

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA



FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Análisis de la expresión génica y regulación epigenética de la
embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L.)**

Proyecto de graduación presentado a la Universidad de Costa Rica para optar por el título
de Licenciatura en Biología con énfasis en Biología Molecular y Biotecnología

RAQUEL BOLAÑOS MURILLO

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO
SAN JOSÉ COSTA RICA

2020

HOJA DE APROBACIÓN

MIEMBROS DE COMITÉ

Dr.sc.agr Andrés M. Gatica Arias

Escuela de Biología

UCR

Director de tesis

Dr.ret.nat. Federico Albertazzi Castro

Escuela de Biología

UCR

Lector

M.Sc. Emanuel Araya Valverde

CENIBiot

Lector

M.Sc. Daniel Briceño Lobo

Escuela de Biología

UCR

Presidente de la comisión de TFG

Ph.D. Gabriela Chavarría Soley

Escuela de Biología

UCR

Miembro de la comisión de TFG

B. Sc. Raquel Bolaños Murillo

Escuela de Biología

UCR

Sustentante

DEDICATORIA

A mis padres, mis hermanas y mi novio

A todos los seres humanos que soñamos con hacer de este mundo algo mejor

PREFACIO

“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood. Now is the time to understand more, so that we may fear less”

-Marie Curie (1867 – 1934)-

AGRADECIMIENTOS

Mi principal agradecimiento a Dios por permitirme llegar hasta la realización de este trabajo y a todas las situaciones en mi vida que me han forjado como persona.

Agradezco además a mis padres, mis hermanas y mi novio por el amor y apoyo incondicional, y que, de una u otra manera me han impulsado a seguir adelante con mis metas.

Extiendo mi agradecimiento a Andrés Gatica Arias, por haber aceptado ser mi tutor, guiarme y aconsejarme durante esta investigación.

Y finalmente a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la UCR: Elodia, Alejandro, Cesar, Randall, Jessica y Miguel, que estuvieron siempre dispuestos a ayudar, enseñar o aconsejarme durante toda esta investigación.

ÍNDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN	ii
DEDICATORIA	iii
PREFACIO	iv
AGRADECIMIENTOS	v
ÍNDICE GENERAL	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS UNIDADES	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
INFORMACIÓN GENERAL DEL CAFÉ	2
IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CAFÉ	3
DIFICULTADES EN EL CULTIVO DE CAFÉ	3
PROPAGACIÓN EN EL CULTIVO DE CAFÉ	4
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN <i>Coffea arabica</i> L.....	5
EPIGENÉTICA Y METILACIÓN DEL ADN	7
ANÁLISIS EPIGENÉTICO: MSAP (“Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”)	
8 JUSTIFICACIÓN	
.....	11
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
METODOLOGÍA	14
UBICACIÓN EXPERIMENTAL	14
MATERIAL VEGETAL	14
INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA DE CAFÉ	14
ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE qRT-PCR	16
EXTRACCIÓN DE ARN	17

AMPLIFICACION DE GENES DE INTERÉS	18
ANÁLISIS DE LAS VARIACIONES DE METILACIÓN POR MSAP.....	20
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	20
ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN TOTAL	21
RESULTADOS	28
DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE ESD DE CAFÉ (C.	
<i>arabica</i> cultivar <i>Caturra</i>)	28
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LEC1, BBM Y WOX4 DURANTE LA ESD EN CAFÉ	
.....	33
EXTRACCIÓN DE ARN.....	33
SINTESIS DE ADNc	35
EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES <i>LEC</i> , <i>BBM</i> Y <i>WOX4</i> EN CAFÉ.....	36
NIVELES DE METILACIÓN DEL ADN DURANTE LA ESD DE CAFÉ	44
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE CAFÉ	44
DISCUSIÓN.....	48
MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA ESD EN	
CAFÉ	48
EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE <i>LEC1</i>, <i>BBM</i> Y <i>WOX4</i> DURANTE LA ESD.....	50
EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN <i>BBM</i> DURANTE LA ESD	50
EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN <i>LEC1</i> DURANTE LA ESD	51
EXPRESION RELATIVA DEL GEN <i>WOX4</i> DURANTE LA ESD.....	52
NIVELES DE METILACIÓN DEL ADN DURANTE LA ESI DE CAFÉ.....	53
CONCLUSIONES	54
RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sensibilidad a la metilación de la citosina de MspI y HpaII en sus sitios de reconocimiento. Las estrellas representan la metilación. Las líneas puntagudas representan el patrón de corte de MspI y las líneas intermitentes representan el patrón de HpaII (Pérez-Figueroa, 2013)	9
Figura 2. Datos generados por MSAP. A) Interpretación del gel de los resultados de dos muestras sometidas a MSAP donde 1/1: objetivo no metilado; 1/0: hemimetilación; 0/1: metilación en citosina interna; 0/0: hypermetilación o ausencia de objetivo. B) Codificación de la matriz binaria para el archivo para el paquete “msap” (Pérez-Figueroa, 2013).	10
Figura 3. Representación esquemática de los muestreos y pruebas a seguir para el cumplimiento de los objetivos.....	17
Figura 4. Procedimiento para la tinción con el azul de toluidina paso a paso (Megías , Molist , Pombal ., 2019).....	27
Figura 5. Proceso de embriogénesis somática directa en las distintas fechas de muestreo de segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> cultivar Caturra en los dos distintos medios de cultivo Yasuda (A, C, E y G) y SG (B, D, F y H). El primer muestreo realizado a los 33 días de cultivo (A y B). La segunda fecha de muestreo realizada a los 64 días (C y D). Tercera fecha de muestreo realizada a los 101 días (E y F). Y muestreo final a los 132 días (G y H)	29
Figura 6. Embriones somáticos inducidos a los 64 días de cultivo de los explantes de <i>C. arabica</i> cultivar Caturra en el medio de ESD Yasuda. Se observan explantes con hasta 6 embriones y otros sin ningún embrión aún. Flecha azul: pseudo embriones, flecha roja: embrión en estado globular, flecha amarilla: explante sin embriones.	30
Figura 7. Embriones somáticos inducidos a los 101 días de cultivo de los explantes de <i>C. arabica</i> cultivar Caturra en el medio de ESD Yasuda. Se observan diferentes estadios embrionales en un mismo explante. Embrión en estado globular (flecha azul) y en estado cotiledonar (flecha roja).	31
Figura 8. Cortes histológicos de diferentes estadios de desarrollo de <i>C. arabica</i> L, cultivar Caturra durante la embriogénesis somática directa. A) Corte transversal de explante con estado formación de callo embriogénico a los 33 días de cultivo en el medio Yasuda (4X). B) Corte transversal de explante el cual presenta pseudo-embriones (cruz roja) a los 101 días de cultivo en el medio Yasuda (10X). C) Corte transversal de embrión en estado globular a los 101 días (4X). D) Corte transversal de embrión en estado torpedo a los 132 días de cultivo en el medio Yasuda (10X). ...	32
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1%) desnaturizante con buffer MOPS(10X) con el ARN extraído de cada fecha de muestreo (33 días, 64 días, 101 días y 132 días y réplicas biológicas). M: marcador molecular (FERMENTAS) (100 pb)	34
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1,2% m/v) por 45 min a 100 V con el ADNc de cada fecha de muestreo (33 días, 64 días, 101 días y 132 días y réplicas biológicas), M: marcador molecular (100 pb) y un CP: Control positivo (se cambiaron los primers por primers de cloroplastos).	35

Figura 11. Expresión genética relativa (RQ) de los genes LEC1, BBM y WOX4 con respecto a UBI9 durante la ESD de <i>C. arabica</i> L. cv. Caturra	38
Figura 12. Expresión relativa y desviación estándar de cada gen y cada réplica biológica obtenida en las qRT-PCR realizadas. Las réplicas biológicas representadas con comillas.	42
Figura 13. Expresión relativa y desviación estándar de cada gen y cada réplica técnica obtenida en las qRT-PCR realizadas. Las réplicas técnicas representadas con un 2.	43
Figura 14. Electroforesis de ADN extraído de cada fecha de muestreo (33 días, 64 días, 101 días y 132 días y réplicas biológicas) y un marcador molecular M (100pb).	45
Figura 15. Análisis de coordenadas principales (PCoA) según tejido vegetal. En paréntesis a la par de cada coordenada se muestran los porcentajes de varianza. Cada uno de los puntos representa muestras individuales (rojo: callo embriogénico, verde: callo no embriogénico, azul: embrión somático, lila: hoja). Las etiquetas indican el centroide de puntos para cada tipo de tejido vegetal.	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Medios de cultivo para la inducción de embriogénesis somática directa en segmentos de hoja de Coffea arabica L. cv. Caturra.	15
Cuadro 2. Lista de primers utilizados para el análisis de expresión de los genes involucrados en la embriogénesis somática en café y primers del gen de referencia: UBI9	19
Cuadro 3. Componentes del RT qPCR.....	20
Cuadro 4. Componentes digestión I MSAP.	22
Cuadro 5. Componentes digestión II + ligación MSAP.....	22
Cuadro 6. Componentes de la Pre-amplificación MSAP	23
Cuadro 7. Secuencias de los adaptadores e imprimadores utilizados en las reacciones de ligación y pre-amplificación de MSAP.	23
Cuadro 8. Combinaciones de imprimadores selectivos utilizados en el MSAP.....	24
Cuadro 9. Componentes de la Amplificación Selectiva MSAP	24
Cuadro 10. Promedio de explantes con embriones y promedio de cantidad de embriones por explante en cada medio de cultivo y fecha de muestreo.....	33
Cuadro 11. Concentración y calidad de ARN total extraído de segmentos de hoja de C. arabica L. cv Caturra en medio de cultivo Yasuda.....	34
Cuadro 12. Concentración y calidad de ADNc de segmentos de hojas de C. arabica L. cultivar Caturra.	36
Cuadro 13. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de la expresión relativa de 3 genes, en cada fecha de muestreo durante la ESD de C. arábica cv. Caturra.	39
Cuadro 14. Resultado de la prueba Tukey de las diferencias de la expresión relativa (RQ) de cada gen en cada una de las fechas de muestreo.....	39
Cuadro 15. Concentración y calidad de ADNc de segmentos de hoja de C. arabica L. cv Caturra.	44
Cuadro 16. Resultados del análisis de metilación (MSAP) de ADN genómico total en diferentes tejidos de C. arabica L. cv Catuaí.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS UNIDADES

ESD: Embriogénesis somática directa
ESI: Embriogénesis somática indirecta
VS: Variaciones Somaclonales
AgNO₃: Nitrato de plata
MS: Medio de cultivo Murashigue y Skoog
SG: Medio de cultivo Sridevi & Giridhar (Sridevi & Giridhar, 2014)
qRT-PCR: “Real-Time Quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction”
° C: Celcius
µL: Microlitros
µM: Micromolar
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ARN: Ácido ribonucleico
ADNc: Copia del Ácido desoxirribonucleico
MSAP: “Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism” (amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación)
AFLP: “Amplified fragment length polymorphism” (Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados)
CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
CIBCM: Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular
CIRAD: Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
Cn: Concentración
CTAB: Cetil-trimetil bromuro de amonio
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético
ICAFE: Instituto del Café de Costa Rica
YA: medio de cultivo Yasuda

Análisis de la expresión génica y regulación epigenética de la embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L.)

Raquel Bolaños Murillo

A60882

RESUMEN

La embriogénesis somática (ES) es un proceso por el cual las plantas tienen la capacidad de desarrollar embriones a partir de una célula o grupo de células somáticas, sin la necesidad de la unión de gametos. Esta capacidad tan intrigante de generar embriones somáticos, es el proceso *in vitro* más favorable y eficaz para poder obtener explantes más competentes, útiles tanto para modificaciones genéticas como para la regeneración de plantas. Si bien es cierto los individuos obtenidos son clones, existen variaciones genéticas, epigenéticas o fenotípicas presentes en ellos, que comprometen la utilización de la ES, sobre todo en operaciones comerciales. Por ello, es que se han realizado varios trabajos en relación a la ES en diferentes especies, entre ellas el café.

