular.

A doce semanas, en un medio sin hormonas, la presencia de callo en los explantes disminuyó considerablemente (Fig. 19.a), quedando sólo remanencias, en el explante se podían distinguir embriones en diferentes etapas de desarrollo, lo cuales se podían separar del tejido madre de manera fácil (Fig. 19.b).

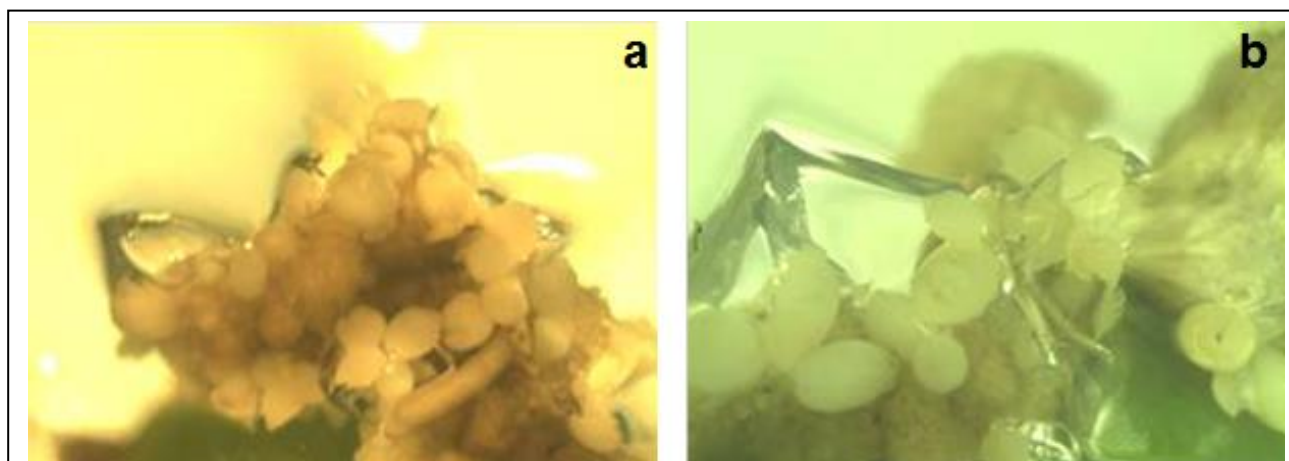
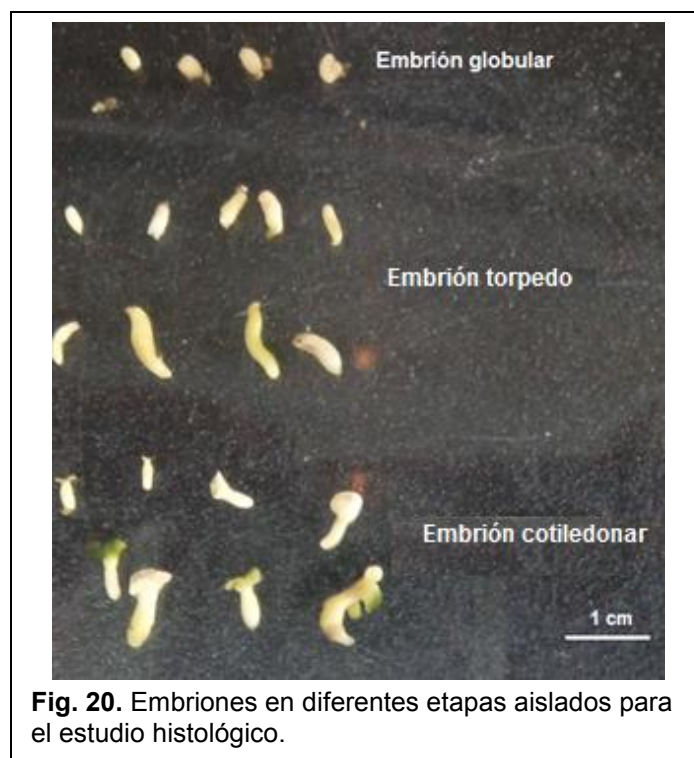


Fig. 19. Explantes a doce semanas en medio sin hormonas. a y b) Embriones somáticos en diferentes estadios.

Al final se pudieron aislar embriones en diferentes etapas de desarrollo para hacer el estudio histológico (Fig. 20).



Una de las premisas de la teoría de la embriogénesis somática menciona que para lograr la inducción de esta vía de regeneración es necesaria la sinergia entre auxinas y citocininas. Generalmente, las auxinas son necesarias para la inducción de la ES, mientras que a las citocininas se les atribuye una función directa en la maduración y desarrollo de los embriones pero no en su iniciación (Yasuda, *et. al.*, 1985).

Si bien, es sabido que la combinación de estos reguladores de crecimiento inducen la embriogénesis somática, se ha reportado en una gran diversidad de especies el uso de citocininas como único RCV para la inducción de la embriogénesis somática (Merkle, *et. al.* 1995), sin embargo, esto se da cuando el explante utilizado es de origen embrionario, ya que este tipo de tejidos tienen células embriogénicas predeterminadas o PEDECs, por sus siglas en inglés.

Las PEDECs tienen los genes de expresión embrionaria activados y no es necesario que pasen por una reprogramación en su vía de expresión genética. Por esta razón, aunque no esté la presencia exógena de auxinas, los genes ya están determinados a responder por vía embriogénica (Merkle, *et. al.* 1995).

En el caso del café se han reportado numerosos estudios en donde se ha logrado regenerarlo por la vía de embriogénesis somática a partir de explantes de hoja, pero la mayoría de estos han utilizado medios de cultivo con la combinación de auxinas y citocininas (Söndahl, *et. al.* 1979; Dublin, 1984; Zamarripa, *et. al.* 1991; Neuenschwander y Baumann, 1992).

En este estudio, el explante con el que se trabajó no es de origen embrionario, pero aun así se obtuvo una regeneración vía embriogénesis somática exitosa, logrando que los embriones se desarrollaran por completo hasta obtener plántulas. Yasuda y colaboradores (1985) lograron obtener ES de explantes de hoja de *C. arabica* utilizando el BA como único regulador de crecimiento, en este estudio reportan que sus callos mantuvieron su capacidad de regeneración por más de dos años, a pesar de esto no explican por qué obtuvieron dicha respuesta.

Los mecanismos de síntesis, acción y transporte de las auxinas endógenas podrían esclarecer por qué se obtuvo inducción de embriogénesis somática sin adición de auxinas exógenas.

Las auxinas endógenas se sintetizan en las regiones meristemáticas, y aunque se encuentran en todos los tejidos, están en mayor concentración en regiones que están en crecimiento activo como meristemas apicales, hojas jóvenes y frutos en desarrollo (Jordan y Casaretto, 2006). Estas hormonas están implicadas en la regulación de muchos procesos fisiológicos, como elongación celular, geotropismo y fototropismo.

Las auxinas tienen un mecanismo de transporte polar, éste es un proceso activo en el cual la auxina se va moviendo de célula a célula con una direccionalidad. En general, las auxinas se sintetizan en el ápice y se distribuyen a toda la planta por el floema (Berkel, *et. al.* 2013).

Otra particularidad importante es que las auxinas tienen un papel importante en el movimiento de las plantas hacia la luz o fototropismo. Los receptores de la luz se conocen como fototropinas y se activan en presencia de las auxinas, éstas tienen un fototropismo negativo, es decir, son sensibles a la luz, por lo tanto provocan curvaturas en los tallos dependiendo de la posición del sol (Berkel, *et. al.* 2013).

Al elegir como explantes hojas jóvenes de café, y que estos se hayan tomado muy temprano por la mañana, pudieron favorecer a que los explantes presentaran una concentración alta de auxinas endógenas, por lo tanto al ponerlas en medio de cultivo adicionado sólo con BA pudimos regenerar embriones somáticos sin necesidad de adicionar auxinas de manera exógena en el medio.

9.1.2. Inducción con 2,4-D y BA

En el caso del medio de cultivo MS adicionado con 2,4-D y BA (0-5 mg/L y 0-1 mg/L, respectivamente) a cuatro semanas de incubación en condiciones de oscuridad, se pudo observar que todo el explante formó callo, quedando sólo remanencias de la hoja. (Fig. 21). Se trataba de callo con una ligera coloración amarilla y nodular que en estudios se ha reportado como callo embriogénico (Halperin y Wetherell, 1965; Söndahl, *et. al.* 1979; Merkle, *et. al.* 1995; Boxtel y Berthouly, 1996; Quiroz, *et. al.* 2002).

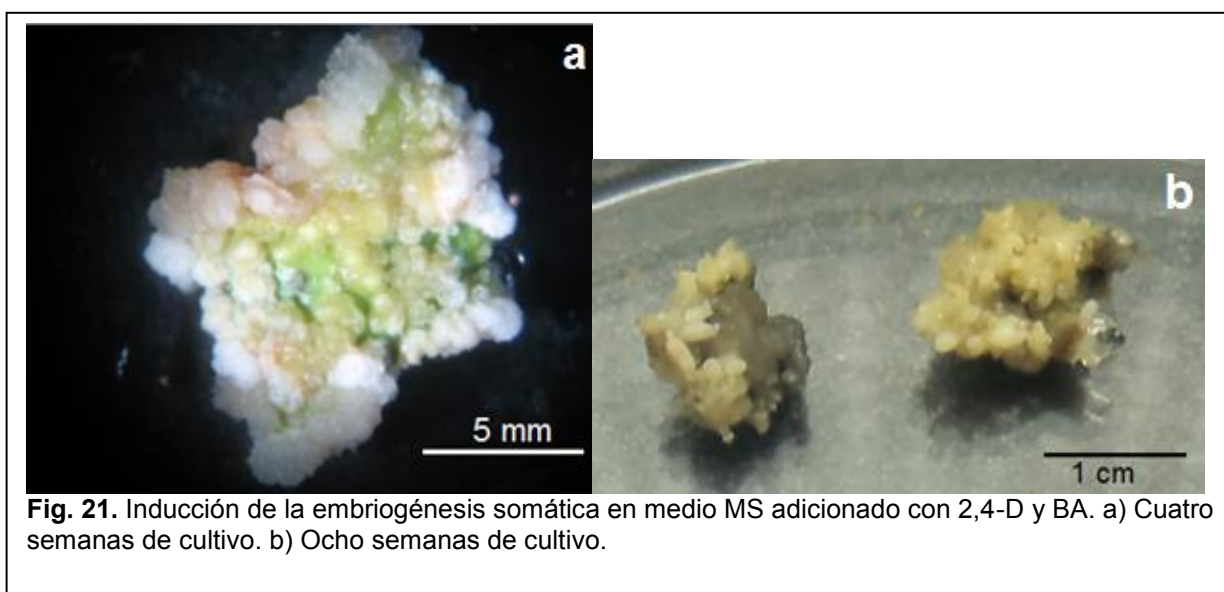


Fig. 21. Inducción de la embriogénesis somática en medio MS adicionado con 2,4-D y BA. a) Cuatro semanas de cultivo. b) Ocho semanas de cultivo.

En la inducción de la embriogénesis somática, la presencia de auxinas es considerada esencial (Yeung, 1995). En café, se ha reportado que para la formación de callo en explantes de hoja es necesaria la adición exógena de auxinas. La mayoría de los protocolos, para regenerar callo, se han realizado en dos fases o pasos. Primero un medio de inducción, en el cual las auxinas juegan un papel de suma importancia, y después un medio de proliferación en el cual se eliminan éstas (Santana, *et. al* 2007).

Después de ocho semanas en incubación el callo obtenido se separó de las remanencias del tejido madre y se proliferó en el mismo medio pero ahora sin la presencia del 2,4-D y en fotoperiodo. En este medio, se observó que los embriones somáticos comenzaron a desarrollarse pasando por todas sus etapas, se pudo apreciar que los embriones se desarrollaban y germinaban de manera asincrónica, encontrando en un mismo medio embriones globulares, acorazonados, torpedo y en etapa cotiledonar (Fig. 21.b).

A pesar de que se ha reportado en innumerables protocolos que las auxinas son esenciales para la inducción de embriogénesis somática, su exposición de manera continua puede ser perjudicial para la histodiferenciación (Merkle, *et. al.* 1995). Halperin y Wetherell (1964) reportaron que mantener de manera continua cultivos de embriones somáticos de zanahoria en medios con 2,4-D, inhibía su histodiferenciación y provocaban el desarrollo anormal del meristemo apical.

Boxtel y Berthouly (1996) mencionan que a pesar de que el uso de un protocolo de regeneración en un solo paso tiene la ventaja de formar embriones más rápido, y con una escala de germinación mayor, la regeneración de embriogénesis somática por dos pasos, lo que incluye la formación de callo o embriogénesis somática indirecta, tiene implicaciones importantes en términos de producción a gran escala.

Debido a que se contaba con callo embriogénico establecido anteriormente, éste fue utilizado para el estudio histológico y la regeneración de embriones.

9.2. Histología vegetal

9.2.1. Explante sin tratamiento

En la sección transversal de la lámina foliar del café (explante de 1cm² utilizado en la regeneración *in vitro*) se pudo observar que es una estructura bifacial compuesta por tejido dérmico, fundamental y vascular con una vena media de tipo anticribal (Fig.22).

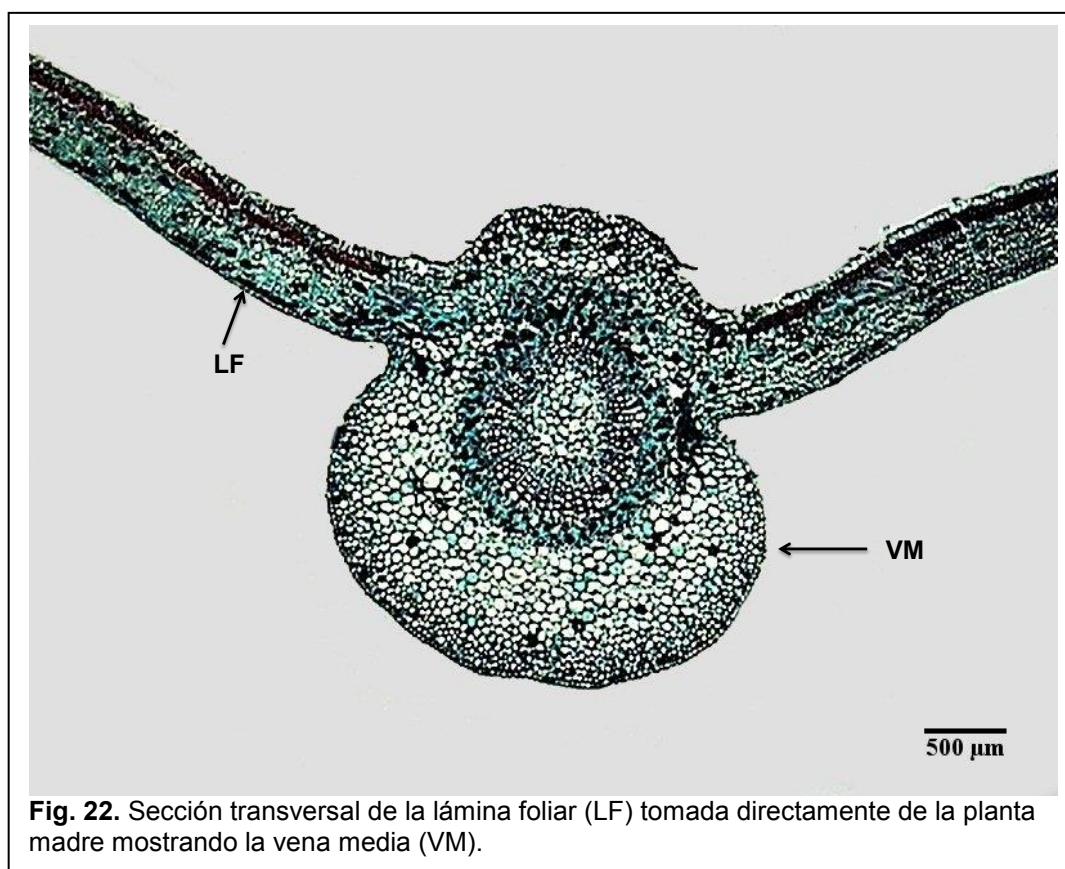


Fig. 22. Sección transversal de la lámina foliar (LF) tomada directamente de la planta madre mostrando la vena media (VM).