En el caso del café, se han analizado tanto las condiciones y medios de cultivo más óptimos, como los posibles genes involucrados durante el proceso, la estabilidad genética y epigenética de sus productos. Sin embargo, los estudios se han empeñado en mejorar la producción de nuevos individuos y no en entender el mecanismo para así, asegurar los fenotipos de los nuevos individuos.

Además, las investigaciones se han concentrado más en especies modelo, por ello en el caso del café la menos utilizada ha sido *C. arabica* L. aun siendo la más importante a nivel comercial. Por ello en esta investigación se evaluó la embriogénesis somática directa (ESD) de esta especie de café en dos medios de cultivo distintos, así como la expresión genética de los genes *LEC1*, *BBM* y *WOX4*, y la variación de la metilación del ADN en diferentes tejidos de la embriogénesis somática indirecta (ESI) en *C. arabica* L. cv Catuaí.

Durante el desarrollo de los embriones por medio de ES directa, se observó que la producción de embriones no fue tan alta como en otras investigaciones y que la utilización

del AgNO_3 en el medio no contribuyó al proceso de ES. Dentro de los factores que se consideran tuvieron injerencia en este resultado, fue la rápida oxidación y la concentración de reguladores de crecimiento en el medio.

En cuanto a los niveles de expresión de los genes *LECI*, *BBM*, y *WOX4*, se logró confirmar su participación durante la ESD en *C. arabica* L. Además, se determinó que, durante la ESD, el gen *BBM* es el que inicia a aumentar su expresión una vez que se observan los primeros embriones somáticos, y se expresó significativamente más que los otros dos durante todas las fechas analizadas.

Por otra parte, por medio del análisis de metilación del ADN total de los tejidos de Catuaí obtenidos por ESI, se logró determinar que hay un alto porcentaje (82.8%) de loci sensibles a la metilación y una alta diversidad entre ellos (0.59), lo que indica una alta regulación epigenética por medio de la metilación. También se observó que, en el tejido de hoja, el porcentaje de loci sensibles a la metilación fue más alto (38%) que en los otros tejidos: callo embriogénico, embrión somático y callo no embriogénico (25% a 30%), los cuales evidentemente sufrieron multiplicación celular. Este resultado evidencia que la regulación epigenética por medio de metilación tiene un papel muy importante en procesos biológicos como lo es la multiplicación celular.

Palabras clave: *Coffea arabica* L., embriogénesis somática directa, expresión genética diferencial, metilación total del ADN

INTRODUCCIÓN

La agricultura es una actividad vital para la supervivencia del ser humano, por esto es que las diferentes investigaciones en especies de cultivo son indispensables en la actualidad. Entre las características de interés en las investigaciones está la rápida propagación de las plantas, que permiten obtener información genética en células vegetales y regeneración de algunas características a corto plazo (Nieves et al., 2006). Existen diferentes técnicas de cultivo de tejidos, sin embargo, las plantas poseen uno de los procesos más intrigantes en la naturaleza, son capaces de desarrollar una nueva planta a partir de una célula o grupo de células somáticas generando embriones idénticos a los embriones cigóticos, sin requerir una fecundación. Se trata de un proceso conocido como embriogénesis somática (ES), el cual es una herramienta muy poderosa para la multiplicación de plantas (Nic-Can et al., 2013). Con esta técnica no solo se beneficia la agricultura, la ES permite, también, tener cultivos *in vitro* muy competentes y de manera más eficiente para, por medio de ingeniería genética, realizar transformaciones para el mejoramiento de las variedades de café (Gatica, Arrieta, et al., 2008). Además, siendo la ES un proceso biológico tan complejo como muchos otros, podría brindarnos información muy importante sobre las alteraciones que puede causar la expresión diferencial de un solo gen (Florez et al., 2015).

La especie, el genotipo, el estado fisiológico de la planta donante, las condiciones de incubación, la composición del medio de cultivo, el estado de desarrollo del explante y la técnica de cultivo *in vitro* que se aplique, son características de las cuales la embriogénesis somática es dependiente (Campos et al., 2017; Nieves et al., 2006). Por ello es que la ES se ha estudiado en varias especies de plantas obteniendo cada vez más información sobre ello. Gracias a estos estudios se conocen diferentes etapas de la ES y se han propuesto varios genes que participan en este proceso (Nic-Can et al., 2013).

Gracias a la biología molecular, se ha logrado determinar que estos genes expresados durante el proceso de ES, están relacionados con procesos como la diferenciación celular, división celular, la morfogénesis, tolerancia a la deshidratación (Florez et al., 2015; Ikeda et al., 2006), multiplicación de células meristemáticas, desarrollo vascular (Ohmori et al., 2013) entre otros. Si bien en el pasado el principal objetivo de los estudios era establecer protocolos para optimizar la ES para la producción de diferentes especies, ahora en las investigaciones se busca más a tratar de entender el mecanismo detrás de este evento y sus principales integrantes, en este caso los genes expresados diferencialmente durante la ES (Campos et al., 2017). La qRT-PCR (Real Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction), es uno de los métodos de biología molecular que posee una gran sensibilidad para detectar y cuantificar pequeños cambios en la expresión génica (Pfaffl, 2001). Esta es una de las aplicaciones más utilizada de este método y se logra realizar gracias a la detección de los

niveles de ARNm procedentes de un tejido. En este caso la RT (Retrotranscriptasa) permite la síntesis del ADNc a partir del ARN, para luego realizar el PCR cuantitativo (Tamay de Dios et al., 2013).

La expresión de un gen puede verse moderada por diferentes mecanismos que van desde la modificación del ADN hasta la degradación del ARN mensajero, mejor conocidos como mecanismos epigenéticos (Bobadilla Landey et al., 2013; He et al., 2011). Uno de los métodos más comunes para silenciar un gen es la metilación del ADN (Morán & Pérez-Figueroa, 2011). Actualmente existen varias técnicas para el estudio de las variaciones de metilación global del ADN, entre las que surge la Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism o MSAP. Esta tiene como base la técnica de AFLP (Peredo et al., 2009). La diferencia es que MSAP utiliza un par de enzimas de restricción sensibles a la metilación, las cuales reconocen la misma secuencia, pero la sensibilidad a la metilación en las citocinas, dentro del sitio de restricción, es diferente entre ellas (Baránek et al., 2016).

El cultivo de *Coffea arabica* L. posee una mayor susceptibilidad a enfermedades y más restricciones ambientales para poder desarrollarse (menor adaptación a cambio de temperatura, requiere más lluvia o irrigación, prefiere elevadas altitudes), pero su bebida es de una calidad superior con respecto a las otras (Campos et al., 2017). Por ende, analizar tanto los cambios en su expresión génica a nivel molecular con RT-qPCR, como la variación de metilación del ADN con MSAP, durante el proceso de ES, podría proporcionar información para poder cuantificar las modificaciones genéticas y epigenéticas, y las posibles variantes fenotípicas de los individuos obtenidos como productos de este proceso.

INFORMACIÓN GENERAL DEL CAFÉ

El café, un arbusto perteneciente al género *Coffea* de la familia de rubiáceas, es uno de los cultivos económicamente más importantes para varios países (*Eco-Negocios - Generalidades*, n.d.). Si bien dentro de este género se encuentran 100 especies solamente 3 de estas se cultivan para la producción del grano de café: *Coffea arabica* L., *C. canephora* Pierre ex Froehner y *C. liberica* Bull ex Hiern. De estas 3 especies hay una que destaca tanto por la calidad de la bebida obtenida de sus granos, como el área sembrada y el volumen de su distribución, se trata de *Coffea arabica* L (Mora, 2008).

Aunque su origen suele atribuirse a Arabia, el café es originario de la antigua Etiopía en la República de Yemen (*Eco-Negocios - Generalidades*, n.d.). De ahí se expandió a Europa, seguido de Asia y África (Mora, 2008). A nuestro continente americano ingresa por medio de Surinam y las Antillas francesas, para quienes sigue siendo un cultivo importante, sin embargo, Brasil y Colombia son actualmente las potencias que destacan en este mercado

(*Eco-Negocios - Generalidades*, n.d.) La primer evidencia de la existencia del café en nuestro país se da en 1816 (Mora, 2008).

Desde 1940 hasta 1989, la producción y precios del café, se establecían en la Oficina Panamericana del café. Hoy en día, debido al florecimiento del neoliberalismo, es la Ley de la oferta y demanda las que fijan los precios dentro de la que destacan compañías como Nestlé, Starbucks Coffee Co, Tesco, entre otras (*Eco-Negocios - Generalidades*, n.d.).

IMPORTANCIA DEL CULTIVO DE CAFÉ

El cultivo de café es un gran generador de empleos directa e indirectamente a nivel mundial. Se calcula que gracias al cultivo y comercio del café, alrededor de 100 millones de personas en 80 países logran subsistir (*Eco-Negocios - Generalidades*, n.d.).

En el caso más regional, en América Central, cerca de 260 000 familias de agricultores son dependientes de la producción del café. Además el comercio del café genera trabajo para más de un millón y medio de personas, lo que representa cerca del 28 % de la fuerza rural (Díaz Medina, 2014).

Como se mencionó anteriormente *Coffea arabica* L. es la especie de mayor importancia en el cultivo y comercio del café, ya que es la responsable del 75% de producción a nivel mundial, mientras que el restante 25% es Robusta (*C. canephora*) la cual puede crecer en tierras bajas (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

En el año 2014 se reportó una ganancia en exportación de café de alrededor \$31.8 mil millones, lo que coloca a este cultivo en uno de los más importantes a nivel mundial (Muniswamy et al., 2017).

DIFICULTADES EN EL CULTIVO DE CAFÉ

Al igual que para otros cultivos, las características climáticas y edáficas para una óptima y máxima producción de café están ya bien definidas (Mora, 2008). Si bien *Coffea arabica* L. proporciona una bebida superior, esta especie es mucho más sensible a las plagas de hongos nematodos e insectos. Robusta (*C. canephora*) por su parte, tiene menor calidad de bebida pero es más resistente a las plagas que afectan el café (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

Una complicación del cultivo del café es su largo periodo de producción de fruto. El ciclo reproductivo del café puede tardar hasta cuatro años desde su cultivo hasta su floración y generación de semillas (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

Por otra parte, la selección de nuevos individuos para nuevos cultivos mediante técnicas convencionales, es difícil debido a todo el proceso de selección, hibridación, evaluación de la progenie, y cruces que estos requieren (Arimarsetiowati, 2017). Y para asegurar la fidelidad entre las semillas, se requieren hasta 6 ciclos de inter cruzamientos, para lograr homocigocidad (Arimarsetiowati, 2017; De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

En resumen, los mayores problemas a los que se enfrenta el cultivo de café son: las enfermedades o pestes que lo atacan, su largo periodo de producción y sus complicados métodos de propagación o multiplicación.

PROPAGACIÓN EN EL CULTIVO DE CAFÉ

En una nueva generación de plantas, lo que generalmente se busca y se selecciona, son nuevos genotipos recombinantes que presenten los rasgos más deseados, de acuerdo a las generaciones e individuos seleccionados (Lashermes et al., 2001).