Se observaron tres estratos celulares bien definidos (Fig. 23), los cuales son:

- 1) Dos epidermis, la adaxial (EAd) y la abaxial (EAb), ambas uniestratificadas y formadas por células rectangulares e isodiamétricas, siendo la adaxial casi del doble del tamaño de las células de la epidermis abaxial (Fig. 23).
- 2) El parénquima en empalizada (PEm), formado por un estrato de células alargadas y delgadas, alineadas, compactas y sin espacios intercelulares. En este tejido se pudo apreciar una alta concentración de cloroplastos debido a su función fotosintética (Fig.23).
- 3) El parénquima esponjoso (PEs), compuesto de aproximadamente 9 estratos con células oblongas, con poco contenido celular, de diferentes formas y tamaños y con algunos espacios intercelulares para el transporte de gases (Fig. 23). A pesar de estas características, este estrato mantiene cierto orden y compactación.

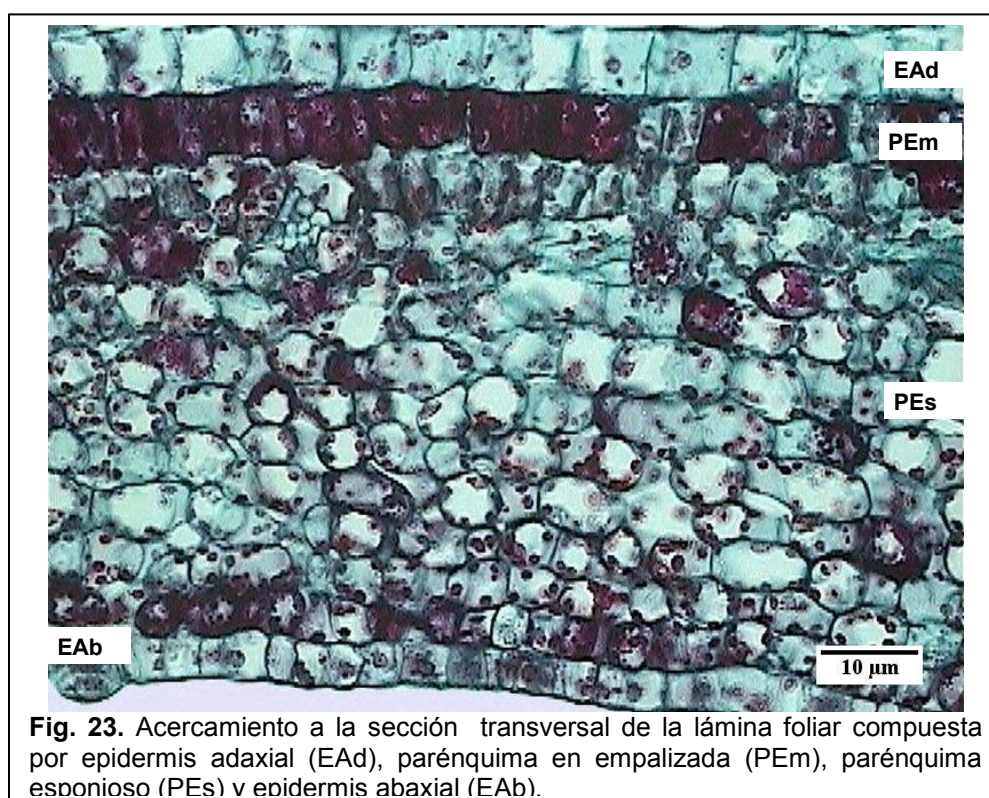


Fig. 23. Acercamiento a la sección transversal de la lámina foliar compuesta por epidermis adaxial (EAd), parénquima en empalizada (PEm), parénquima esponjoso (PEs) v epidermis abaxial (EAb).

En la vena media se pudo observar el sistema del tejido vascular que forma un cilindro central continuo rodeado por tejido parenquimático, este sistema está compuesto por el xilema y el floema (Fig.24.). Esta misma distribución de tejidos la observaron Menéndez y de García (1997) en su estudio realizado en café *C. arabica*.

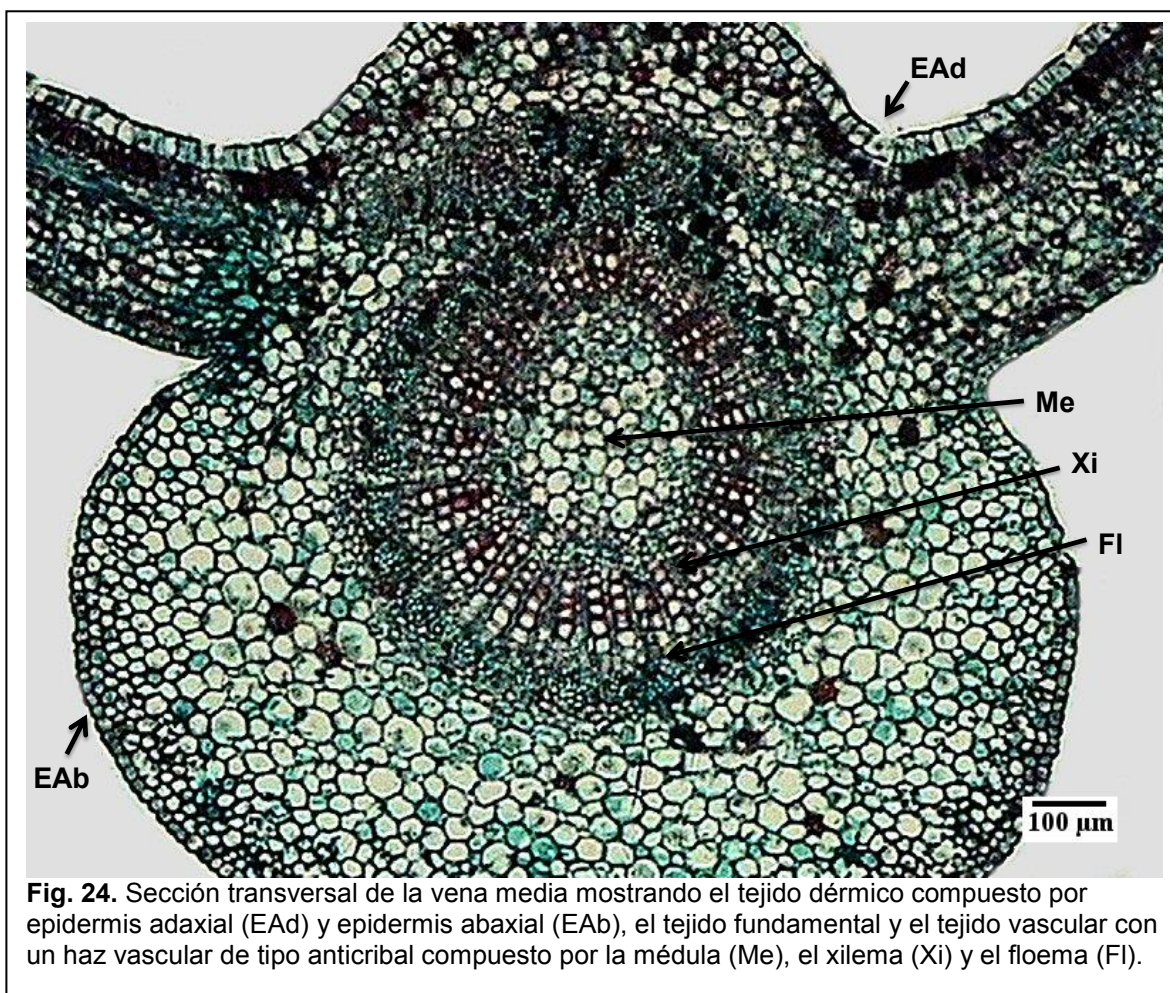


Fig. 24. Sección transversal de la vena media mostrando el tejido dérmico compuesto por epidermis adaxial (EAd) y epidermis abaxial (EAb), el tejido fundamental y el tejido vascular con un haz vascular de tipo anticribal compuesto por la médula (Me), el xilema (Xi) y el floema (FI).

En la hoja pudimos observar tejidos compuestos de estratos celulares con diferentes funciones y grados de especialización. Por un lado tenemos un tejido menos especializado que le da forma, estructura y soporte a la hoja, el tejido parenquimático, éste es el más similar al tejido meristemático ya que su grado de diferenciación es muy bajo (Molist, 2014).

Este tejido, constituyente del tejido fundamental de la planta, realiza diversas funciones que requieran un protoplasma vivo (fotosíntesis, almacenamiento, regeneración de tejidos, circulación de gases, etc). Las células parenquimáticas, aunque son variables y cumplen diversas funciones en la plantas, son células no especializadas ya que pueden cambiar de funciones o combinar varias de ellas, se trata de un sólo tipo celular por lo cual son relativamente indiferenciadas (Esau, 1976; Molist, 2014).

Aunque el tejido parenquimático, comparado con otros tejidos celulares, está poco diferenciado, existen parénquimas que tienen funciones más específicas que otros. Por ejemplo, encontramos mayor grado de especialización en el clorénquima o PEm, en éste hay una alta cantidad de cloroplastos debido a que su función es fotosintética. En cambio, el PEs es un tejido que da estructura a la hoja y es principalmente un tejido de transporte de CO₂, por lo cual se puede decir que el PEm tiene mayor grado de especialización que el PEs (Esau, 1976).

Por otro lado, están los tejidos que tienen funciones muy específicas ya que están conformados por más de un tipo celular y las células han pasado por cambios fisiológicos y anatómicos para poder cumplir dichas funciones. El tejido dérmico y el vascular son ejemplos de estos.

Los constituyentes del tejido vascular son el floema y el xilema. El floema es un tejido especializado en la conducción de las sustancias sintetizadas en la fotosíntesis, estas viajan desde su sitio de síntesis hasta cualquier otra parte de la planta en donde sean requeridos. Está formado por elementos de los tubos cribosos, células cribosas, fibras y parénquima (Dickison, 2000).

Por otro lado, el xilema se encarga del transporte activo de agua y sales minerales desde las raíces hasta el ápice de la planta. Está formado de diferentes tipos de células, unas vivas y otras no. Dentro de éstas podemos mencionar a las conductoras o elementos traqueales (traqueidas y elementos de vaso), a las células sustentantes o fibras y a las células de parénquima (Esau, 1976; Dickison, 2000).

Cuando las células de este tejido llegan a su madurez, pierden la membrana plasmática y engruesan la pared para terminar formando largos tubos lignificados para conducción, en este estado y al perder su membrana y organelos, las células están muertas y sólo queda su esqueleto lignificado (Dickison, 2000).

En teoría, todos los explantes o tejidos vegetales tienen la capacidad de formar embriones somáticos. Comúnmente para este fin se utiliza como explante estructuras embrionarias, como cotiledones o embriones cigóticos completos, pero los explantes derivados de órganos como las hojas también han sido exitosos para la regeneración por embriogénesis somática. La respuesta embriogénica del explante, si bien se puede mediar con la especialización de los tejidos, los reguladores de crecimiento y las condiciones *in vitro*, depende y varía en gran medida por el genotipo de la planta (Litz y Jarret, 1991).

9.2.2. Regeneración con BA

Después de cuatro semanas de tratamiento en el medio de cultivo MS adicionado con BA se pudo notar, de manera macro y microscópica que la zona en donde se realizó el corte del explante fue la primera en reaccionar al estímulo *in vitro*, generando un callo de cicatrización. En las secciones histológicas pudimos observar que estas zonas presentaban proliferación celular (callo) derivado del parénquima esponjoso (Fig. 25), esto mismo ha sido documentado por diversos autores (Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996; Menéndez y de García, 1997; Quiroz, *et. al.*, 2002); al hacer un corte en el tejido, las células cercanas a esta zona reaccionarán primero y proliferan para crear una especie de barrera de protección.

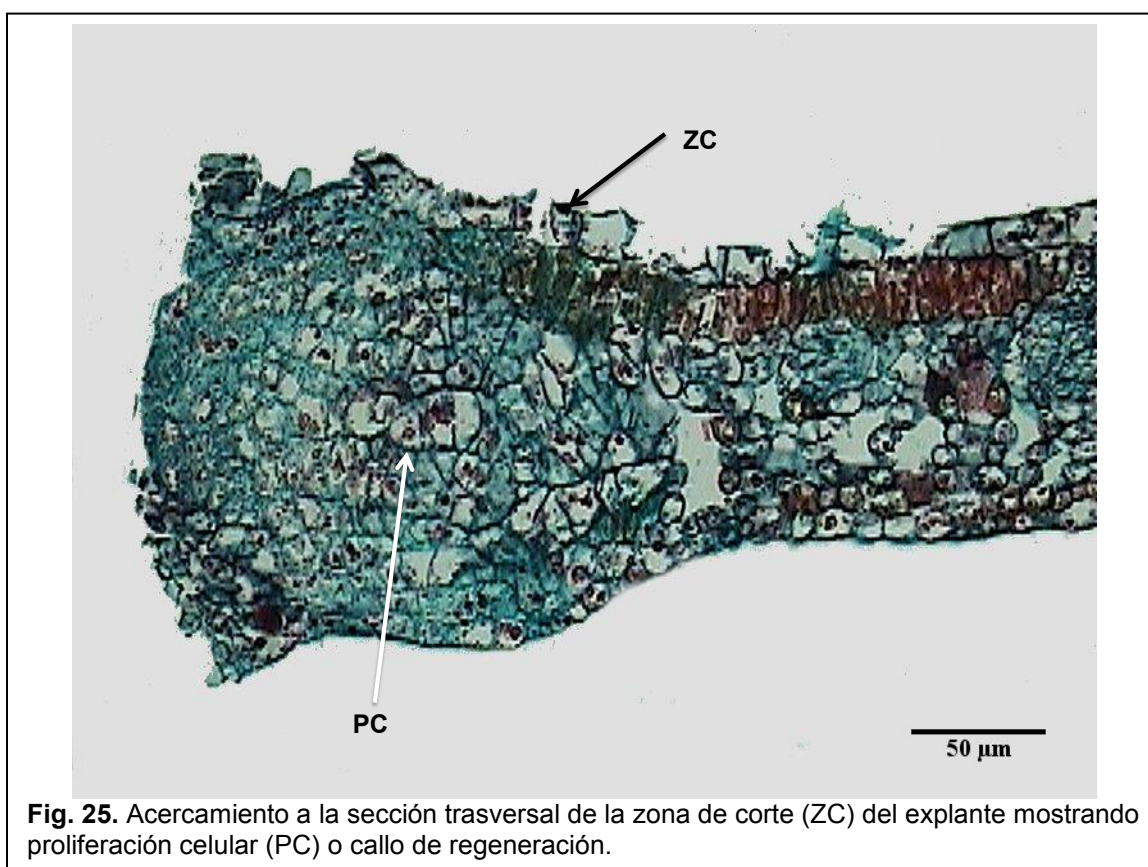


Fig. 25. Acercamiento a la sección transversal de la zona de corte (ZC) del explante mostrando proliferación celular (PC) o callo de regeneración.

Como mencionamos anteriormente, después de un mes en incubación los explantes se veían engrosados. Al observar la sección histológica pudimos notar que el parénquima esponjoso perdió su estructura, los nueve estratos que lo conforman ya no estaban delimitados ya que las células se desordenaron, ya no estaban compactas y había muchos espacios intercelulares. En esta etapa, los otros estratos celulares (epidermis y parénquima en empalizada) conservaron su organización inicial (Fig. 26).

Esta misma respuesta se observó en *C. arabica* en donde se menciona que la primera respuesta de cambio y proliferación celular se daba en el mesófilo a nivel del parénquima esponjoso, también se reporta en este estudio que la división de la células epidérmicas nunca sucedió (Michaux, *et al.*, 1987; Menéndez y de García, 1997).

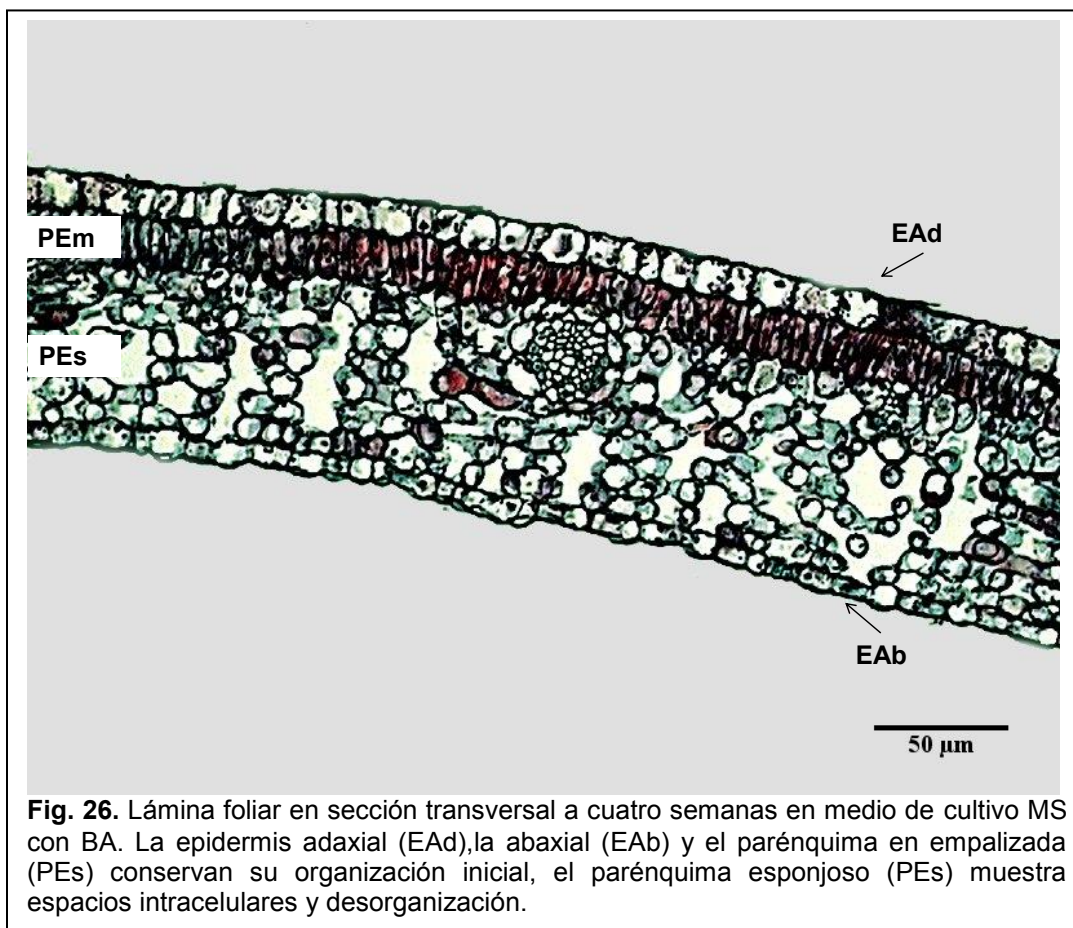


Fig. 26. Lámina foliar en sección transversal a cuatro semanas en medio de cultivo MS con BA. La epidermis adaxial (EAd), la abaxial (EAb) y el parénquima en empalizada (PEs) conservan su organización inicial, el parénquima esponjoso (PEm) muestra espacios intracelulares y desorganización.

Las secciones histológicas de los explantes de hoja en esta etapa mostraron que en el parénquima esponjoso había cúmulos de células con una anatomía diferente a la otras que habían a su alrededor (Fig. 26 y 27). Estas células estaban compactas formando una masa semicircular, aislada de las demás células parenquimáticas.

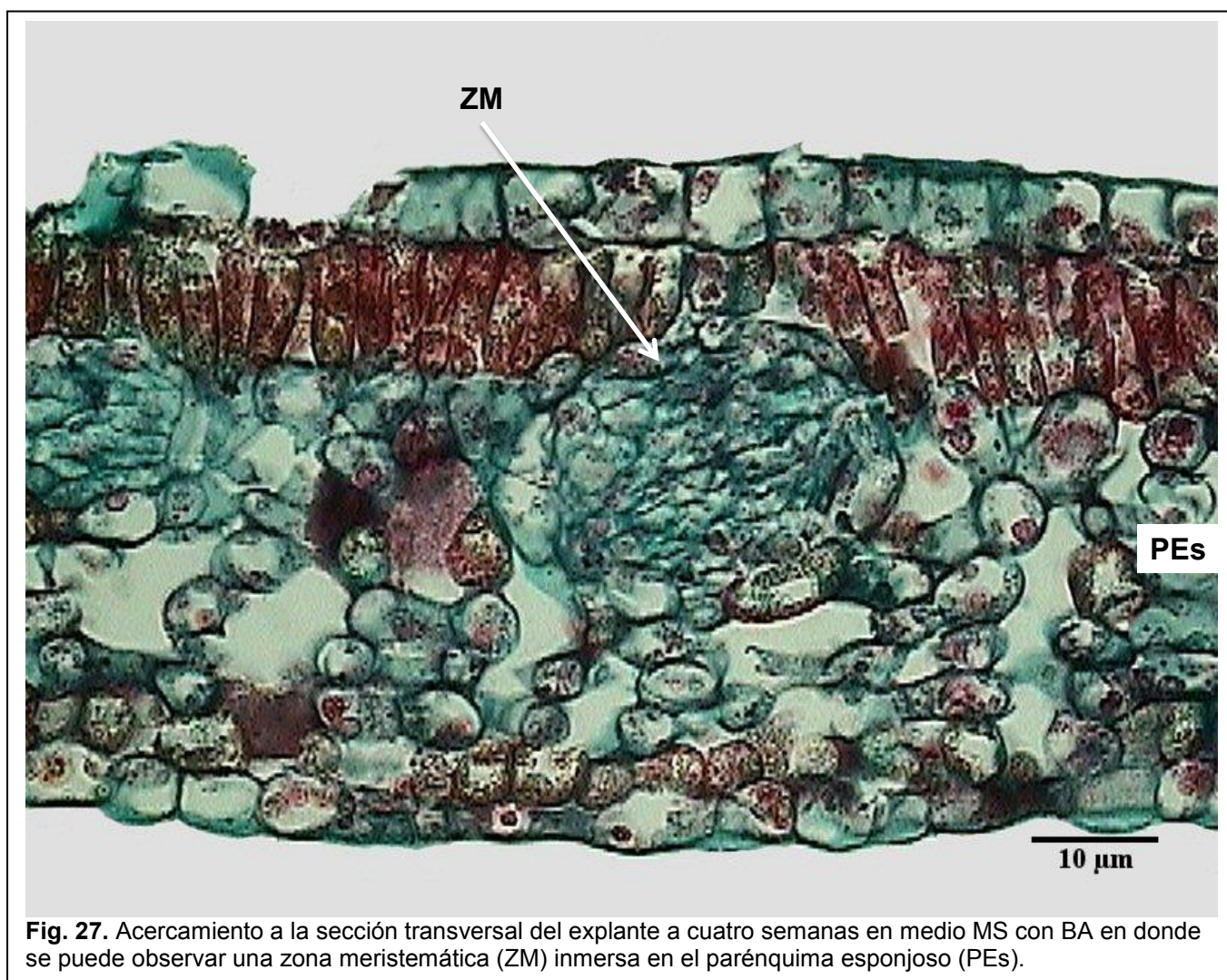


Fig. 27. Acercamiento a la sección transversal del explante a cuatro semanas en medio MS con BA en donde se puede observar una zona meristemática (ZM) inmersa en el parénquima esponjoso (PEs).

A esta masa se le denominó zona meristématica, las células muestran diferencias marcadas con las que se encontraban a su alrededor, siendo isodiamétricas, compactas y con un núcleo prominente con relación al tamaño núcleo-célula (Fig. 27).

Zonas parecidas a éstas ya han sido reportadas en diversas especies, incluyendo a *C. arabica* y *C. canephora*, los autores las han denominado como cúmulos, agregados o masas proembriogénicas. Éstas se caracterizan por estar compuestas de células pequeñas, con alta tasa de división celular, isodiamétricas, con citoplasma denso, núcleos prominentes y paredes celulares delgadas (Williams & Maheswaran, 1986; Mo y Von Arnold, 1991; Touchet, *et. al.*, 1991; Berthouly & Michaux-Ferriere, 1996; Menéndez y de García, 1997). A su vez, se ha reportado que las células proembriogénicas son ricas en almidón, que poseen vacuolas pequeñas y que estos cúmulos dan origen a embriones somáticos (Menéndez y de García, 1997).

Pasado el periodo de incubación, a las ocho semanas, en donde se disminuyó la concentración de BA se pudo observar cambios estructurales. La lámina conservó la misma estructura que a las cuatro semanas, con la epidermis adaxial y abaxial y el parénquima empalizada sin cambios en su organización, pero la proliferación en las zonas de corte aumentó (Fig. 28).

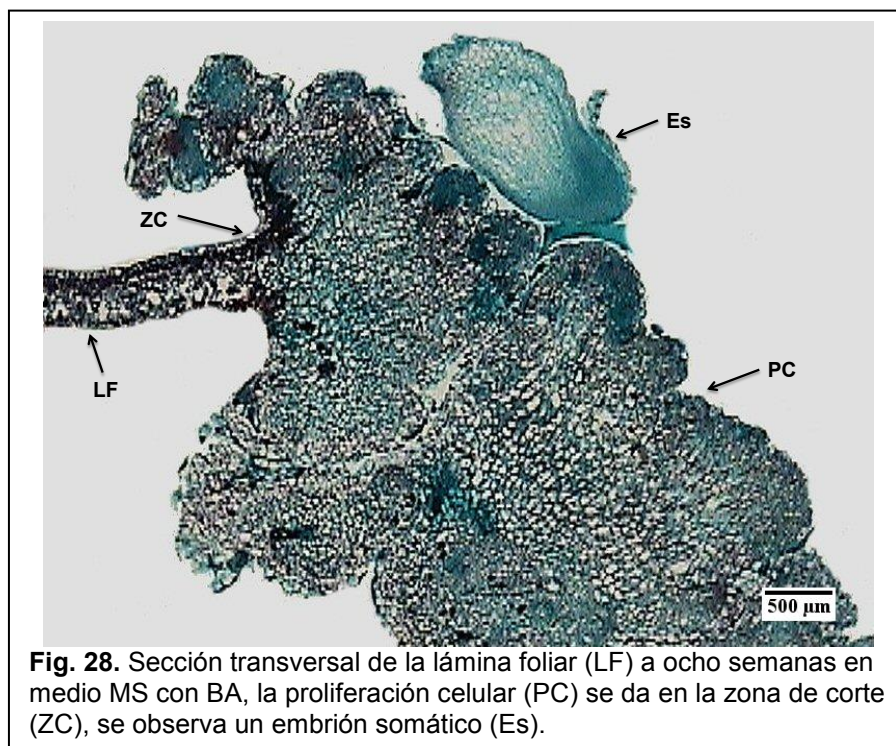


Fig. 28. Sección transversal de la lámina foliar (LF) a ocho semanas en medio MS con BA, la proliferación celular (PC) se da en la zona de corte (ZC), se observa un embrión somático (Es).

También se pudieron observar estructuras ovoides, delimitadas por un estrato de células y con alto contenido celular, el que se caracteriza por teñirse con el color rojo intenso que brinda la safranina; en la literatura estos se reportan con embriones globulares (Menéndez y de García, 1997; Quiroz, *et. al.* 2002). Estas estructuras vistas en las secciones histológicas presentaban un estrato de células que los delimitaban llamada protodermis (Fig. 29).