En el caso del café, para su reproducción, por lo general se toman plantas de entre 6 a 8 años de edad (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006). Pero la combinación de cromosomas, el entrecruzamiento posible entre estos, además de parámetros como los ambientales (temperatura, condiciones de estrés) entre otros, podrían elevar el nivel de variación genética en la nueva generación, obteniendo así individuos con genotipos no deseados (Lashermes et al., 2001). Otra dificultad a tomar en cuenta es que no todas las especies de café son genéticamente compatibles para poder tan siquiera hacer cruces entre ellas. Tomando como ejemplo las dos especies cultivadas en nuestro país, *C. canephora* es una especie diploide ($2n = 2x = 22$ cromosomas), su diversidad es alta debido a su alogamia (reproducción sexual) y crece en zonas tropicales de baja altitud (0 – 100m). Caso contrario para *C. arabica*, que es la única especie de café tetraploide ($2n = 4x = 44$ cromosomas), que debido a su evolución y autogamia (autofecundación), presenta una diversidad mucho más estrecha. Además, esta especie crece en regiones tropicales pero de grandes altitudes (500 a 2500 m) (Etienne, 2005; Lashermes et al., 2001).

Por ello es que técnicas como el cultivo de tejido de plantas *in vitro* y la transformación de plantas se desarrollaron y han contribuido para obtener de manera más rápida variedades de café mejoradas con nuevos rasgos (Arimarsetiowati, 2017). Esto no solo ha permitido aumentar la capacidad de multiplicación de plantas con rasgos de interés agronómico, sino

que también ha sido una herramienta vital para el desarrollo de las investigaciones en la agricultura (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

En el mejoramiento de las variedades de café, la ingeniería genética ha tenido un papel muy importante, obteniendo por medio de sus diferentes técnicas de cultivos *in vitro*, individuos competentes para la regeneración de cultivos (Gatica, Arrieta, et al., 2008).

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Coffea arabica* L.

Entre los técnicas de micropropagación que se utiliza en la ingeniería genética para la multiplicación vegetativa, destaca la embriogénesis somática como una de las más prometedoras en cuanto a rapidez y a obtención de individuos elite (Bobadilla Landey et al., 2013; Etienne et al., 2012; Gatica-Arias, Arrieta, et al., 2008). La ES, para todas las especies, generalmente inicia cuando el material vegetal es expuesto a un estímulo, generalmente un estímulo hormonal, el cual, con factores internos, puede inducir a la reprogramación de células somáticas o promover la multiplicación de células totipotentes que por lo general están inactivas

En café, las investigaciones sobre la ES iniciaron en 1970 en varios institutos, entre ellos el Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (Cirad) en Francia, el cual se uniría en 1990 a PROMECAFE para crear híbridos de variedades comunes en América Latina e individuos salvajes originarios de Etiopía y Kenia. La necesidad de impulsar las investigaciones en ES, nace de la urgencia de propagar masivamente y de manera rápida estos nuevos híbridos y estudiar las nuevas generaciones. A estas producciones masivas se uniría además el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), localizado en nuestro país (Etienne et al., 2012). Desde entonces la colaboración de estos institutos junto con otros que se han ido uniendo a nivel mundial, han logrado ir mejorando esta técnica para poder aplicarla a nivel comercial (Etienne et al., 2012). Esta técnica de propagación clonal ha permitido la multiplicación de individuos resistentes a enfermedades, tolerantes al estrés y con concentraciones bajas en cafeína (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

En Centro América, la ES se ha utilizado a nivel comercial desde el año 2007 y se presume, cerca de 4 millones de plantas han sido desarrolladas a partir de esta técnica (Etienne et al., 2013). Sin embargo la falta de reproducibilidad y eficacia de algunas de las etapas de la ES, además de la relación costo efectividad impide que se logre su aceptación en algunos países como técnica comercial para la multiplicación de cultivos (Etienne et al., 2012).

La ES se ha desarrollado de dos maneras distintas, Embriogénesis Somática Directa (ESD) e Embriogénesis Somática Indirecta (ESI). La ESD consiste en obtener células pro

embrionarias por medio de tejido vegetal de hojas, vástago, microesporas o protoplastos en ausencia de cualquier tipo de callo (Gatica, Arrieta, et al., 2008). Por su parte, la ESI requiere diferentes etapas, iniciando con la inducción de callos, seguido de su proliferación. Luego el desarrollo embrionario, germinación y conversión a plantas (Arimarsetiowati, 2017).

Evidentemente, la ESD requiere de menor tiempo para obtener embriones somáticos, lo cual le representa una ventaja frente a la ESI (Gatica, Arrieta, et al., 2008). Sin embargo, ambos sistemas de cultivo de tejidos están altamente expuestos a sufrir de inestabilidad genómica y epigenética debido a su estrecha dependencia a una pluripotencialidad y extensiva división celular competentes durante todo el proceso (Bobadilla Landey et al., 2013). Esta inestabilidad y variaciones se ven reflejadas en los nuevos individuos como variaciones fenotípicas las cuales se conocen como variaciones somaclonales (VS) (Bobadilla Landey, 2013). En el café estas VS generadas en la ES varía de 0 a 93% y son completamente dependiente del genotipo, fuente del explante, edad del cultivo, tipo y concentración de los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Campos et al., 2017). Si bien ambas técnicas pueden sufrir de VS, se cree que la disminución en el tiempo de cultivo en la ESD, podría disminuir la frecuencia de las VS (Gatica, Arrieta, et al., 2008).

La utilización de factores de crecimiento, su concentración, el tipo de factores de crecimiento, y el tiempo de tratamiento es esencial en ambas metodologías pero varían entre cada especie y hasta puede variar entre cada cultivar de la misma especie (Campos et al., 2017). Por ello las investigaciones ahora buscan estrategias moleculares para evaluar la fidelidad genética en las nuevas plantas generadas por medio de la ES (Muniswamy et al., 2017).

Los factores involucrados en la iniciación de la ES aún no están claros por lo que las investigaciones se han concentrado en cambios moleculares o la epigenética de las diferentes etapas de las ES (Campos et al., 2017). Dentro de los intentos a entender los mecanismos moleculares involucrados en la ES, en reiterados trabajos de investigación, se hace mención de 8 genes importantes en la ES: *LEA* (*Late Embryogenesis Abundant*), *SERK* (*Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*), *AGL15* (*Agamous-like15*), *BBM* (*Baby Boom*), *LEC1* (*Leafy Cotyledon 1*), *FUS3* (*Fusca3*), *ABI3* (*ABA- Insensitive 3*) (Ikeda et al., 2006) y *WOX* (*WUSCHEL-RELATED HOMEBOX*) (Ohmori et al., 2013). En los cuales se ha concluido estos están ligados a diferentes estadios del embrión en la ES (Campos et al., 2017).

En el caso de *LEC1* es un gen importante en la maduración de semillas. Su expresión es requerida para la síntesis de componentes de almacenamiento, como lípidos y oleosinas durante este periodo (Junker & Bäumllein, 2012). Se cree que participa en no permitir una germinación prematura (Lotan et al., 1998). Además, tanto en la ES, como en la cigótica, *LEC1*, es un regulador crítico a diferentes niveles durante el desarrollo temprano y tardío del embrión (Junker & Bäumllein, 2012; Kwong et al., 2003).

Por su parte, *BBM*, se relaciona con la activación de varios genes responsables directamente de la maduración del embrión. El *FUS3* es uno de ellos, y participa en la división celular y la morfogénesis durante la embriogénesis. La expresión ectópica de *BBM*, en *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* indujo a la formación espontánea de embriones somáticos sin necesidad de la aplicación de otras hormonas, por ello, aunque su participación no está totalmente clara, se sabe que es vital en la ES de las plantas (Boutilier et al., 2002; Florez et al., 2015).

Otros genes reportados en varios trabajos, sobretodo en *Arabidopsis thaliana*, son los *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*). Esta familia de genes, además de participar en la embriogénesis, participan en varios aspectos del desarrollo, como el mantenimiento de las células madre a nivel de meristemas (Costanzo et al., 2014) y desarrollo vascular (Ohmori et al., 2013). Tanto la diversificación, como la funcionalidad, adquirida en diferentes nichos de células madre de estos genes, han contribuido al éxito en la diversidad y evolución de las plantas (Costanzo et al., 2014). Entre los diferentes genes que componen esta familia se encuentran: *WUSCHEL* en meristemas de tallo, *WOX4* en cambium y procambium (Hirakawa et al., 2010) y *WOX5* en meristema radical (Costanzo et al., 2014). En el proceso de ES, el *WOX4* es quien parece ser protagonista. Para el caso específico de *Vitis vinifera*, durante la ES, este gen, aumenta sus niveles de expresión cuando el embrión empieza a germinar (Nic-Can et al., 2013).

Por otro lado, debido a que se ha observado que algunas VS se han revertido después de algunos ciclos vegetativos de propagación o algunas veces después de la aclimatación en los campos de cultivo, se ha propuesto que la epigenética puede jugar un papel muy importante en las VS (Bobadilla Landey et al., 2015). Para ello, se han desarrollado varios marcadores moleculares tales como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP, SSR (Simple Sequence Repeats), ISSR (Inter Simple Sequence Repeats), los cuales se han analizado en distintas muestras en los diferentes estadios de la ES (Muniswamy et al., 2017).

EPIGENÉTICA Y METILACIÓN DEL ADN

La epigenética significa todo lo que está “fuera de la genética convencional”, pero se utiliza para describir el estudio de las alteraciones estables en el potencial de la expresión génica que ocurre durante el desarrollo y multiplicación celular, tanto en procariotas como eucariotas (Jaenisch & Bird, 2003). Y es que, aunque los genes estén presentes en el genoma de un individuo, la expresión del mismo depende directamente de la cromatina en la que se encuentra el ADN enrollado en las histonas (Grafi et al., 2007). Modificaciones químicas tanto en el ADN (metilación de la citosina) como en las proteínas de las histonas (acetilación, metilación o fosforilación) pueden afectar la estructura de las cromatinas y la expresión génica por medio del reclutamiento de proteínas o complejos proteínicos (Grafi et al., 2007).

Y es que los mecanismos epigenéticos no son para nada desconocidos en las plantas. Aunque en algunos casos no están muy claros, estos juegan un papel muy importante en el desarrollo, la floración, reconocimiento de patógenos, senescencia y variaciones somaclonales (Baránek et al., 2016; Bobadilla Landey et al., 2013; Fulneček & Kovařík, 2014; He et al., 2011; Kitimu et al., 2015) Mecanismos como la metilación y demetilación del ADN son desencadenados por factores endógenos y exógenos (edad, concentración de auxina, temperatura, entre otros) tanto *in vivo* como *in vitro*. Los patrones de metilación son dependientes, hasta del método de propagación de la planta (Campos et al., 2017; De-la-Peña et al., 2012).

Una de las formas de metilación del ADN ocurre cuando un grupo metilo se incorpora al carbono 5 de un aro de citosina-pirimidina y forma un 5-metilcitosina. En las plantas, la citosina puede ser metilada en 3 sitios distintos: CpG, CpHpG o CpHpH, donde H puede representar cualquier nucleótido excepto la guanina (Kitimu et al., 2015). Por lo general las regiones centroméricas, pericentroméricas o regiones con elementos repetitivos están fuertemente metiladas, caso contrario ocurre en las regiones de promotores (He et al., 2011). Por lo tanto, la metilación del ADN en estas regiones o regiones codificantes actúan para reprimir la transcripción de un gen (Kitimu et al., 2015).

ANÁLISIS EPIGENÉTICO: MSAP (“Methyl-Sensitive Amplification Polymorphism”)

Existen varias técnicas para poder analizar la metilación del ADN de un individuo, entre las que se pueden mencionar la HPLC (High Performance Liquid Chromatography), HPCE (High Performance Capillary Electrophoresis), la conversión de citosinas no metiladas con bisulfito, la inmunoprecipitación, técnicas emergentes asociadas a la NGS (Next Generation Sequencing) o la amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación MSAP (Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism) (Baránek et al., 2016). A excepción de MSAP, las otras técnicas mencionadas son dependientes del conocimiento detallado de la secuencia genómica, además de ser técnicas costosas. Por lo tanto, muchos investigadores utilizan MSAP, máxime cuando se trata de organismo no modelo (Fulneček & Kovařík, 2014).