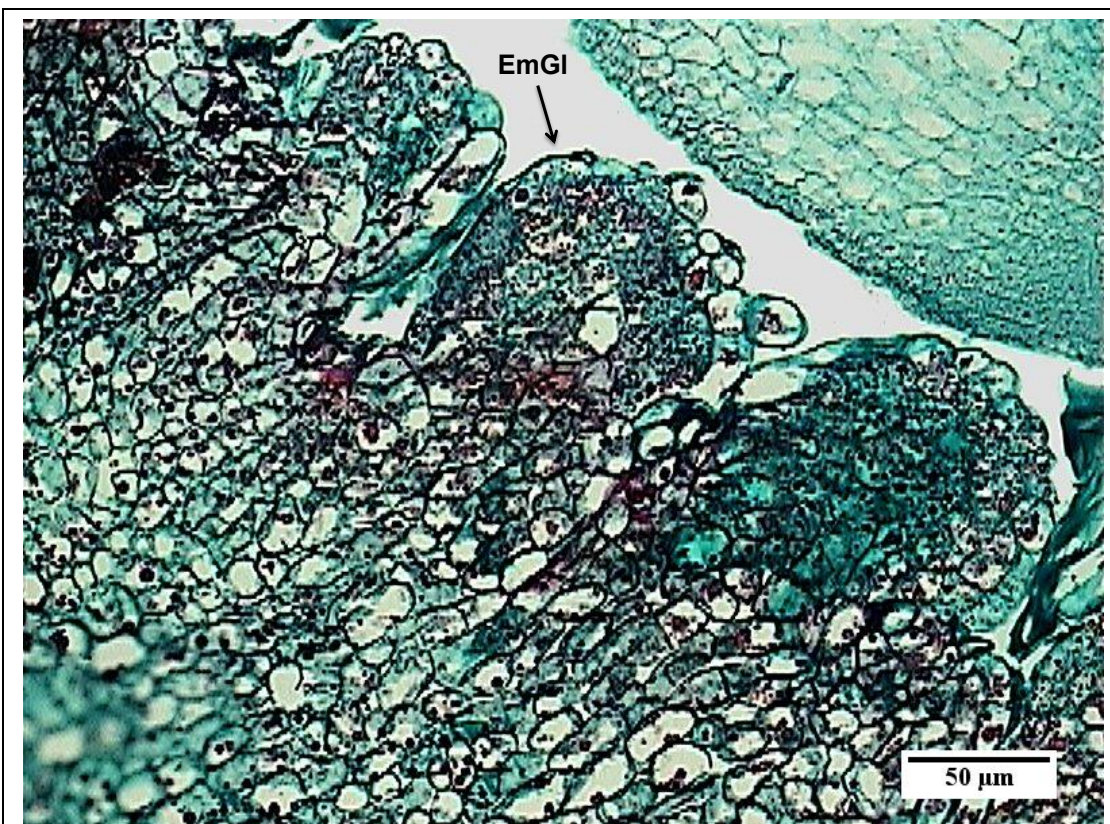


Fig. 29. Acercamiento a proliferación celular en donde se observan embriones en etapa globular (EmGI).

En cultivos celulares de zanahoria (*Daucus carota* L.), se reporta que la histogénesis de los embriones de etapa globular comienzan con la formación de una protodermis que recubre al embrión (Yeung, 1995).

Por otro lado, se observaron embriones en estadios más avanzados que nos muestran estructuras propias del desarrollo de los embriones cigóticos, se pudieron observar embriones con suspensor (Fig. 30).

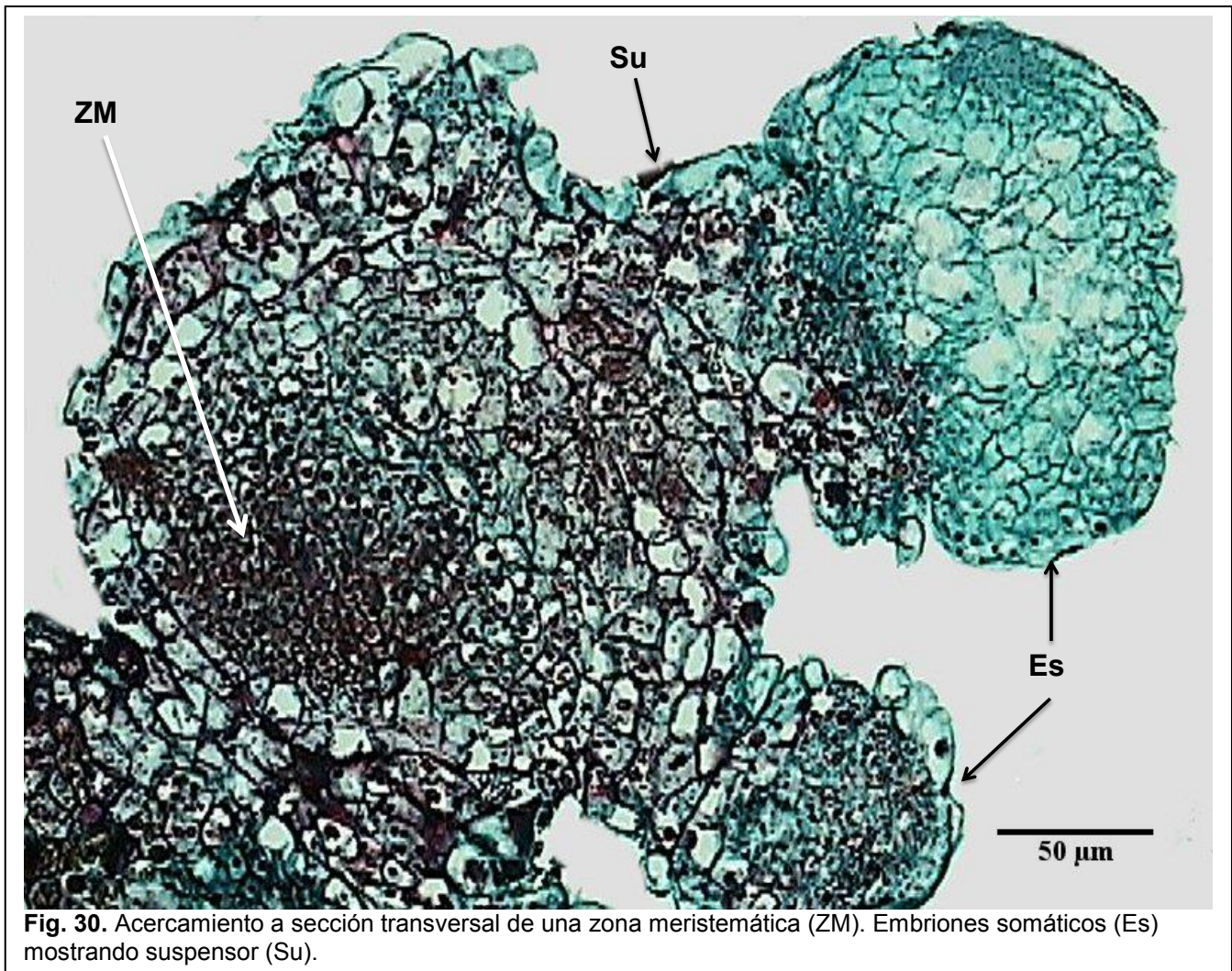


Fig. 30. Acercamiento a sección transversal de una zona meristemática (ZM). Embriones somáticos (Es) mostrando suspensor (Su).

El suspensor es una estructura que se desarrolla desde etapas muy tempranas en la embriogénesis cigótica. El cigoto se divide en dos células, la micropilar y la basal, esta última se divide de manera transversal para dar lugar al suspensor. Estudios realizados en *Phaseolus* sp. concluyen que el suspensor juega un papel muy activo en el desarrollo temprano del embrión y se ha sugerido que la función de esta estructura es de orientación de los embriones hacia su fuente de alimento, es decir, es un conducto de nutrientes para el desarrollo del embrión (Yeung y Sussex, 1979).

En esta misma sección se observó otra zona meristemática en donde se pudo ver de manera más clara a las células con su núcleo fuertemente teñido de rojo por su alta actividad mitótica (Fig. 30).

En otra sección se pudo observar un embrión de un tamaño mayor, probablemente de estadio acorazonado, en el cual se puede distinguir el procambium (Fig. 31.a) éste está conformado por células delgadas, rectangulares y alargadas (Fig. 31.b). El procambium es un tejido meristemático que aparece en etapas embrionarias, de éste se originan los tejidos conductores primarios que generarán, en etapas más avanzadas, el sistema vascular de la planta conformado por el xilema y el floema.

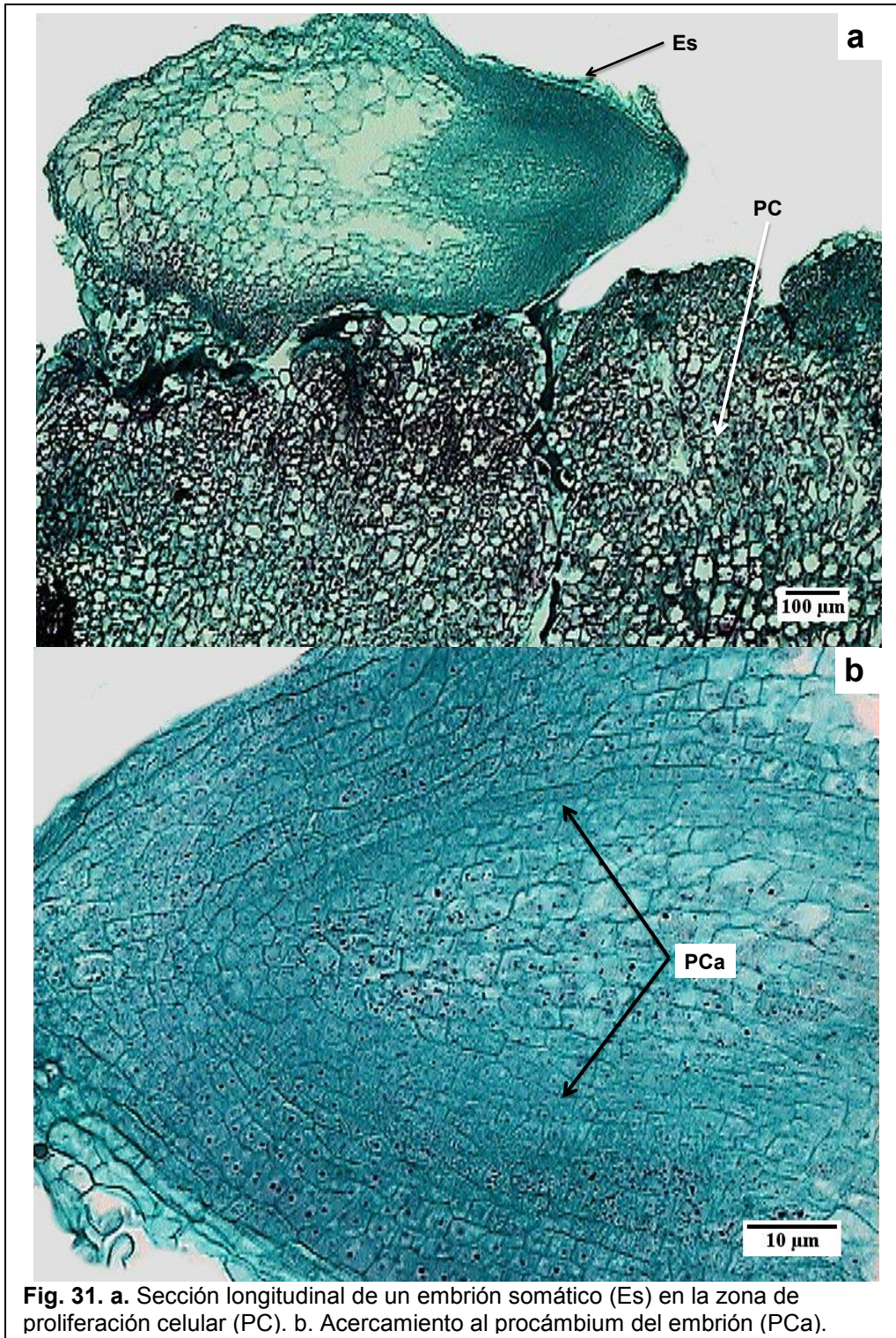
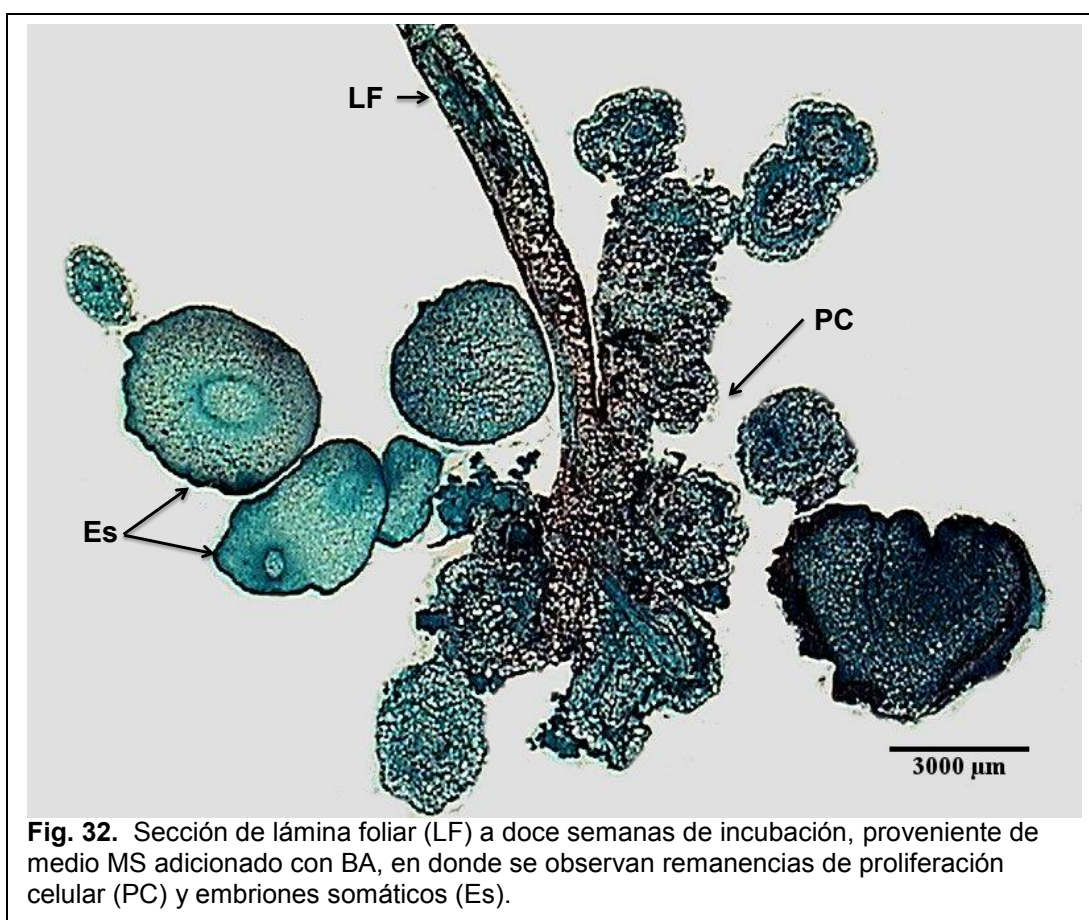


Fig. 31. a. Sección longitudinal de un embrión somático (Es) en la zona de proliferación celular (PC). **b.** Acercamiento al procámbium del embrión (PCa).