MSAP es una modificación a la técnica de AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), basada en la amplificación por medio de PCR de fragmentos de restricción seleccionados por medio una digestión en paralelo de *EcoRI* y las endonucleasas isoquiméricas *HpaII* y *MspI*. La sensibilidad a la metilación de las citosinas en su tetranucleotido 5'-CCGG, es distinta en estas dos enzimas. *HpaII* es sensible a la metilación de la citosina interna en ambas cadenas. Por su parte, la *MspI* es sensible a la metilación de la citosina externa de cualquier cadena (Fig 1. ; Pérez-Figueroa, 2013).

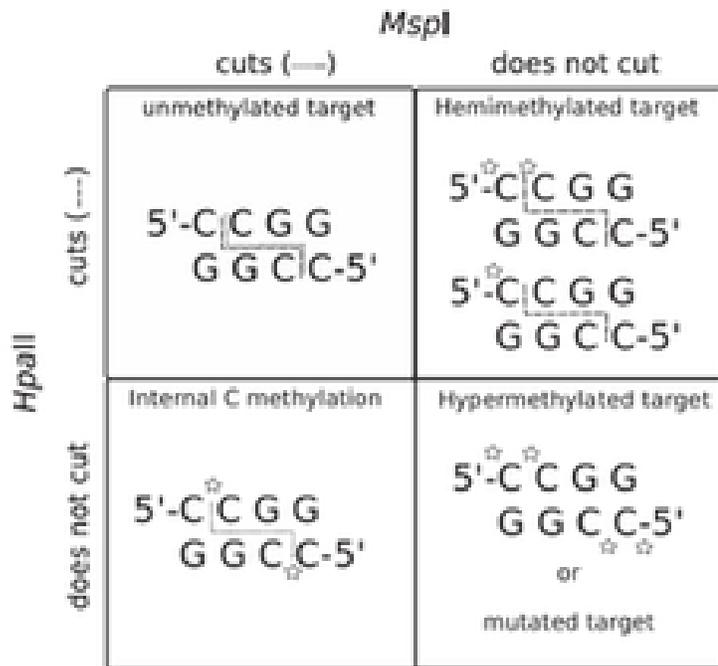


Figura 1. Sensibilidad a la metilación de la citosina de *MspI* y *HpaII* en sus sitios de reconocimiento. Las estrellas representan la metilación. Las líneas puntagudas representan el patrón de corte de *MspI* y las líneas intermitentes representan el patrón de *HpaII* (Pérez-Figueroa, 2013).

Las muestras digeridas por las enzimas *EcoRI/MspI* y *EcoRI/HpaII* son ligadas a dos adaptadores compatibles con *EcoRI* y las terminaciones *MspI/HpaII* generadas. Dichos fragmentos son luego pre-amplificados con primers no selectivos y seguido de una amplificación con primers selectivos, los cuales son generalmente marcados con fluorescencia. Para su análisis los fragmentos son separados por un gel desnaturizante de poliacrilamida, en el cual se tendrán dos carriles para cada muestra analizada, una que representa los fragmentos en la digestión *EcoRI/MspI* y otro la digestión *EcoRI/HpaII*. Con la lectura del gel resultante se realiza una matriz binaria para continuar con los análisis por medio de un paquete en R: *msap* (Fig 2; Pérez-Figueroa, 2013).

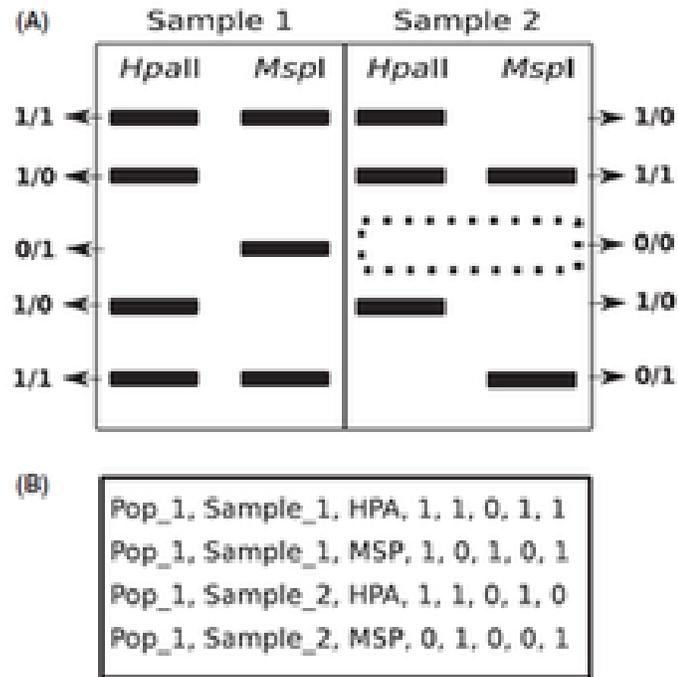


Figura 2. Datos generados por MSAP. A) Interpretación del gel de los resultados de dos muestras sometidas a MSAP donde 1/1: objetivo no metilado; 1/0: hemimetilación; 0/1: metilación en citosina interna; 0/0: hipermetilación o ausencia de objetivo. B) Codificación de la matriz binaria para el archivo para el paquete “msap” (Pérez-Figueroa, 2013).

JUSTIFICACIÓN

La propagación vegetativa masiva de genotipos elite de los diferentes cultivos a nivel mundial es una herramienta esencial para la producción comercial de los mismos (Kitimu et al., 2015). Máxime cuando se habla de cultivos como el del café, económicamente muy importante para más de 80 países (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

A lo largo de los años se han propuesto muchos protocolos para la propagación de *Coffea* vía embriogénesis somática, sin embargo, las condiciones de incubación (intensidad de luz, fotoperiodos, temperatura, humedad) de estos protocolos y la propuesta para genotipos específicos no garantizan la reproducibilidad de los mismos (Gatica, Arrieta, et al., 2008). El genotipo, la fuente del explante, la edad del cultivo, el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento, el tipo de ploidía y la cantidad de cromosomas están directamente relacionados con la frecuencia de las variaciones somaclonales (VS) en los nuevos individuos (Campos et al., 2017; Gatica-Arias, Arrieta-Espinoza, et al., 2008).

Y es que justamente la pérdida de fidelidad genética es la problemática más importante y la que impide la utilización de la ES a gran escala comercialmente hablando (Bobadilla Landey et al., 2015; Gatica-Arias, Arrieta, et al., 2008). Se han descrito varios mecanismos genéticos y epigenéticos como los causantes de las variaciones somaclonales en cultivos *in vitro* (Bobadilla Landey et al., 2015). Entre estos se han mencionado deleciones, duplicaciones, inversiones y translocaciones de cromosomas, además de la metilación del ADN (Bobadilla Landey et al., 2013). Por ende, la investigación de la expresión de los genes participantes en la ES y además los posibles factores de regulación epigenética brindarían más información sobre estas VS.

En su investigación Nic-Can y sus colaboradores (2013) realizaron sus análisis de expresión génica y regulación epigenética, utilizando *Coffea canephora*. Para la especie responsable del 60% al 75% de la producción mundial de café, *Coffea arabica* L. (Campos et al., 2017; De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006; Ovalle-Rivera et al., 2015), se ha evaluado su estabilidad genética y epigenética por medio de marcadores AFLP y la técnica de MSAP (Bobadilla Landey et al., 2015). Sin embargo, aún no se ha evaluado la expresión de estos genes en específico en conjunto con la posible regulación epigenética. Si bien esta especie es la mayor cultivada por su calidad superior de bebida, se considera que esta tiene costos de producción más elevados debido a una mayor susceptibilidad a enfermedades y más restricciones ambientales para poder desarrollarse (menor adaptación a cambio de temperatura, requiere más lluvia o irrigación, prefiere elevadas altitudes) (Campos et al., 2017). Por lo tanto, analizar el proceso de ESD, tanto los cambios en su expresión génica a nivel molecular con RT-qPCR, como la variación de metilación del ADN con MSAP, durante la ESI, podría proporcionar información para poder cuantificar las modificaciones genéticas y epigenéticas, y las posibles variantes fenotípicas de los individuos obtenidos como productos de una ES. Dicha información sería muy valiosa en la mejora de los cultivos y productos finales de nuestros caficultores y el resto de países donde este producto representa una de sus mayores ingresos comerciales. Además, aportaría conocimientos sobre

el proceso de la embriogénesis y los impactos de una expresión diferencial de un gen que podrían ser aplicadas en otros procesos biológicos.

HIPÓTESIS

- I. El medio de cultivo influye en la inducción de embriones somáticos por medio de embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja de *Coffea arabica* L. cv. Caturra
- II. La expresión génica de algunos genes, tales como *Leafy Cotyledon 1 (LEC1)*, *Baby Boom (BBM)* y *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX4 (WOX4)*, podría variar de acuerdo al estadio de desarrollo de los embriones somáticos durante la embriogénesis somática directa.
- III. Las variaciones en los niveles de metilación del ADN podrían ejercer un control epigenético durante el proceso de embriogénesis somática indirecta.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la expresión de los genes *Leafy Cotyledon 1 (LEC1)*, *Baby Boom (BBM)* y *WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 4 (WOX4)* y la variación de metilación del ADN total, durante el proceso de embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- I. Evaluar la efectividad de dos medios de cultivo para ESD descritos en la literatura para la inducción de embriones somáticos a partir de segmentos de hoja de café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra).
- II. Evaluar la expresión de los genes *LEC1*, *BBM1* y *WOX4*, por medio de qRT-PCR, transcurridos 33, 64, 101 y 132 días, desde el inicio del cultivo de los segmentos de hoja de *Coffea arabica* L. cv. Caturra en el medio de inducción a embriogénesis somática: Yasuda et al. (1985).
- III. Cuantificar el nivel de metilación del ADN total en callos embriogénicos (*Coffea arabica* L. cv. Catuaí) por medio de la técnica Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP, por sus siglas en inglés).
- IV. Comparar los niveles de metilación entre los tejidos vegetales: callo embriogénico, callo no embriogénico, embrión somático y hoja; obtenidos mediante la prueba de Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP).

METODOLOGÍA

UBICACIÓN EXPERIMENTAL

La presente investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología de Plantas de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San Pedro de Montes de Oca, San José. Se desarrolló en el marco del proyecto de investigación 801-B5-007 titulado “Análisis de la expresión génica y variación en el patrón de la metilación del ADN durante el proceso de embriogénesis somática en café (*Coffea arabica* L.)” financiado por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

MATERIAL VEGETAL

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron segmentos de hojas provenientes de vitroplantas de café (*Coffea arabica* L. cv. Caturra) de aproximadamente 3 años de edad, desarrolladas en el laboratorio de Biotecnología de la UCR. Dichas plantas han sido mantenidas en el cuarto de crecimiento en condiciones ambientales controladas ($26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 16 horas de fotoperíodo bajo luz blanca). El medio de cultivo para el crecimiento de las vitroplantas correspondió al medio semisólido con las sales minerales y vitaminas descrito por Murashige y Skoog (1962), complementado con, benciladenina (1mgL^{-1}), ácido giberélico (1gL^{-1}), sacarosa (30gL^{-1}), agar (8gL^{-1}), pH de 5.6. Todo el material utilizado fue del cultivar *Coffea arabica* L. cv. Caturra. Además, se utilizó segmentos de hoja, embriones, callo no embriogénico y callo de *C. arabica* L cv. Catuaí para realizar el análisis de MSAP.

INDUCCIÓN DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DIRECTA DE CAFÉ

Para la formación de embriones somáticos se prepararon 700 segmentos de hojas provenientes de vitroplantas de aproximadamente $0,5\text{ cm}^2$ cada uno, a los cuales se les eliminó todos los bordes. Los segmentos de hoja se cultivaron en el medio de inducción descrito por Yasuda y sus colaboradores (1985) o en el medio de cultivo descrito por Sridevi

& Giridhar, (2014)(Cuadro 1). Los cultivos se realizaron con 10 segmentos de 0.5 cm² en cada placa Petri con 10 ml de medio de cultivo (35 placas de cada medio) para la inducción de embriones somáticos. Los explantes se cultivaron en medio de inducción hasta que se observó la formación de embriones somáticos y sus diferentes estadios (masa pro embriogénica, globular, corazón, torpedo y cotiledonar). Todas las placas se mantuvieron bajo luz blanca con un fotoperíodo de 16 h aproximadamente 26°C ± 1 °C.

Cuadro 1. Medios de cultivo para la inducción de embriogénesis somática directa en segmentos de hoja de *Coffea arabica* L. cv. Caturra.

Componentes (1L)	Yasuda (Yasuda et al., 1985)	SG(Vaddadi Sridevi & Giridhar, 2014)
	MS/4 + KH ₂ PO ₄ (42.5mg)	MS
Microelementos (100X)	MS/2 + Fe-EDTA/2	MS
Vitaminas MS	-	MS
Ácido Nítrico (mgL ⁻¹)	1	-
Piridoxina (mgL ⁻¹)	1	-
Tiamina (mgL ⁻¹)	10	-
Myo-inositol (mgL ⁻¹)	100	-
Hierro (Fe) EDTA	21.5	MS
BA (μM)	1	6.6
AIA (μM)	-	2.85
AgNO ₃ (μM)	-	40
Sacarosa (g)	30	30
Agar (g)	8	8

*Componentes según el medio Murashigue y Skoog (MS) (1962), autoclavado por 20 minutos a una presión de 2.06 kg/cm², a una temperatura de 121 °C y pH 5.6

** Los reguladores de crecimiento se agregan después del autoclavado.

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE GENES MEDIANTE qRT-PCR

Para determinar la expresión de los genes *LECI*, *BBM* y *WOX4*, relacionados con la ES, se tomaron muestras de los cultivos *in vitro* transcurridos 33, 64, 101 y 132 días, en el medio de inducción a ESD. En cada una de las fechas se esperaba hubiese una mayoría de embriones somáticos en uno de los diferentes estadios: masa pro embriogénica, globular, corazón, torpedo y cotiledonar. Como lo indica la figura 3, se colectaron 3 muestras de cada medio de cultivo en cada fecha de muestreo. De manera que se extrajeron 3 muestras biológicas de cada medio de cultivo disponibles para las pruebas posteriores. Luego se realizó una extracción de ARN y se cuantificó la cantidad de ARNm derivado de los genes de interés (Pfaffl, 2001). Se realizó una cuantificación relativa con respecto a un gen de referencia (ubiquitina 9): el *UBI9*. En la cuantificación relativa se realizaron 2 réplicas técnicas de cada muestra biológica.

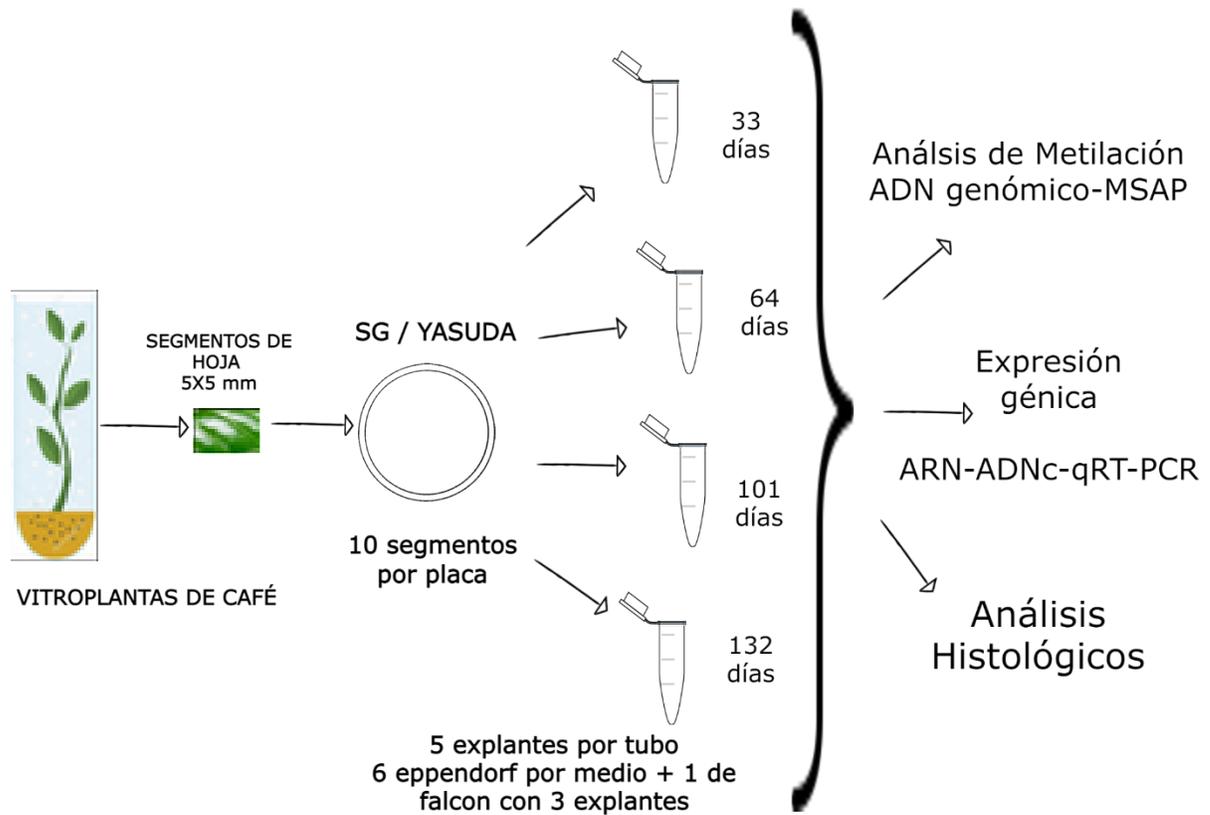


Figura 3. Representación esquemática de los muestreos y pruebas a seguir para el cumplimiento de los objetivos.

EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN se realizó siguiendo el protocolo descrito por Paula et al., (2012) con algunas modificaciones. Por cada 30 mg de tejido foliar se agregaron 300 μ L de Trizol (TRI Reagent T9424, Sigma). En primer lugar, cada muestra se maceró con nitrógeno líquido, hasta obtener una muestra homogénea. Luego, se dejó enfriar por 5 min en hielo, y se agregaron 100 μ L de cloroformo (por cada 300 μ L de Trizol), seguido a ello se centrifugó a 4000 rpm a 4°C por 20 min. De las tres fases obtenidas, se transfirió la fase superior a un tubo nuevo y se añadieron 100 μ L de isopropanol frío por cada 200 μ L transferido. Se volvió a centrifugar por 15 minutos a 12000 rpm a 4°C. Se extrajo el isopropanol para dejar el precipitado obtenido. Este último se resuspendió con 500 μ L de etanol (al 75% v/v y libre

de RNasas) y se centrifugó por 5 min a 12000 rpm. Finalizado esto, se removió el etanol y se dejó secar el precipitado a 37°C por 5 min. El precipitado se resuspendió con 60 µL de agua libre de RNasas y se le agregó 1 µL de DNasa I con 1 µL de Buffer con MgCl₂ (ThermoScientific®). Esto se incubó a 37°C por 1 hora. Finalmente, se añadió 1 µL de EDTA (ThermoScientific®) y se incubó a 60°C por 10 min. La concentración y calidad del ARN obtenido se determinó por medio de un Nanodrop marca ThermoScientific® modelo ND-2000C.

En cuanto a la calidad se determinó mediante un gel desnaturalizante con buffer MOPS (Barbosa de Paula et al., 2012).

SÍNTESIS DE ADNc

Para la síntesis de ADNc, se empleó 2 µL de ARN y 18 µL del RevertAid RT Reverse Transcription Kit (ThermoScientific®) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para resultados óptimos se trabajó en cámara de flujo laminar y se pipeteó en hielo todos los reactivos. Se realizó una primera incubación del ARN con el primer de cada gen (Cuadro 3) a 65°C por 5 min. Luego se agregó el Buffer, Riboblock los dNTPs y la RT y se sometió a las siguientes condiciones de incubación: 25°C por 5 min, 43°C por 60 min, 70°C por 10 min y se finalizó a 4°C. Para medir la cantidad de ADNc obtenido se cuantificó por medio de un Nanodrop marca ThermoScientific® modelo ND-2000C. Además, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1,2% m/v y los productos se separaron por 45 min a 100 V.

AMPLIFICACION DE GENES DE INTERÉS

Se analizaron específicamente los cambios en los niveles de expresión de los genes LEC1, BBM y *WOX4* con respecto al gen de referencia: el UBI9. Para ello, se utilizaron los primers descritos por Nic-Can et al (2013) y Goulao et al (2012) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Lista de primers utilizados para el análisis de expresión de los genes involucrados en la embriogénesis somática en café y primers del gen de referencia: UBI9

Gen	Primer	Secuencia (5-3)	Organismo	Referencia
<i>LEC</i>	LEC_1_F	atgatgagagcagcagagataagc	<i>C. canephora</i>	(Nic-Can et al., 2013)
	LEC_1_R	gggtagaggctcaatgtagtcat		
<i>BBM1</i>	BBM1_1_F	tacgttgcattttacgaaggaag	<i>C. canephora</i>	
	BBM1_1_R	Tatgagcatcceaagccatttcag		
<i>WOX4</i>	WOX4_1_F	ggagggacgaggtggaatcca	<i>C. canephora</i>	
	WOX4_1_R	tactaatgtagtggtgggggtgac		
<i>UBI9</i>	UBI9_1_F	aagaaggaattccccctgtg	<i>C. arabica</i>	(Cruz et al., 2009)
	UBI9_1_R	acctccacctctcagagcaa	<i>C. arabica</i>	(Cruz et al., 2009)

La amplificación se llevó a cabo utilizando el kit Applied Biosystems™ SYBR® Green PCR Master Mix (Thermo Scientific) con un volumen final de 25uL (Cuadro 3).

Cuadro 3. Componentes del RT qPCR.

Reactivo	1x μL
Agua	9.5
Master Mix	12.5
P _F	0.5
P _R	0.5
ADNc	2
Volumen final	25

El termociclador de tiempo real que se utilizó fue el StepOne 48 muestras (Applied Biosystems) el cual se programó para iniciar con una desnaturalización a 95°C por 2min, seguido por 40 ciclos de: desnaturalización a 95°C por 15 seg e hibridación a 60°C por 1 min; y finalizó con 1 ciclo de medición de fluorescencia continua desde 60°C hasta 95°C.

Se realizó una cuantificación de tipo Quantitation - Comparative CT ($\Delta\Delta$ CT) con SYBR-GREEN. Se obtuvo el valor C_T de cada uno de los genes. Este valor se normalizó con el valor del gen de referencia elegido para así obtener el valor de Δ C_T. Para el cálculo de la expresión génica relativa (RQ), se utilizaron los valores de $\Delta\Delta$ C_T relativa al control (Nic-Can et al., 2013). Para la estabilización de los datos se utilizó el Log₁₀.