Después de doce semanas de cultivo, en la etapa de germinación y desarrollo, se pudo observar que la lámina siguió con la misma estructura. La proliferación celular en las zonas de las heridas disminuyó, quedando sólo remanencias (Fig. 32).



El estado de desarrollo de los embriones se pudo observar de manera más clara, teniendo embriones en etapas globulares hasta cotiledonares.

Por último, también se observó un embrión en etapa cotiledonar, el cual muestra que no existe conexión vascular con el tejido madre. En esta sección se pudieron observar las partes que conforman los embriones en esta etapa, como son el ápice (meristemo apical de brote), los cotiledones, y el procambium (Fig. 33).

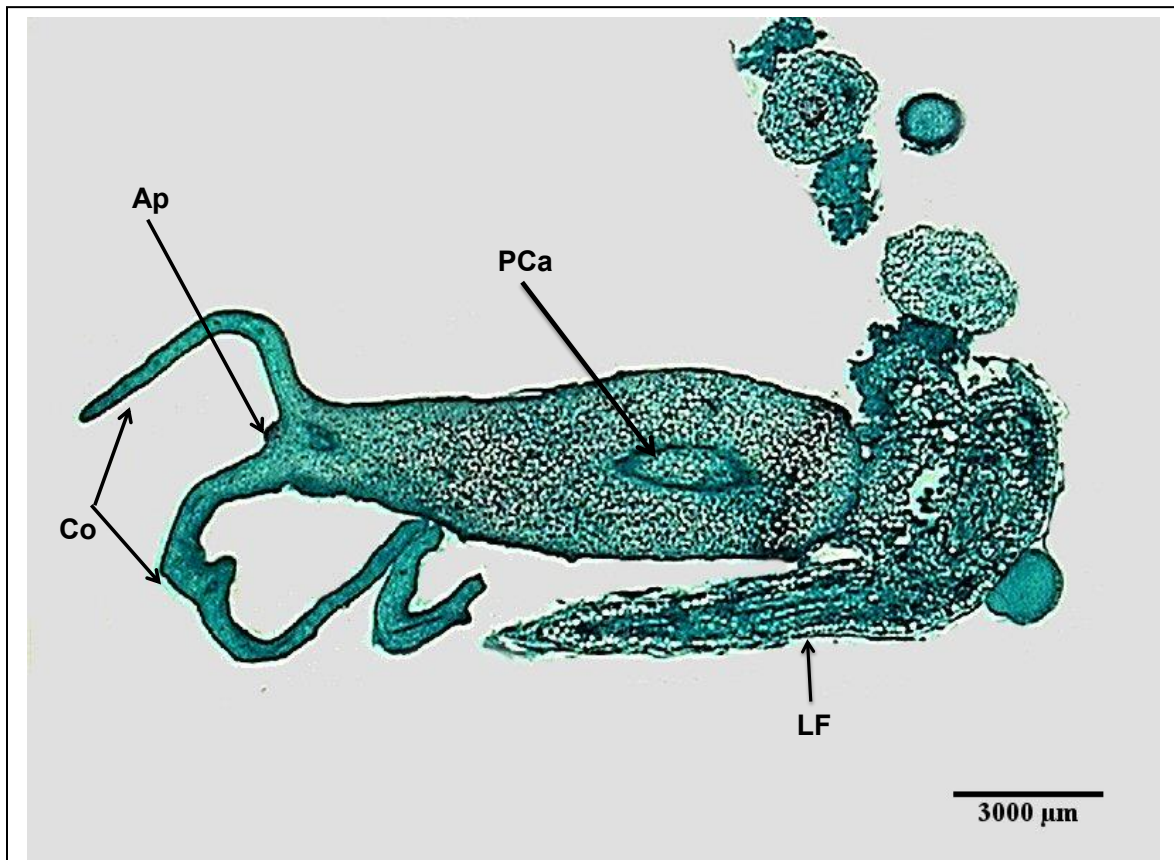


Fig. 33. Sección longitudinal de embrión somático en etapa cotiledonar, se observan los cotiledones (Co), el ápice (Ap), el procambium (PCa) y remanencias de la lámina (LF).

Como se mencionó anteriormente, es posible inducir la embriogénesis somática en ausencia de auxinas exógenas. Esto nos da un tipo de embriogénesis somática directa. Aunque en la zona de heridas se desarrolla callo, este sólo prolifera para crear una especie de cicatriz debido al corte realizado. En este medio de cultivo se pudo observar, lo que en la literatura se reportan como masas proembriogénicas, derivadas de parénquima esponjoso. La proliferación celular y las altas tasas de división se presentaron sólo en el parénquima esponjoso.

Aunque la mayoría de los estudios histológicos en café se centran en la embriogénesis somática indirecta, Quiroz y colaboradores (2002) realizaron un estudio histológico comparando la ESD con la ESI. En su estudio menciona que la ESD comienza en las células de parénquima esponjoso. Esto se debe a que las células que conforman este tejido tienen un bajo grado de diferenciación por lo cual pueden rediferenciarse con mayor facilidad. Como se analizó anteriormente, éstas son células que pueden tener acción de tipo meristemática, por lo tanto, sólo necesitaron el estímulo exógeno de citocininas para dar respuesta embriogénica.

También se pudo observar que los embriones que se desarrollaron tienen todas las características de los embriones cigóticos, es decir pasan por las fases proembrionarias, derivadas de las masas proembriogénicas, después se desarrolla el embrión globular que presenta un suspensor y su protodermis, característica de esta etapa, tal como los embriones cigóticos lo tienen. También se pudieron observar embriones en etapas de desarrollo más avanzadas como la etapa cotiledonaria que no tiene conexión con el tejido madre y regenera una plántula completa capaz de ser trasplantada exitosamente a condiciones *ex vitro*.

9.2.3. Inducción con 2,4-D y BA

Después de cuatro semanas de inducción en el medio con BA y 2,4-D en oscuridad se pudo observar que el parénquima esponjoso produjo callo (Fig.34). En esta sección, a diferencia de lo reportado por Söndahl y colaboradores (1979) se observó que el callo, aunque se originó principalmente del parénquima esponjoso, también derivó de algunas zonas del parénquima en empalizada.

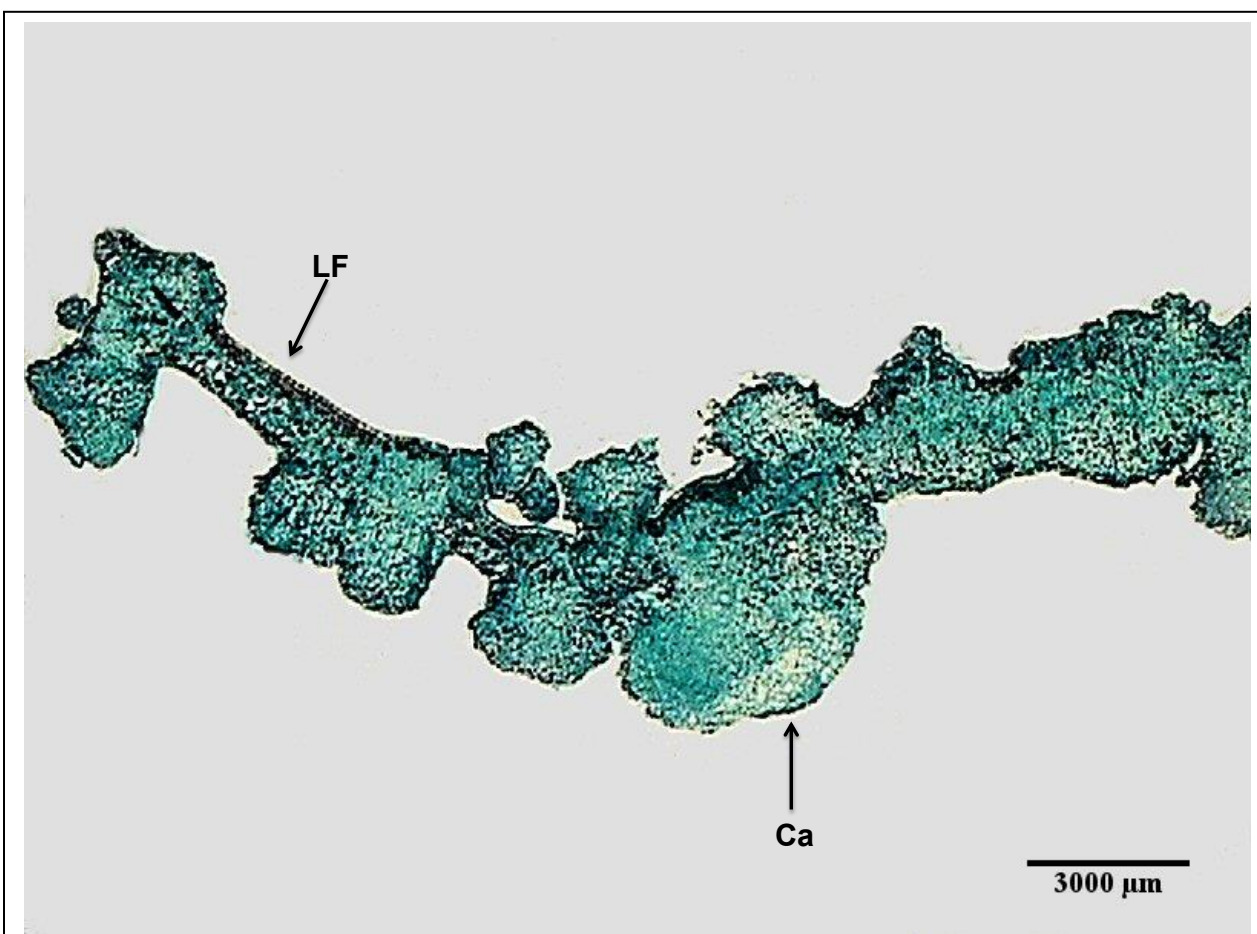


Fig. 34. Sección transversal de la lámina foliar (LF) a cuatro semanas de inducción en medio MS adicionado con BA y 2,4-D en donde el callo (Ca) proliferó en gran parte de la lámina quedando sólo remanencias de ésta.

A diferencia del tratamiento con BA, en donde la respuesta al estímulo sólo se presentó en la zona de corte del explante y en el parénquima esponjoso, en este tratamiento hubo proliferación de callo en diferentes sitios de la lámina; éste tuvo origen tanto en el parénquima esponjoso como en el parénquima empalizada, lo que causó la desconfiguración de éste último. Por otro lado, las epidermis, en ninguno de los tratamientos se desdiferenciaron, pero en este tratamiento, algunas zonas se rompieron a causa de la proliferación del callo y la presión que éste ejerció en la lámina (Fig. 34).

En la zona de la vena media se pudo observar que todo el tejido de parénquima de la periferia formó callo con excepción del xilema. Al xilema, como se mencionó anteriormente, lo constituyen células que han engrosado su pared y perdido sus organelos para formar un sistema de conducción. Estas células están muertas por lo cual es normal que no hayan respondido al estímulo *in vitro* (Fig. 35. a y b).

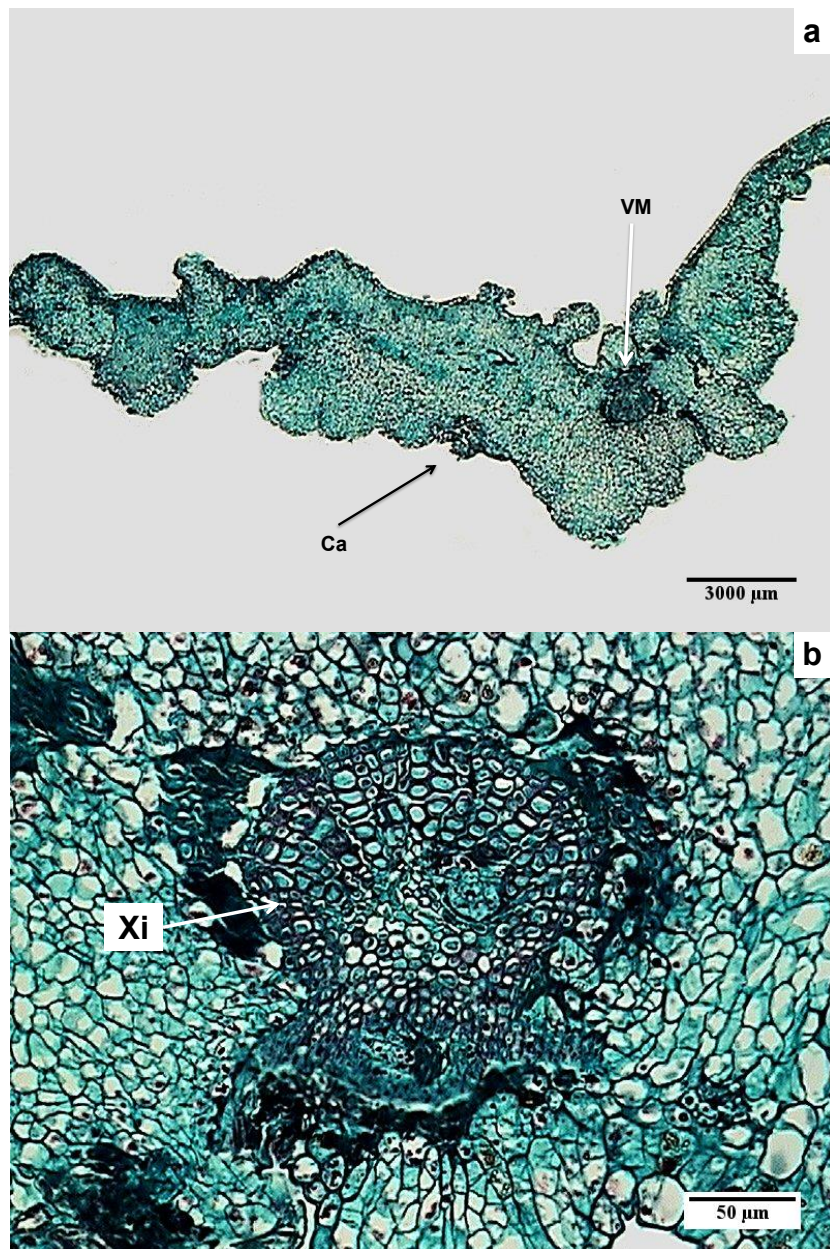


Fig. 35. a. Sección de la lámina de hoja mostrando proliferación de callo (Ca) en todos los estratos celulares excepto en vena media (VM). **b.** Acercamiento a vena media mostrando que no se hubieron cambios estructurales en el xilema (Xi).

Este medio de cultivo con 2,4-D y BA, tuvo como respuesta gran proliferación de callo dando como resultado una embriogénesis somática de tipo indirecta.