Una vez obtenidos los resultados, estos fueron sometidos a un análisis estadístico ANOVA seguido de una prueba de Tukey.

ANÁLISIS DE LAS VARIACIONES DE METILACIÓN POR MSAP

Para poder analizar las variaciones de metilación en el proceso de ES, se buscaba comparar los patrones de metilación entre los diferentes muestreos de este proceso entre sí. Aunque si se lograron realizar las extracciones de ADN previos al análisis de MSAP, las digestiones, ligaciones y amplificaciones no fueron posibles debido a los cierres institucionales incluidos los laboratorios de la UCR como consecuencia de la pandemia provocada por el virus COVID-19.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico fue extraído de los segmentos de hojas cultivadas en las placas petri, utilizando el método del CTAB desarrollado por el CENIBiot. Se tomaron 50 mg de muestra en tubos de 2 mL, a los que se le agregaron 750 μ L de buffer de extracción (2% CTAB, 2%

PVP, 100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 0,2% mercaptoetanol, pH 8,0), precalentado a 65 °C. Luego, se mezclaron en vortex y se incubaron a 65 °C por 20 min, invirtiendo cada 10 min. Se agregaron 750 µl de una mezcla cloroformo: octanol (24:1) y después de homogenizar se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm. Se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un nuevo tubo de 1,5 ml y se le adicionaron 300 µl de isopropanol frío, lo que se agitó unas 20 veces. Después de esto, la muestra se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm y el sobrenadante se descartó. Se le añadieron 500 µl de etanol 70% (v/v) frío y se realizó una última centrifugación durante 5 min a 13000 rpm. El etanol se eliminó y el pellet depositado se secó a 40-45 °C por 30 min, el cual se resuspendió en 50 µL de TE 1X (10 mM Tris/HCl y 1 mM EDTA, pH 8,0). Finalmente, se agregó 1 µL de RNasa (ThermoScientific®).

El ADN obtenido fue cuantificado por medio de un Nanodrop marca ThermoScientific® modelo ND-2000C. Además, se le realizó el análisis electroforético para corroborar su calidad, en un gel de agarosa al 1% m/v por 45 minutos a 100V.

ANÁLISIS DE METILACIÓN DEL ADN TOTAL

Debido a las complicaciones de acceso a los laboratorios de la UCR generadas por aspectos de seguridad pública durante la pandemia provocada por el virus SARS-CoV-2, lamentablemente no se pudo continuar con el análisis de metilación de las muestras recolectadas durante esta investigación. Sin embargo, para efectos de análisis de resultados y discusión se tomaron los datos de la investigación 801-B5-708 paralela a esta de MSAP realizados previamente en café, los cuales si lograron llegar a término. Estos se analizaron siguiendo los mismos métodos que se iban a utilizar con los datos de esta investigación, con el fin de presentar el formato que se iba a utilizar en resultados y una posible discusión de los mismos.

Digestión y ligación

El protocolo de digestión utilizado fue una adaptación al de Reyna-López et al. (1997), ya que en lugar de la enzima *MseI* se utilizaron las enzimas sensibles a metilación: *HpaII* y *MspI*. Es decir, cada muestra de ADN genómico fue digerida en paralelo por cada una de estas enzimas (*EcoRI/HpaII* y *EcoRI/MspI*). Se realizó una primera digestión (cuadro 4), la cual se incubó por 3 horas a 37 °C.

Cuadro 4. Componentes digestión I MSAP.

Reactivo	1x
10X Tango Buffer (Thermo Scientific)	6 μ L
<i>EcoRI</i> (Thermo Scientific)	5U
MspI o de HpaII (Thermo Scientific)	10 U
ADN	500 ng
Volumen Final	30 μ L

Posteriormente, se realizó una segunda digestión junto con la ligación de los adaptadores con los componentes descritos en el cuadro 5, las secuencias de los adaptadores corresponden a las del cuadro 8. Estas reacciones fueron incubadas a 37°C por 3 horas, luego a 16°C por 2 horas y por último a 4°C durante toda la noche.

Cuadro 5. Componentes digestión II + ligación MSAP

Reactivo	1x
5Xbuffer	6 μ L
<i>EcoRI</i>	5 U
<i>MspI</i> o de <i>HpaII</i>	10 U
Adaptador- <i>EcoRI</i>	5pmol/ μ L
Adaptador H/M	50pmol/ μ L
ATP	10Mm
ligasaT4 DNA (1000U) (Thermo Scientific)	400U/ μ L
Volumen Final	40 μ L

La verificación de las reacciones de digestión y ligación se realizó por medio de un gel de agarosa al 1,2 M/V % en solución de TBE 1X y GelRed® a 95 voltios durante 45min.

Pre-amplificación

Para la pre-amplificación, los productos de la reacción anterior (digestión y ligación) fueron diluidos en agua desionizada sin DNasas a una concentración de 1/30. La reacción de pre-amplificación se llevó a cabo con los componentes descritos en el cuadro 6 (las respectivas secuencias de los imprimadores están en el cuadro 7) y se sometieron al siguiente perfil térmico: 94°C por 5min seguido por 28 ciclos de 94°C por 30s, 60°C por 1min y 72°C por 1min con una extensión final de 72°C por 15min.

Cuadro 6. Componentes de la Pre-amplificación MSAP

Reactivo	1x
Buffer PCR+MgCl ₂ 10X	3 µL
dNTPs (10mM)	0,6 µL
Eco+0 (10µM)	1,5 µL
H/M+0 (10µM)	1,5 µL
Taq polimerasa (5U/µL)	0,2 µL
dilución de 1/30 del ADN digerido	10 µL
Volumen Final	30 µL

Antes de proseguir con las amplificaciones selectivas, los resultados de las pre-amplificaciones se verificaron por medio de un gel de agarosa al 1,2 m/v% en solución de TBE 1X y GelRed® a 95 voltios durante 45min.

Cuadro 7. Secuencias de los adaptadores e imprimadores utilizados en las reacciones de ligación y pre-amplificación de MSAP.

Tipo de secuencia	Secuencia (5' a 3')
Adaptadores	
<i>EcoRI</i> -adaptadorI	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>EcoRI</i> -adaptadorII	5'-AATTGGTACGCAGTC-3'
<i>H/M</i> -adaptadorI	5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'
<i>H/M</i> -adaptadorII	5'-CGAGCAGGACTCATGA-3'
Imprimadores	
<i>EcoRI</i> +0	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>H/M</i> +0	5'-TCATGAGTCCTGCTCGG-3'

Amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva, los productos de la reacción anterior (pre-amplificación) fueron diluidos en agua desionizada libre de DNAsas a una concentración de 1/30 y se realizaron las 6 combinaciones indicadas en el Cuadro 8. La reacción de amplificación selectiva se llevó a cabo con los componentes descritos en el cuadro 10 y se sometieron al siguiente perfil térmico: 94°C por 5min seguido por 13 ciclos de 94°C por 30s, 65°C por 30s

(con una disminución de 0,7°C por ciclo), 72°C por 1min, seguido por 23 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 30s y 72°C por 1min con una extensión final de 72°C por 15min y 37°C por 3min.

Cuadro 8. Combinaciones de imprimadores selectivos utilizados en el MSAP.

Imprimador <i>EcoRI</i>	Imprimador <i>Hpa II/Msp I</i>
5'- GACTGCGTACCAATTC AAC-3'	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTAG-3' 5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'
5'- GACTGCGTACCAATTC ACA-3'	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTCA-3' 5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'
5'- GACTGCGTACCAATTC AGC-3'	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'
5'- GACTGCGTACCAATTC AGG-3'	5'-TCATGAGTCCTGCTCGGTGG-3'

Cuadro 9. Componentes de la Amplificación Selectiva MSAP

Reactivo	1x
Buffer PCR+MgCl ₂ 10X	2 µL
dNTPs (10mM)	0,4 µL
Eco+3 (10µM)	1,5 µL
H/M+3 (10µM)	1,5 µL
Taq polimerasa (5U/uL)	0,2 µL
dilución de 1/30 del ADN digerido	10 µL
Volumen Final	30 µL

Electroforesis capilar automatizada

Para poder analizar finalmente el nivel de metilación en el ADN, los productos de las amplificaciones se sometieron a una electroforesis capilar automatizada de alta resolución con el equipo QIAxcel Advanced System del CIBCM. Se realizaron dos repeticiones técnicas por cada una de las muestras, con cada combinación de primers. Se generaron geles utilizando el software incluido en el equipo QIAxcel Advanced System. Sin embargo, por problemas de apreciación de las bandas y desfase entre estas, debido a las diferentes fechas de corridas (se logró corroborar una constante en el desfase entre las corridas), se decidió recopilar los datos de peso y concentraciones y construir los geles en Excel de para eliminar ese desfase que se observaba en los geles generados por el equipo que dificultaban la lectura y la construcción de la matriz binaria.

Análisis de metilación del ADN

El primer paso de este análisis fue anotar las variaciones entre las bandas de estos geles en cada muestra, entre los productos tratados con *HpaII* y los tratados con *MspI*. Con esta información se creó una matriz de código binario en la que 1 significó presencia y 0 ausencia de banda.

Para el análisis estadístico de estos resultados se utilizó la librería *msap* del paquete estadístico R (versión 4.0.3), siguiendo las instrucciones descritas por Pérez-Figueroa (2013). La estrategia utilizada por esta librería está basada en el análisis independiente de ambos tipos de *loci*: fragmentos susceptibles a la metilación (MSL) o no susceptibles a la metilación (NML), de acuerdo a la presencia o ausencia de bandas. La clasificación se da de acuerdo a la proporción de estados metilados en todas las muestras, si esta excede el 5% (tasa de error), entonces el fragmento será clasificado como MSL, de lo contrario será NML (Pérez-Figueroa, 2013).

Tanto la variación genética (NML) como la epigenética (MSL) fueron estimadas por medio de un índice de diversidad de Shannon, el cual es calculado para cada uno de los loci. Para comparar las diversidades genéticas y epigenéticas según el tejido, se realizaron pruebas de Mann-Whitney-Wilcoxon. Además, la librería evaluó las similitudes genética y epigenética realizando un análisis de coordenadas principales (PCoA), el cual fue evaluado por medio de un análisis de varianza AMOVA (Pérez-Figueroa, 2013). La librería también proporcionó, por medio de la prueba de Mantel, un análisis de correlación entre MSL y NML (Pérez-Figueroa, 2013).

Los parámetros utilizados para el análisis MSAP con la librería msap fueron los determinados. Solo se especificaron la cantidad de loci por primer “*loci.per.primer*” de la siguiente manera: “> Mis_datos <- msap("Datos_binarios.csv", name = "Cafe", loci.per.primer=c(60,40,56,41,44,44))”

ANÁLISIS HISTOLÓGICO

En cada fecha de muestreo, se conservaron 3 explantes en 10 mL de Formaldehído-alcohol-ácido acético (FAA), para luego iniciar a prepararlas para una fijación.

El procesamiento de la muestra, consistió en aplicar lavados con distintas concentraciones de alcohol etílico (60%, 70%, 80%, 90% y 95% v/v) manteniendo la misma temperatura de 67°C. Seguido a esto se sumergirán en alcohol etílico 100% por 90 min y 60min con reposos de 10min.

Posteriormente se realizaron inmersiones en alcohol al 100% y Xilol 1:1 por 60 min. Luego se sumergieron en Xilol por 60 min en dos ocasiones. Seguidas, se sumergieron en Xilol y parafina/paraplast a 60°C dos veces para finalmente sumergirlas dos veces en parafina/paraplast a 60°C.