Diversos estudios hablan sobre la inducción de la embriogénesis somática y retoman la importancia de los RCV como mediador de las respuestas que se obtendrán en el cultivo *in vitro* (Raemakers, *et. al.* 1995; Thomas y Jiménez, 2005; George, *et. al.* 2008; Rose, *et. al.* 2010).

Ha sido ampliamente reportado que los RCV más utilizados en la inducción de la embriogénesis somática son las auxinas y citocininas, ya que trabajan en conjunto para regular el ciclo celular y la división celular, siendo estos dos factores importantes para la iniciación de la ES (Thomas y Jiménez, 2005).

Aunque hemos mencionado anteriormente que se ha logrado inducir embriogénesis somática directa utilizando sólo citocininas, para el desarrollo de callo embriogénico, la adición de auxinas exógenas es esencial (Halperin y Wetherell, 1965; Söndahl, *et. al.* 1977). En café se ha reportado que el uso de 2,4-D en combinación con diferentes citocininas, incrementa en gran medida la proliferación de callo (Santana, *et. al.* 2007), esto lo pudimos observar en nuestros análisis macroscópicos y microscópicos, ya que desde las primeras semanas el callo proliferó en todo el tejido dejando sólo remanencias del explante foliar.

9.2.4. Corte de callo embriogénico

El análisis histológico del callo embriogénico se realizó a partir de callos establecidos previamente que estaban en un medio de cultivo sin auxinas y que tenían alrededor de 8 meses desde la inducción en condiciones *in vitro* proveniente del medio MS adicionado con 2,4-D y BA.

En las secciones histológicas de callo, fueron visibles todas las etapas de desarrollo por las que pasa un embrión cigótico, por lo cual el callo también era asincrónico (Fig. 36).

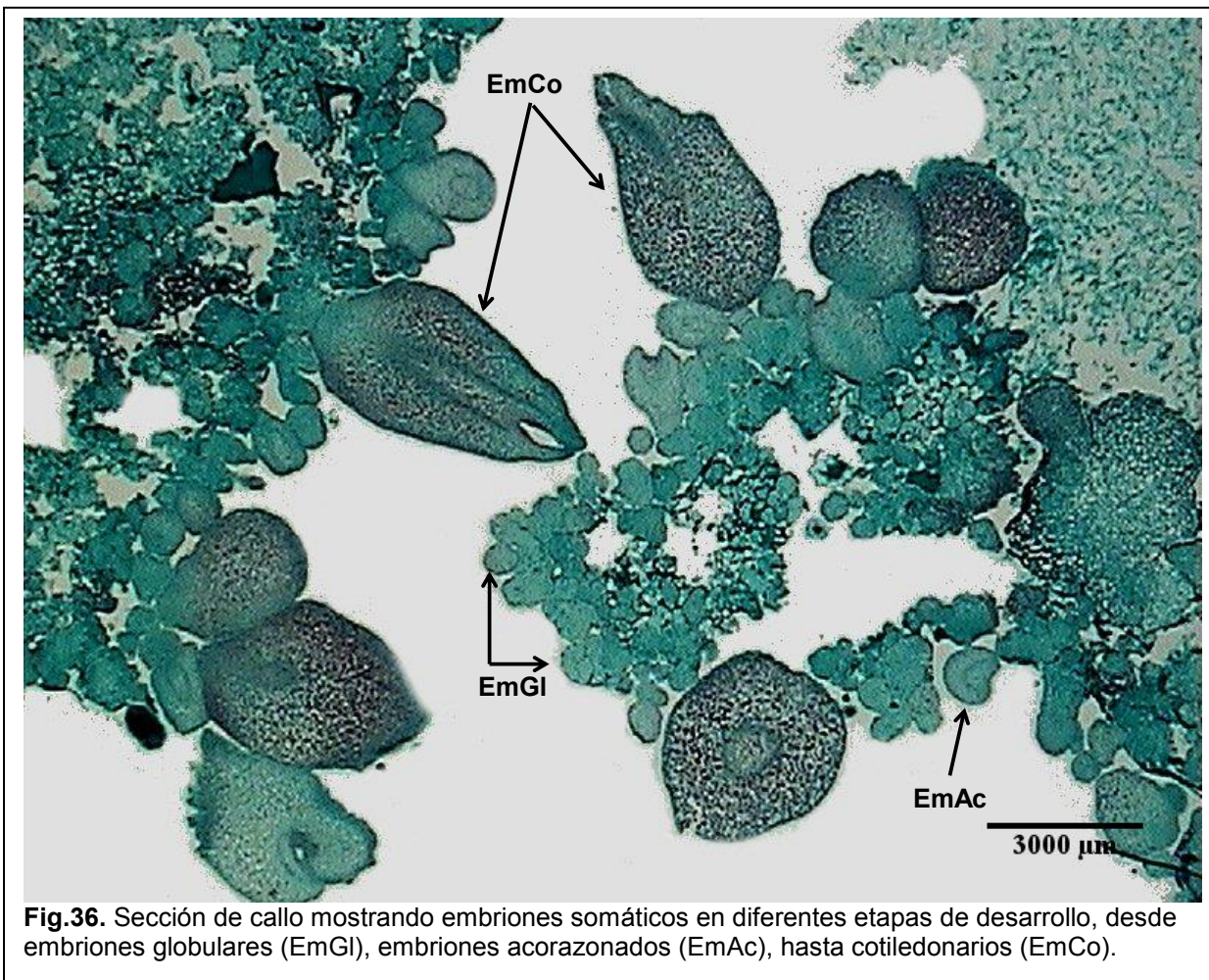


Fig.36. Sección de callo mostrando embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo, desde embriones globulares (EmGI), embriones acorazonados (EmAc), hasta cotiledonarios (EmCo).

En algunas zonas se pudieron identificar varios cúmulos de células embriogénicas (Fig. 37), al realizar un acercamiento se pudo observar con detalle las características éstas. Se trataba de células pequeñas, a comparación con las de los alrededores, también era claramente visible su núcleo y se pudo observar una gran cantidad de contenido celular que se identifica con la coloración rojo intenso proporcionada por la safranina.

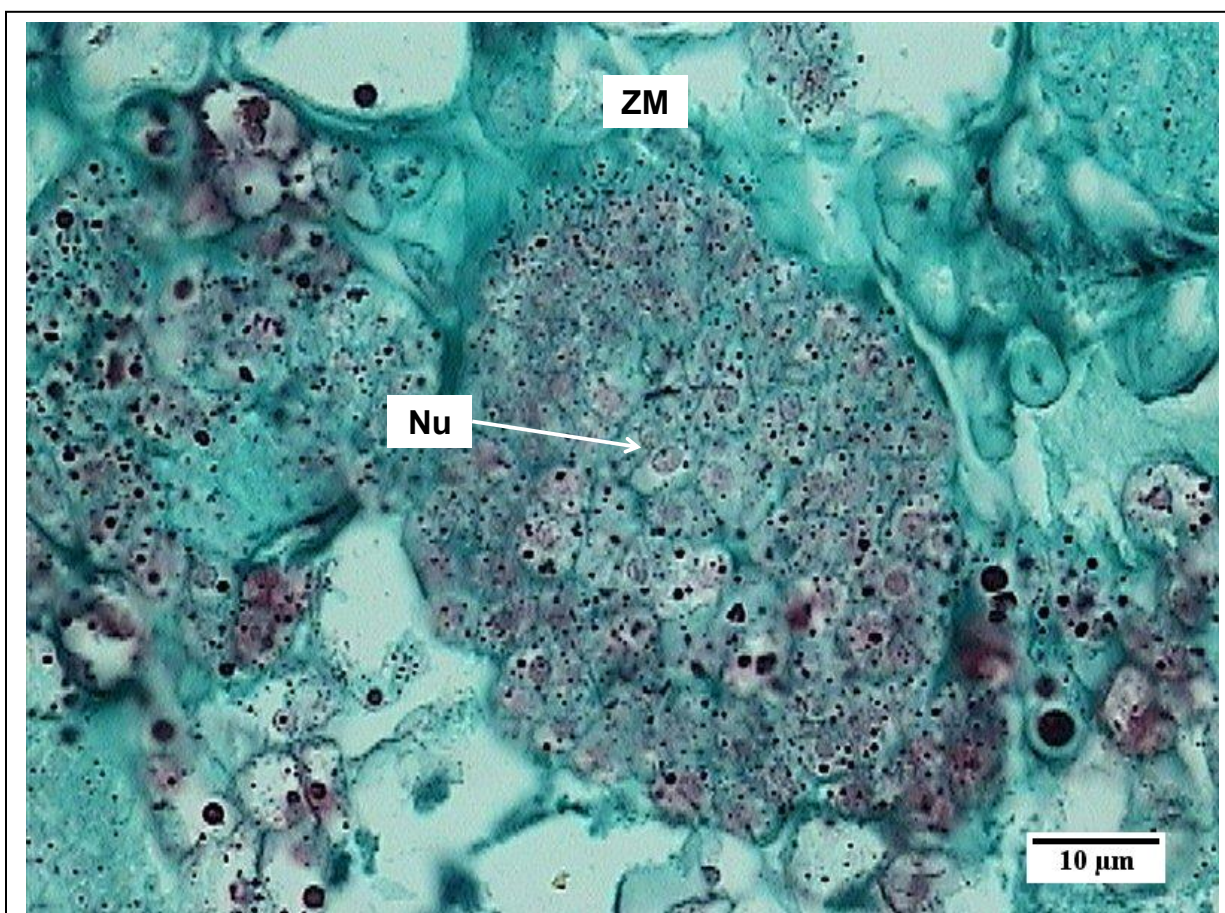


Fig. 37. Acercamiento a zona meristemática (ZM) en donde se observan las células con núcleos (Nu) prominentes.

Los reportes de embriogénesis somática en diferentes especies describen a estas masas como proembriogénicas ya que están compuestas de células con un núcleo y nucléolo prominente, forma isodiamétrica, citoplasma denso, pared celular delgada y frecuentemente se encuentran acompañadas de células adyacentes con abundantes gránulos de almidón (Menéndez y de García, 1997; Quiroz *et al*, 2002). Esto fue lo que se vio en el acercamiento de las masas proembriogénicas encontradas en el callo (Fig. 37). Estas masas o agregados proembriogénicos son los que dan origen a los embriones somáticos (Menéndez y de García, 1997).

En algunas zonas del callo, se localizaron etapas de desarrollo iniciales de la formación de embriones (Fig. 38). Una de las células proembriogénicas, de las masas anteriormente descritas, comienza a pasar por una serie de divisiones mitóticas. En el corte que se realizó se pudieron identificar proembriones en etapas de dos y cuatro células delimitadas por una delgada pared (Fig.38).

Debido a que se identificaron proembriones bicelulares se pudo definir que el origen de los embriones somáticos en *C. canephora* es unicelular, de igual manera como se ha reportado en la embriogénesis somática de *C. arabica* (Söndahl, *et al*, 1979; Michaux & Dublin, 1987; Quiroz *et al*, 2002). Esta célula proembriogénica se divide mitóticamente y comienza la formación del embrión somático.

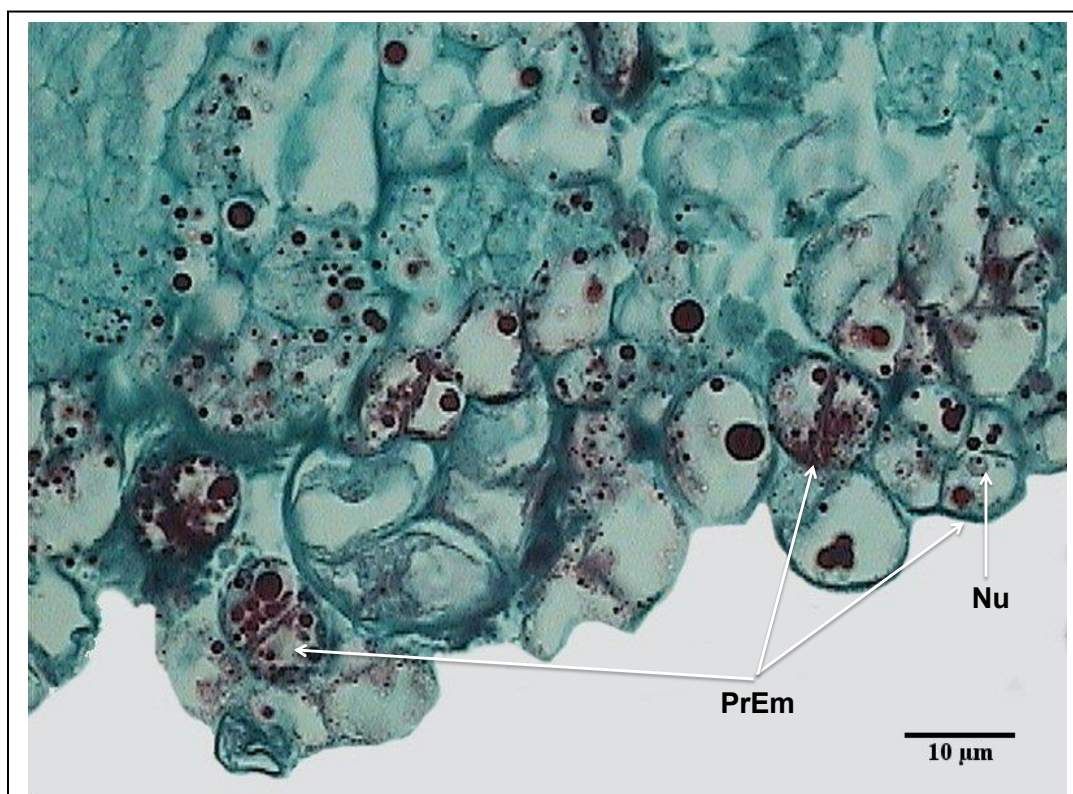


Fig. 38. Acercamiento a proembriones (PrEm) en etapa bicelular mostrando un núcleo (Nu) prominente.

Se sugiere que durante esta etapa de división celular, es en donde se establece la polaridad de los embriones ya que una célula se divide en dos, la que formará el suspensor y la que formará la parte aérea. Las auxinas juegan un papel importante en este proceso. Se reporta que es necesario tener niveles endógenos bajos para establecer la polaridad en los embriones (Merkle *et al*, 1995).