Una vez las muestras procesadas con Xilol y parafina/paraplast, cada una de ellas se colocó en un molde de inclusión plástico caliente y relleno de parafina. Con ayuda de unas pinzas y agua tibia, se colocó cada muestra de manera a que los bordes con embriones somáticos quedaran perpendiculares para estar disponibles a la hora de realizar los cortes. Ya las muestras en una posición correcta, se colocó un cassette sobre el molde y se terminó de rellenar con parafina/paraplast para luego refrigerarlas a -20°C.

Finalmente se separó cada bloque con las muestras, se le quitaron los excesos de parafina/paraplast y se realizaron los cortes con un micrótopo (marca SHURcut 2500) a un grosor de 4 µm a 7 µm. Los cortes se colocaron en un baño agua tibia para luego poder recolectarlos con un portaobjetos.

Obtenidos los cortes se procedió a teñirlos con dos tintes distintos. Una primera con hematoxilina de Harris para resaltar con color estructuras como membranas basales, glucógeno y mucinas. Y la segunda con el azul de toluidina, el cual tiene la capacidad de infiltrarse en la resina y llegar hasta el tejido por lo que es ideal para fotografías por medio de la microscopía electrónica (Megías M, Molist P, Pombal MA., 2019).

Para ello, para la tinción con hematoxilina de Harris se desparafinó la muestra y se hidrató con agua desionizada. Se le agregó Acido peryodico al 1% por 15 min y se volvió a lavar con agua desionizada. Luego se le agregó el reactivo de Shiff por 15 min. Después se lavó

de nuevo con agua de tubo. Se le colocó hematoxilina de Harris por un minuto y se volvió lavado. Finalmente se deshidrató con dos inmersiones en alcohol absoluto.

En cuanto a la tinción con el azul de toluidina, se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la Figura 4, eliminando la parte de agregarle calor a la muestra.

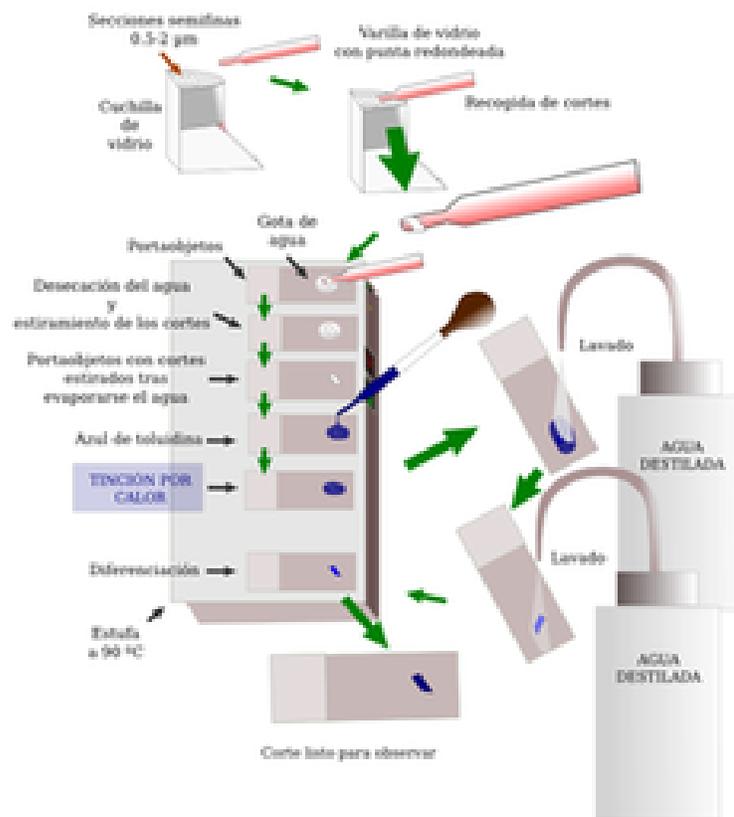


Figura 4. Procedimiento para la tinción con el azul de toluidina paso a paso (Megías , Molist , Pombal ., 2019)

Los cortes fueron microfotografiados con un microscopio óptico de luz (marca Amscope) utilizando un aumento de 4X y 10 X.

RESULTADOS

DISTINTOS MEDIOS DE CULTIVO PARA LA INDUCCIÓN DE ESD DE CAFÉ (*C. arabica* cultivar *Caturra*)

En el primer muestreo realizado a los 33 días (Figura 5 A y B), se observó solamente el engrosamiento en los bordes de los explantes. Durante esta etapa, en el corte histológico (Figura 8 A), se logra observar la diferencia entre tejidos, y poniéndola tinción pone en evidencia zonas de aglomeración celular.

Para ambos medios de cultivo evaluados, los primeros pseudo-embriones (Figura 6, flecha azul) y embriones somáticos en estado globular (Figura 6, flecha roja), se observaron a los 64 días de cultivo (Figura 5 C y D). Los pseudo-embriones se caracterizan por la aparición de protuberancias en el borde de la hoja, en las cuales se observa la acumulación celular en el corte histológico (Figura 8 B). Por su parte, el estado globular se caracteriza por la separación de la masa embriogénica del tejido foliar (Figura 8 C).

En ambos casos, a los 101 días los explantes presentaban un aumento tanto en el número de embriones por explante como la cantidad de explantes con embriones (Figura 5 E y F). A los 132 días de cultivo se lograron observar embriones en estadio torpedo (Figura 8 D) y cotiledonar (Figura 5 G y H).

El proceso de ESD se caracterizó por ser asincrónico, es decir, en una misma placa Petri algunos explantes podían tener varios embriones mientras otros ninguno (Figura 6, flecha amarilla). Asimismo, en un mismo explante se observaron embriones somáticos en distintos estadios de desarrollo. Tal y como se logra observar en la Figura 7, el explante presenta varios embriones globulares señalados con la flecha azul, y un embrión en estado cotiledonar señalado con la flecha roja.

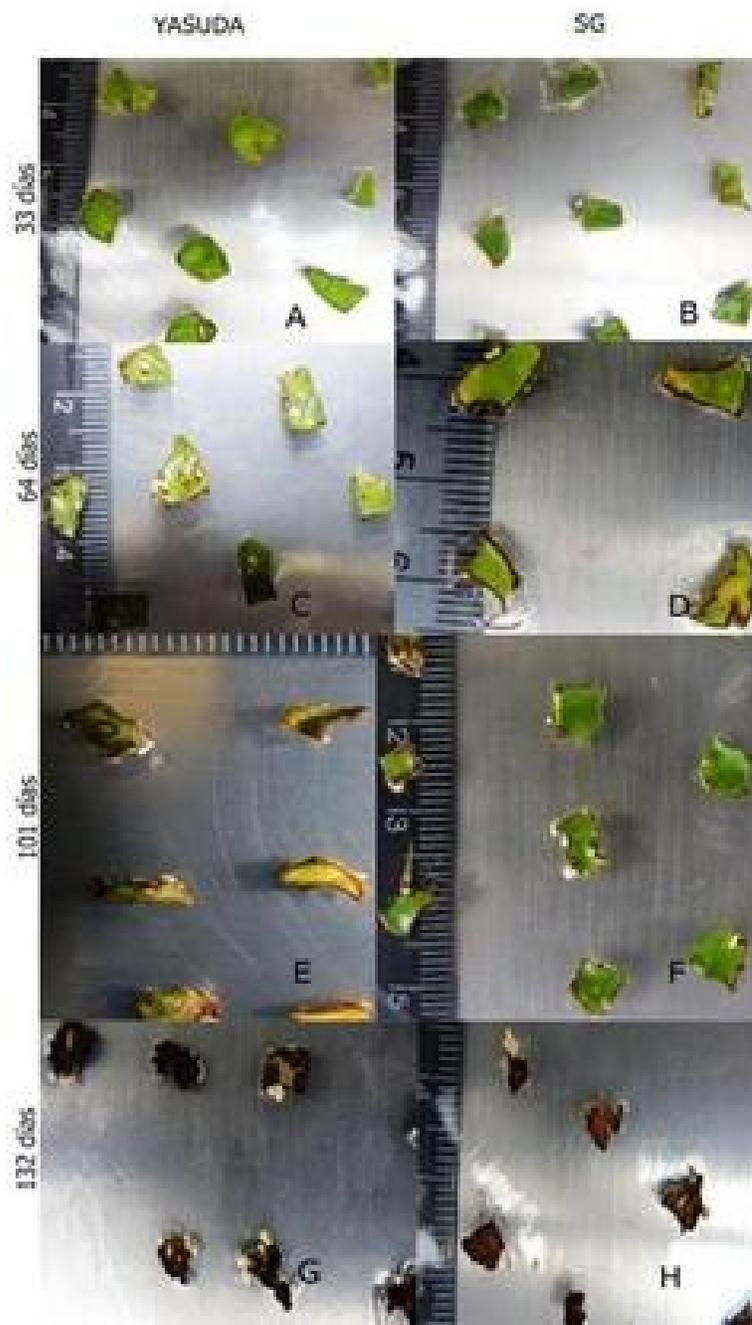


Figura 5. Proceso de embriogénesis somática directa en las distintas fechas de muestreo de segmentos de hoja de *C. arabica* cultivar Caturra en los dos distintos medios de cultivo Yasuda (A, C, E y G) y SG (B, D, F y H). El primer muestreo realizado a los 33 días de cultivo (A y B). La segunda fecha de muestreo realizada a los 64 días (C y D). Tercera fecha de muestreo realizada a los 101 días (E y F). Y muestreo final a los 132 días (G y H).

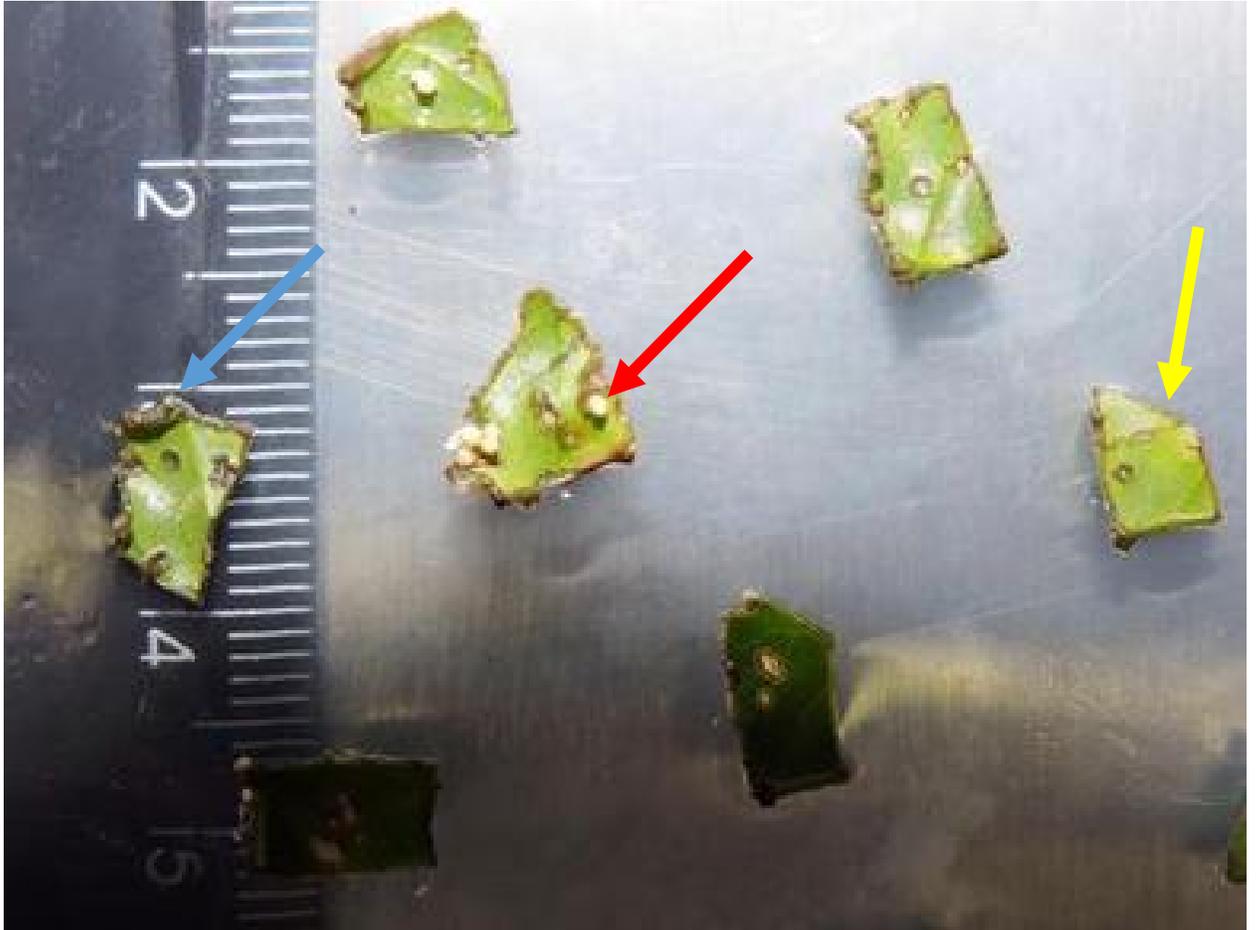


Figura 6. Embriones somáticos inducidos a los 64 días de cultivo de los explantes de *C. arabica* cultivar Caturra en el medio de ESD Yasuda. Se observan explantes con hasta 6 embriones y otros sin ningún embrión aún. Flecha azul: pseudo embriones, flecha roja: embrión en estado globular, flecha amarilla: explante sin embriones.