Las subsecuentes divisiones celulares formaron embriones somáticos en las diferentes etapas, primero la etapa globular que se pudo observar en el callo, estos embriones estaban delimitados por una protodermis, presentaban polaridad con una parte apical y una basal en donde se pudo identificar un suspensor (Fig. 39)

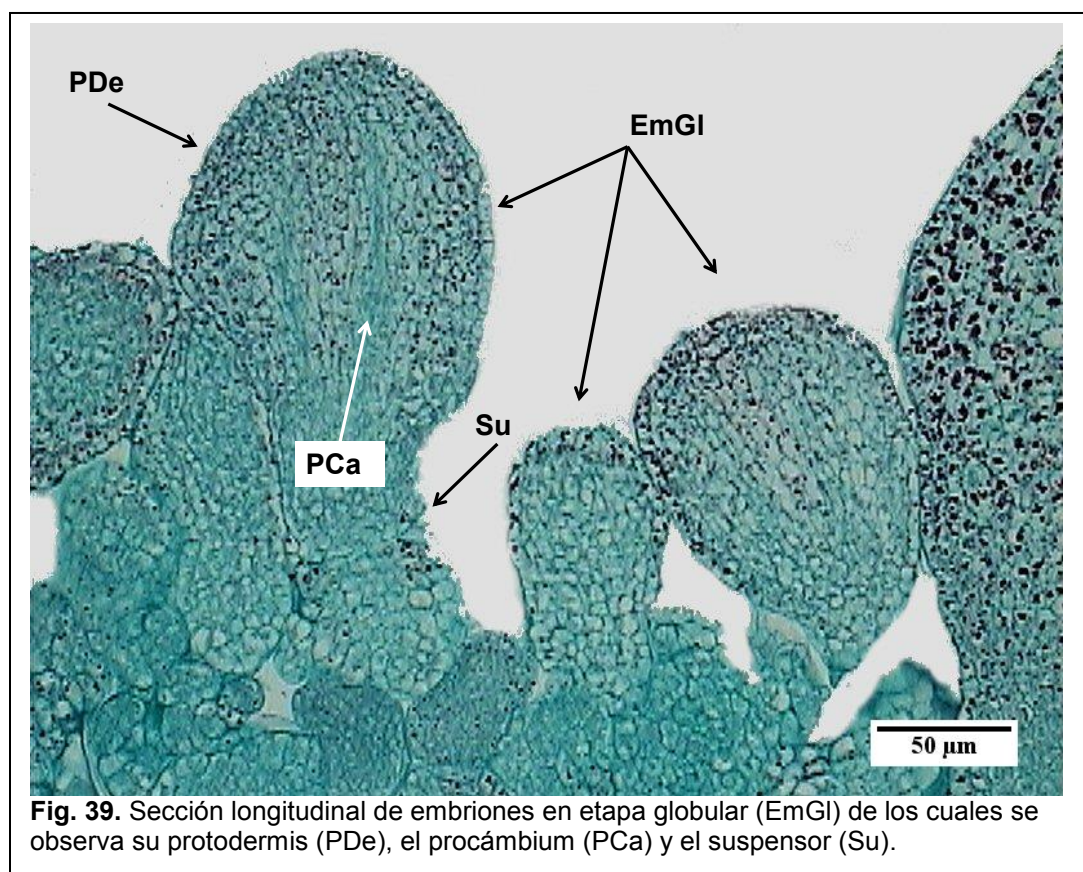
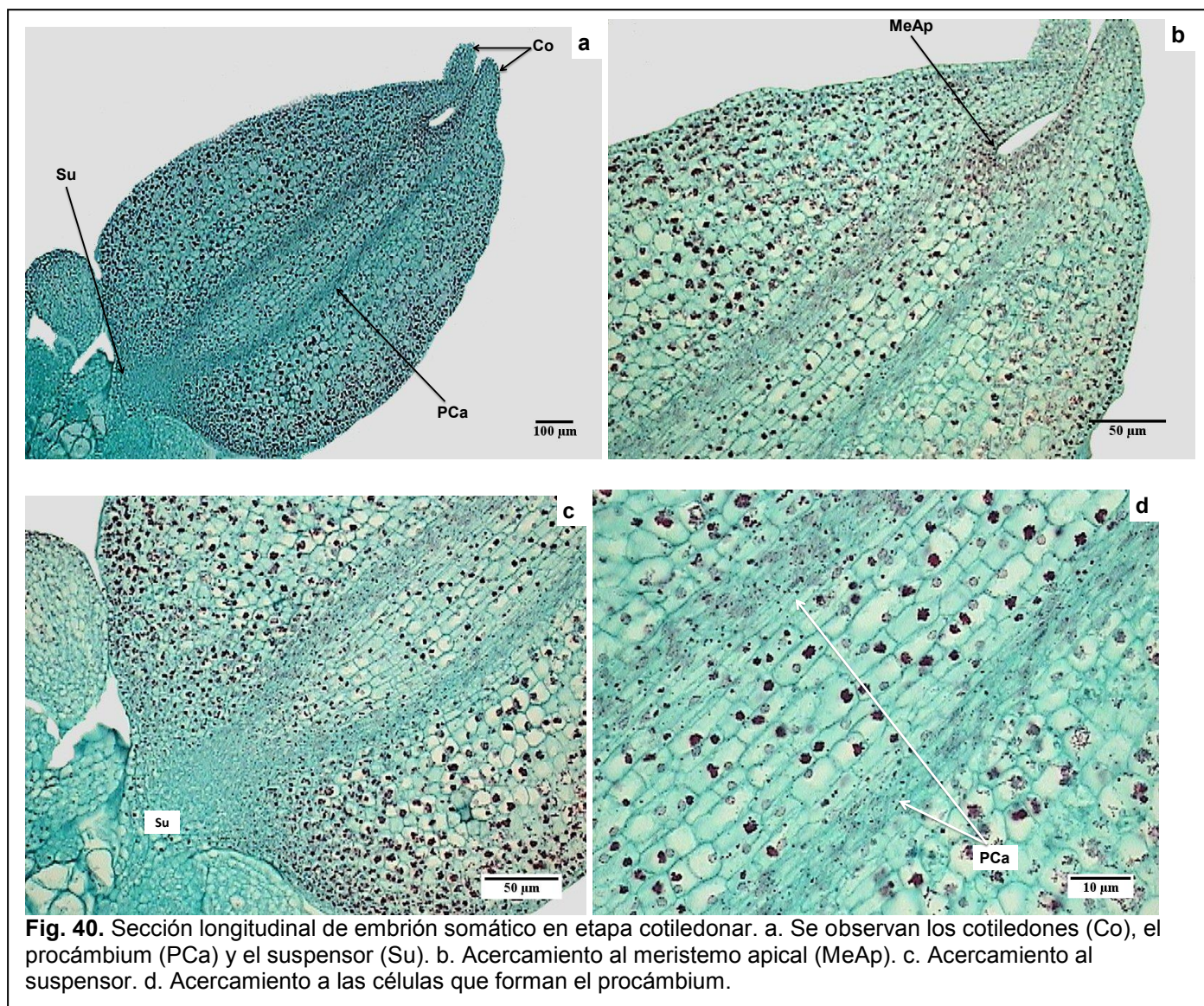


Fig. 39. Sección longitudinal de embriones en etapa globular (EmGI) de los cuales se observa su protodermis (PDe), el procámbium (PCa) y el suspensor (Su).

Los embriones continuaron con su histodiferenciación, los estadios más avanzados se pudieron identificar por el tamaño de los embriones y por el grado de desarrollo del procámbium y de los cotiledones. En los embriones, pudimos observar que el procambium se empieza a diferenciar desde etapas tempranas de desarrollo (Fig. 39) pero no está bien definido hasta que el embrión se encuentra en etapa torpedo y acorazonada.

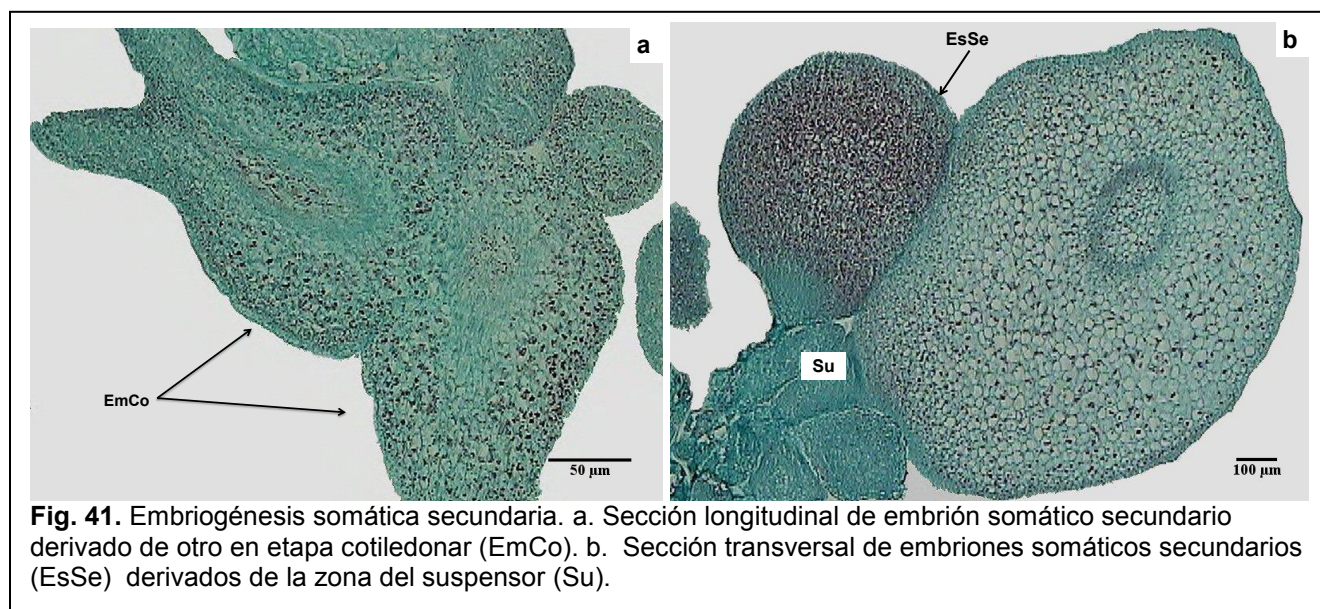
Los embriones en estadios más desarrollados presentan todas las características anatómicas de un embrión cigótico. En la sección longitudinal de un embrión somático en etapa cotiledonar (Fig. 40.a) se identificó la epidermis; el meristemo apical del brote en donde ya estaban diferenciados los cotiledones (Fig. 40.b); la parte basal en la cual se pudieron observar remanencias del suspensor (Fig. 40.c) y el procambium, que se encuentra en la zona central del embrión conformado por hileras de células delgadas y alargadas, paralelas al eje longitudinal del embrión (Fig. 40.d).

Los embriones en esta etapa ya están totalmente diferenciados, y forman plántulas completas, bien desarrolladas que al aclimatarlas presentan un porcentaje alto de supervivencia.



Otro fenómeno observado en el callo embriogénico fue la embriogénesis somática secundaria, el cual es un fenómeno en donde nuevos embriones somáticos se derivan de embriones somáticos ya preformados. Se reporta que, en general, este tipo de embriogénesis no necesita la presencia de reguladores de crecimiento en cultivos en donde la embriogénesis somática primaria se indujo con auxinas (Raemakers *et al*, 1994).

En el callo pudimos observar que la embriogénesis secundaria se derivó de la zona basal de los embriones somáticos, justo en la zona del suspensor (Fig. 41). En estudios de la embriogénesis somática, realizados con microscopía electrónica de barrido, se observó este mismo fenómeno, la zona basal de los embriones, en donde se encuentra el suspensor es en donde empiezan a emerger los embriones secundarios (Nakamura, *et. al.* 1992).



La embriogénesis somática indirecta tiene ventaja sobre la directa en tema de producción gran escala. Se ha reportado que la embriogénesis somática directa que se origina a partir de un solo paso, es decir, en un medio de cultivo con citocininas, produce embriones en menor tiempo con una alta tasa de germinación pero por otro lado, cuando se induce la embriogénesis en protocolos de dos paso, con la mezcla de citocininas y auxinas, se tiene mayor tasa de producción de embriones, lo cual sirve para llevar a cabo una producción a gran escala, a su vez, en algunos genotipos es la única manera de inducir la embriogénesis somática (Boxtel y Berthouly, 1996).

10. CONCLUSIONES

- Se logró inducir la embriogénesis somática en dos medios de cultivo MS, uno adicionado con BA y otro con la mezcla de 2,4-D y BA.
- La hoja de café es un órgano compuesto por diferentes estratos celulares, los cuales tienen diferentes grados de diferenciación lo que definió las respuestas que se observaron.
- Se indujo embriogénesis somática directa con el uso de BA como único RCV, esto debido a la selección de explantes jóvenes que fueron tomados por la mañana lo que favoreció la producción de embriones en ausencia de auxinas exógenas.
- Se observó que en el tratamiento con BA el único tejido que respondió al estímulo fue el parénquima esponjoso, esto debido a su bajo nivel de especialización, dicha respuesta sólo se llevó a cabo en la zona de corte del explante.
- En el tratamiento con BA el tejido dérmico, el parénquima empalizada y el tejido vascular nunca perdieron su organización inicial.
- El parénquima esponjoso desarrolló masas proembriogénicas que posteriormente desarrollaron embriones somáticos.
- El inicio de la formación de proembriones se pudo observar debido a la presencia de una protodermis que delimitaba a pequeñas protuberancias formadas en el explante.
- La presencia de auxinas exógenas favoreció la formación de callo en casi todo el explante en las primeras cuatro semanas de cultivo.

- En el medio con 2,4-D y BA hubo formación de callo a partir del parénquima esponjoso y del parénquima en empalizada, las epidermis se rompieron debido a la presión ejercida por el callo en proliferación.
- Todo el explante proliferó en callo, el xilema de la vena media fue el único tejido que no respondió al estímulo *in vitro* debido a que está compuesto por células muertas.
- La eliminación de auxinas en el subcultivo del medio con 2,4-D y BA tuvo como respuesta la regeneración de los embriones.
- El callo presentó zonas proembriónicas con células pequeñas, isodiamétricas, con alta tasa de división celular, citoplasma denso, y paredes delgadas que dieron origen a los embriones somáticos.
- En el tratamiento con BA/2,4-D se pudo observar embriogénesis somática secundaria, la cual derivaba de la zona basal en donde se encuentra el suspensor.
- Se obtuvieron y se identificaron las diferentes etapas de desarrollo de los embriones somáticos en ambos tratamientos. Tanto en la embriogénesis somática directa como en la indirecta las etapas de desarrollo se pudieron observar al mismo tiempo, esto fue posible porque la embriogénesis fue asincrónica.
- Los embriones regenerados en ambos tratamientos no tienen conexión vascular con el tejido madre.
- En ambos tratamientos, los embriones pasan por las mismas fases de desarrollo que los embriones cigóticos.

- Aunque en la embriogénesis somática derivada del tratamiento con BA (directa) se forman embriones somáticos a partir del segundo mes en medio de cultivo y en el tratamiento de BA y 2,4-D lleva más tiempo, éste último tiene una producción de embriones somáticos mayor.
- La embriogénesis inducida con BA y 2,4-D puede presentar ventajas sobre la que se indujo sólo con BA ya que la producción de embriones es mayor, están en constante formación y desarrollo y hay embriogénesis somática secundaria lo cual nos permite hacer propagación a gran escala.

11. LITERATURA CITADA

Abdelnour, E. & J. Escalant. 1994. Conceptos básicos el cultivo de tejidos vegetales. CATIE. Pp. 21-26.

AGROBIOTECNOLOGÍA, 2010. Visto en:

<http://www.unesco.org/unuoe/unuesp/centros/biolac.htm>

Berkel, K.; R. J. de Boer; B. Scheres & K. T Tusscher. 2013. “Polar auxine transport: models and mechanisms” *Development* (140): 2253-2268.

Berthouly, M. & M. Michaux-Ferriere. 1996. “High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution” 44: 169-176.

Boxtel, J. & M. Berthouly. 1996. “High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves”. Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Cultured*. 44: 7-17.

Café de Colombia. Visto en:

http://www.cafedecolombia.com/particulares/es/sobre_el_cafe/el_cafe/el_arbol_y_el_entorno/ Octubre, 2014.

Cárdenas, I., 2007. Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (*Coffea arabica* L) del CATIE. Tesis de posgrado. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Pp. 6-16.

Dickison, C. 2000. *Integrative Plant Anatomy*. Harcourt Academic Press. USA. Pp. 86, 121.

Dublin, P. 1981. “Embryogenèse somatique directe sur fragments de feuilles de caféier Arabusta.”. *Café Cacao Thé*. XXVIII: 231–244.

Dublin, P. 1984. “Techniques de reproduction végétative in vitro et amélioration génétique chez les caféiers cultivés”. *Café Cacao Thé*. XXVIII: 231–244.

Ducos, J; C. Lambot & V. Pétiard. 2007. “Bioreactors for Coffee Mass Propagation by Somatic Embryogenesis” *International Journal of Plant Developmental Biology in Global Science Books* 1(1): 1-12.

- Duicela, A; J. García; R. Corral; D. Farfán; F. Fernández. 2005.** “Calidad física y organoléptica de los cafés robustas ecuatorianos” Manta, EC. COFENAC, ULTRAMARES EL CAFÉ, GTZ. 71 p.
- Esau, K. 1976.** Anatomía Vegetal. Ed. Omega, Barcelona.
- Etienne, H.; E. Dechamp; D. Barry-Etinne & B. Bertrand. 2006.** “Bioreactors in coffee micropropagation”. Plant Physiology. 18(1) 45-54.
- Fuentes, B. 2012.** “Análisis del Mercado Mexicano del Café: un Modelo Dinámico”. Tesis Profesional de Maestría en Ciencias. Posgrado de Socioeconomía, Estadística e Informática. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México.
- George, E. et. al. 2008.** “Somatic Embryogenesis” Plant Propagation by Tissue Culture. 335-354.
- Halperin, W. & D. Wetherell. 1965.** “Ammonium requirement for embryogenesis *in vitro*” Nature. 205:519-520.
- ICO. 2013.** International Coffee Organization / OIC. Organización Internacional del Café. Ver: www.ico.org.
- Jordan, M. & J. Casaretto. 2006.** “Hormonas y reguladores de crecimiento: Auxinas, Giberelinas y Citocininas”. Fisiología Vegetal. 3-28.
- Köhler, F. 1914.** Köhler's Medizinal-Pflanzen in naturgetreuen Abbildungen mit kurz erläuterndem. Pp.16.
- Litz, Richard E.; Jarret, R.L. 1991.** Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: Embriogénesis somática y organogénesis. In: Roca, William M.; Mroginski, Luis A. (eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. Pp. 143-172.
- López, C.; J. Márquez & G. Murguía. 2005.** “Técnicas para el estudio del desarrollo en Angiospermas” 2ª Edición. Las Prensas de Ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. México D.F. Pp. 19-20, 23, 37-38, 59-60.
- Menéndez-Yuffá, A.; de Garcia, E. G. 1997.** Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee “Catimor.” Protoplasma 199:208–214; 1997.

- Merkle, S.; W. Parrott & B. Flinn. 1995.** “Morphogenic Aspects of Somatic Embryogenesis”. In: Thorpe, T (ed). “*In vitro* Embryogenesis in Plants”. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Países Bajos. Pp. 156- 187
- Michaux-Ferrière, N. & P. Dublin. 1987.** “Embryogenèse somatique chez *Coffea arabica* induction et développement des cellules embryogènes”. Paris; In: 12è Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Association Scientifique Internationale du Café. 418–425.
- Michaux-Ferrière N.; P. Dublin & J. Schwendiman. 1987.** “Étude histologique de l’embryogenèse somatique à partir d’explants foliaires de *Coffea arabica* L”. Café Cacao Thé 31:103–111.
- Michaux-Ferrière N.; D. Bieysse; D. Alvard & P. Dublin. 1989.** “Étude histologique del l’embryogenèse somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de géotypes différents”. Café Cacao Thé 33:207–217.
- Mo, L. H; Von Arnold, 1991.** “Origin and development of embryogenic cultures from seedlings of norway spruce (*Picea abies*)”. Journal Plant Physiology 138: 223-230.
- Molist, P. 2014.** “Atlas de histología vegetal y animal”. Disponible en:
http://mmegias.webs.uvigo.es/1-vegetal/guiana_v_inicio.php
- Montalvo, C. 2010.** “Técnica histológica”. Pp. 1-12
- Mora, N. 2008.** “Agrocadena de Café”. Ministerio de Agricultura y Ganadería Dirección Regional Huertar Norte.
(<http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/a00080.PDF>).
- Nakamura, T; T. Taniguchi & E. Maeda. 1992.** “Studies on Somatic Embryogenesis of Coffee by Scanning Electron Microscope. Jpn. J. Crop. Sci. 61(3): 476-486.
- Neuenschwander, B.; Baumann, T. W. 1992.** “A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*”. Plant Cell Rep. 10:608–612;
- Pardo, L.; Y. Álvarez; D. Barral & M. Farré. 2007.** “Cafeína: un nutriente, un fármaco, o una droga de abuso”. Adicciones. 19 (3): 225-238.

- Pérez, M.; R. Ramírez; H. Núñez & N. Ochoa. 1999.** “Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales”. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. Pp. 7-37, 57-65.
- Pierson, E.; A. Van Lammeren; J. Schel & G. Staritsky. 1983.** “*In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*”. *Protoplasma* 115:208–216.
- Priyono; B. Florin; M. Rigoreau; J. Ducos; U. Sumirat; S. Mawardi; C. Lambot; P. Broun; V. Pétiard; T. Wahyudi & C. Dominique. 2010.** “Somatic embryogenesis and vegetative cutting capacity are under distinct genetic control in *Coffea canephora* Pierre”. *Plant Cell Reports*. 29 (4):343–357.
- Quist, 2015.** “Café colombiano sin aroma productivo. Visto en: <http://www.puntocerodigital.com/?p=255>
- Quiroz, F.; C. Fuentes; R. Rojas & V. Loyola. 2002.** “Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*”. *Plant Cell Reports* 20:1141–1149.
- Raemakers C. J.J.M; E. Jacobsen & R. G. F. Visser. 1995.** Secondary Somatic Embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.
- Rose, R; F. Mantiri; S. Kurdyukov; S-K. Chen; X-D. Wang; K. Nolan & M. Sheahan. 2010.** “Developmental Biology of Somatic Embryogenesis” In. Pua, E & M. Davey. *Plant Developmental Biology. Biotechnological Perspectives*. 2:3-25.
- Santana B.; R. Rojas; R. Galaz; J. Ku; J. Mijangos; L. Gutiérrez; A. Canto; F. Quiroz & V. Loyola. 2007.** “Advances in coffee tissue culture and its practical applications”. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 43 (6):507-520.
- Sandoval, Z; A. Rojas; C. Guzmán; L. Carmona; R. Ponce; C. León; C. Loyola; M. Vallejo & A. Medina. 2005.** Técnicas aplicadas al estudio de la anatomía vegetal. Cuadernos 38. Instituto de Biología, UNAM. Pp. 277.
- Segretín, M. 2000.** “Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *ArgenBio*. Disponible en: <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20II%20Euge.pdf>

- Söndahl M. & W. Sharp. 1977.** “High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L.”. Z Pflanzenphysiol 81:395-408.
- Söndahl M.; J. Salisbury & W. Sharp. 1979.** “SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in Coffee callus cells”. Z Pflanzenphysiol 94:185–188.
- Söndahl, M. R. and W. R. Sharp. 1979.** Research in coffee spp. and applications of tissue culture methods. *In* Plant Cell and Tissue Culture. Edited by W. R. Sharp, P. O. Larsen, E. F. Paddock and V. Raghavan. Pp. 527- 584. Ohio State Univ. Press, Columbus.
- Söndahl, M; D. A. Spahlinger & W. R. Sharp. 1979.** “A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos un cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. Z Pflanzenphysiol Pp.101-108.
- Thomas, C. & V. Jiménez. 2005.** “Mode of Action of Plant Hormones and Plant Growth Regulators During Induction of Somatic Embryogenesis: Molecular Aspects”. Plant Cell Monogr 2:157-175.
- Trigiano, R.; D. Gray; K. Malueg; K. Pickens; Z. Cheng & E. Graham. 2011.** “Plant Histological Techniques” *In*. Trigiano, R. N.; D. J. Gray. (Editor) Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology. CRC Press. USA. Pp 99-109.
- Touchete, B; Duval, Y & Pannetier. 1991.** “Plant regeneration from embryogenic suspension cultures of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.)”. Plant Cell Reports 10: 529-532.
- Williams, E. & Maheswaran, G. 1986.** “Somatic embryogenesis factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group” Ann. Botany 57: 443-463.
- Wintgens, J. 2004.** “The Coffee Plant”. *In*: Wintgens, J. N. (editor). Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Federal Republic of Germany. Pp. 3-24.
- Yasuda, T.; Y. Fuji; T. Yamaguchi. 1985.** “Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by Benzyladenine”. Plan Cell Physiology 26(3): 595-597.

- Yeung, E. C. & Sussex, I.M. 1979.** “Embryogeny of *Phaseolus coccineus*; The suspensor and the growth of the embryo-proper *in vitro*. *Z Pflanzen Physiology* 91: 423-433.
- Yeung, E. 1995.** “Structural and Developmental Patterns in Somatic Embryogenesis”. *In*. Thorpe, T (ed). “*In vitro* Embryogenesis in Plants”. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. Países Bajos. Pp. 205-237.
- Zamarripa, C. A.; Ducos, J. P.; Tessereau, H.; Bollon, H.; Eskes, A. B.; Pétiard, V. 1991.** “Développement d’un procédé de multiplication en masse du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide”, Paris; *In*: 14^e Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Association Scientifique Internationale du Café; 1991. 392–402.
- Zamarripa, A. & V. Pétiard. 2004.** “Biotechnologies Applied to Coffee”. *In*: Wintgens, J. N. (editor). *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Federal Republic of Germany. Pp. 137-163.

12. ANEXOS

Anexo 1. Componentes del medio Murashige y Skoog

Nitrato de Potasio.....	KNO_3
Nitrato de Amonio.....	NH_4NO_3
Sulfato de Magnesio.....	$\text{MgSO}_4 \text{H}_2\text{O}$
Sulfato de Manganeso.....	$\text{MnSO}_4 \text{H}_2\text{O}$
Sulfato de Zinc.....	$\text{ZnSO}_4 \text{7H}_2\text{O}$
Sulfato de Cobre.....	$\text{CuSO}_4 \text{5H}_2\text{O}$
Cloruro de Calcio.....	$\text{CaCl}_2 \text{2H}_2\text{O}$
Yoduro de Potasio.....	KI
Cloruro de Cobalto.....	$\text{CoCl}_2 \text{6H}_2\text{O}$
Fosfato de Potasio monobásico.....	$\text{KH}_2\text{PO}_4 \text{H}_2\text{O}$
Ácido bórico.....	H_3BO_3
Molibdato de Sodio.....	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \text{2H}_2\text{O}$
Sulfato ferroso.....	$\text{FeSO}_4 \text{7H}_2\text{O}$
Na_2 EDTA.....	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_{10}\text{Na}_2 \text{2H}_2\text{O}$

Anexo 2. Componentes de las vitaminas R2

Myoinositol.....	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$
Ácido nicotínico.....	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$
Piridoxina clorhidrato.....	$\text{C}_8\text{H}_{11}\text{NO}_3 \text{HCl}$
Tiamina clorhidrato.....	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_4\text{OSCl} \text{HCl}$

Anexo 3. Tabla de medios y condiciones de incubación

Etapa y tiempo de incubación (semanas)	Componentes del medio de cultivo	TRATAMIENTO BA	TRATAMIENTO BA/2,4-D	Condiciones de incubación
INDUCCIÓN 0-4	Sales MS	50%	50%	Oscuridad 25 ± 2° C
	Vitaminas R2	100%	100%	
	Glicina	100%	100%	
	BA	0-1 mg/L	0-1 mg/L	
	2,4-D	-	0-5 mg/L	
	Sacarosa	30 g/L	30 g/L	
	pH	5.7	5.7	
	Gelzan™ CM	3.3 g/L	3.3 g/L	
PROLIFERACIÓN 4-8	Sales MS	50%	50%	Fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) 25 ± 2° C
	Vitaminas R2	100%	100%	
	Glicina	100%	100%	
	BA	0-1 mg/L	0-1 mg/L	
	2,4-D	-	0-2 mg/L	
	Sacarosa	30 g/L	30 g/L	
	Ph	5.7	5.7	
	Gelzan™ CM	3.3 g/L	3.3 g/L	
MADURACIÓN Y DESARROLLO 8-12	Sales MS	50%	50%	Fotoperiodo (16 h luz/8 h oscuridad) 25 ± 2° C
	Vitaminas R2	100%	100%	
	Glicina	100%	100%	
	BA	-	-	
	2,4-D	-	-	
	Sacarosa	30 g/L	30 g/L	
	pH	5.7	5.7	
	Gelzan™ CM	3.3 g/L	3.3 g/L	

Anexo 4. Componentes del fijador Navashin

Navashin	
Solución A:	Solución B:
<ul style="list-style-type: none"> • Trióxido de cromo.....1 g • Ácido acético glacial.....7 ml • Agua destilada.....92 ml 	<ul style="list-style-type: none"> • Formaldehído....30 ml • Agua destilada...70 ml

Anexo 5. Tabla de tren de deshidratación

Concentración del ABT	Tiempo (horas)
35%	24
50%	24
60%	24
70%	24
85%	24
95%	24
100%	24
Absoluto	24
Absoluto	24
Absoluto	24

Anexo 6. Tabla de desparafinación y tinción

Acción	Tiempo
Estufa (60°C)	30 min
Xileno	20 min
Xileno:Alcohol absoluto (1:1)	20 min
Acohol 100%, 90%, 70%, 50% y 30%	15 min c/u
Safranina "O"	24 h
Enjuague y secado	24 h
Alcohol 30%, 50%, 70% y 95%	4 min c/u
Verde rápido	5 min
Alcohol absoluto	Varios enjuagues
Aceite de clavo	10 min
CitriSolv™	4 min