Figura 7. Embriones somáticos inducidos a los 101 días de cultivo de los explantes de *C. arabica* cultivar Caturra en el medio de ESD Yasuda. Se observan diferentes estadios embrionales en un mismo explante. Embrión en estado globular (flecha azul) y en estado cotiledonar (flecha roja).

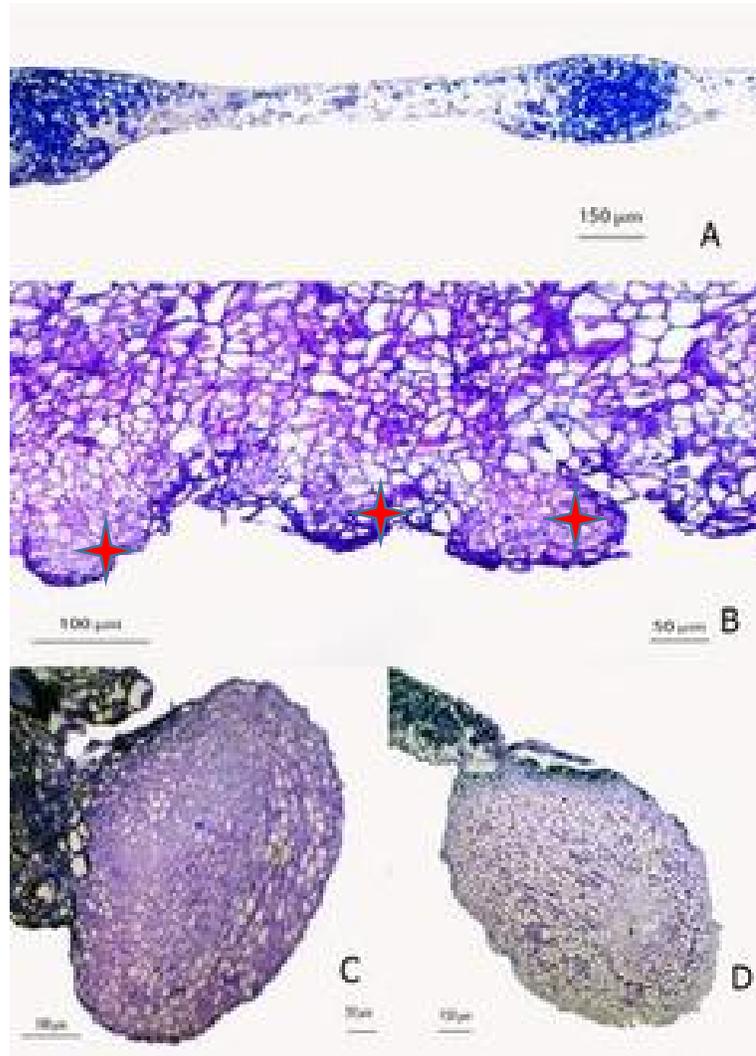


Figura 8. Cortes histológicos de diferentes estadios de desarrollo de *C. arabica* L, cultivar Caturra durante la embriogénesis somática directa. A) Corte transversal de explante con estado formación de callo embriogénico a los 33 días de cultivo en el medio Yasuda (4X). B) Corte transversal de explante el cual presenta pseudo-embriones (cruz roja) a los 101 días de cultivo en el medio Yasuda (10X). C) Corte transversal de embrión en estado globular a los 101 días (4X). D) Corte transversal de embrión en estado torpedo a los 132 días de cultivo en el medio Yasuda (10X).

En cuanto a la efectividad de cada medio de cultivo evaluado para la inducción a la ESD y formación de embriones somáticos, se promedió cada una de las fechas de muestreo. De acuerdo a los promedios obtenidos (Cuadro 10), el mayor promedio de explantes con embriones y promedio de embriones por explante, independientemente de las fechas de muestreo, se obtuvo con el medio Yasuda et al. (1985).

Cuadro 10. Promedio de explantes con embriones y promedio de cantidad de embriones por explante en cada medio de cultivo y fecha de muestreo.

Medio de cultivo	Días en cultivo	Promedio de explantes con embriones \pm DE	Prueba Tukey explantes con embriones	Promedio de embriones por explantes \pm DE	Prueba Tukey embriones por explante
Yasuda	33	0.000 \pm 0.00	0 (p=1.99)	0.000 \pm 0.00	0 (p=1.99)
SG	33	0.000 \pm 0.00		0.000 \pm 0.00	
Yasuda	64	0.98 \pm 1.64	-0.18 (p=1.98)	0.615 \pm 1.01	-0.28 (p=1.98)
SG	64	0.56 \pm 1.17		0.51 \pm 1.00	
Yasuda	101	2.474 \pm 2.39	-0.37 (p=2.02)	1.53 \pm 1.35	-0.39 (p=2.02)
SG	101	1.348 \pm 2.39		1 \pm 1.54	
Yasuda	132	2.769 \pm 2.31	0.05 (p=2.04)	2.5 \pm 1.51	0.99 (p=2.03)
SG	132	1.105 \pm 2.13		0.63 \pm 0.96	

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LEC1, BBM Y WOX4 DURANTE LA ESD EN CAFÉ

EXTRACCIÓN DE ARN

El Nanodrop nos permitió conocer la concentración obtenida de esta extracción y así determinar si era necesaria alguna dilución para la síntesis del ADNc (Cuadro 11). La calidad de ARN, indicada por la relación 260/280, fue en su mayoría cercana a lo teóricamente esperado, es decir 1.8. En cuanto a la pureza, dada por la relación 260/230, en todos los casos fue significativamente menor a lo esperado (2.0 – 2.2) (Cuadro 11).

	Concentración ácido nucleico (ng/ μ L)	260/280	260/230
33	324.1	1.85	0.73
64	371.1	1.91	0.72
101	129.8	1.62	0.37
132	168.9	1.47	0.26
33''	282.8	1.82	0.63
64''	305.2	1.84	0.69
101''	276.7	1.67	0.50
132''	134.0	1.51	0.50

*Las comillas (") representando las réplicas biológicas

La integridad del ARN total extraído de los explantes de café se evaluó mediante un gel de agarosa desnaturalizante. Como resultado, se observaron dos bandas claras, las cuales corresponden a 28S y 18S; además, no se observó degradación (Figura 9).



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa (1%) desnaturalizante con buffer MOPS(10X) con el ARN extraído de cada fecha de muestreo (33 días, 64 días, 101 días y 132 días y réplicas biológicas). M: marcador molecular (FERMENTAS) (100 pb).

SINTESIS DE ADNc

Para cada uno de los ARN correspondientes a cada fecha de muestreo y cada replica biológica, al realizar la síntesis de ADNc y su posterior verificación en un gel de agarosa, se observó un barrido en el mismo (Figura 10).



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa (1,2% m/v) por 45 min a 100 V con el ADNc de cada fecha de muestreo (33 días, 64 días, 101 días y 132 días y réplicas biológicas), M: marcador molecular (100 pb) y un CP: Control positivo (se cambiaron los primers por primers de cloroplastos).

La cuantificación de la concentración del ADNc sintetizado se muestra en el Cuadro 12. Se obtuvieron diferencias en la concentración en cada una de las muestras y en cada replica; por lo que, la concentración se ajustó a la obtenida en la muestra 132. La calidad de ADN, indicada por la relación 260/280, fue en su mayoría cercana a lo teóricamente esperado, es decir 1.8, con la única excepción de la muestra 132". En cuanto a la pureza, dada por la relación 260/230, en todos los casos fue significativamente menor a lo esperado (2.0 – 2.2)

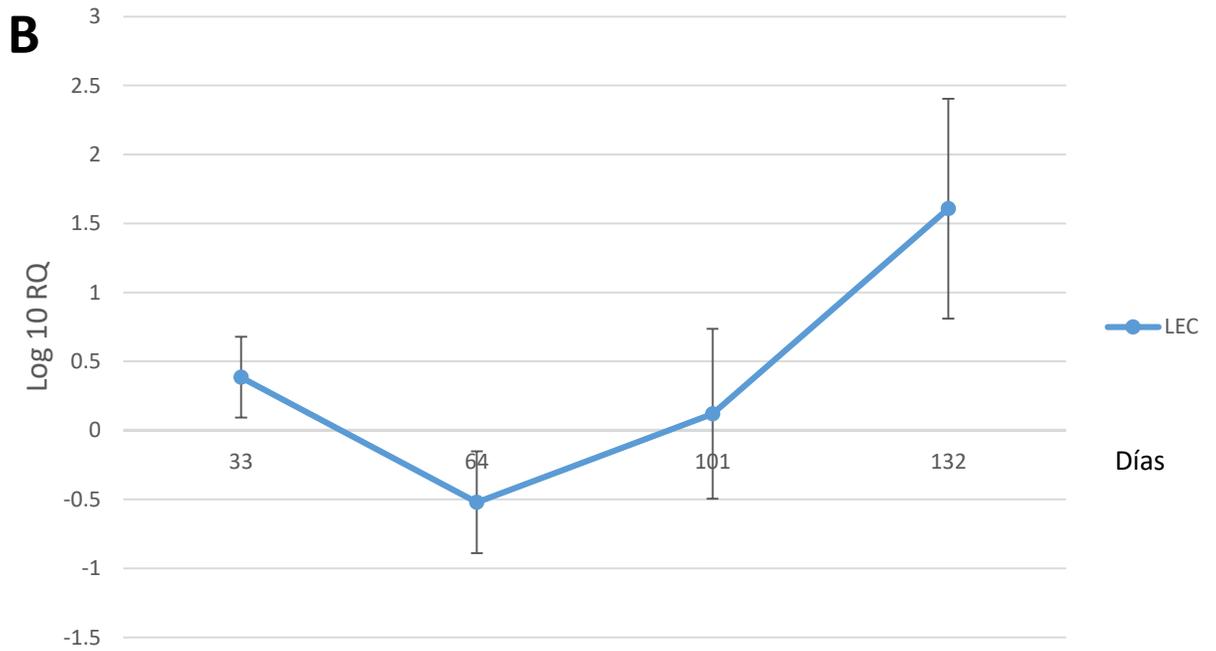
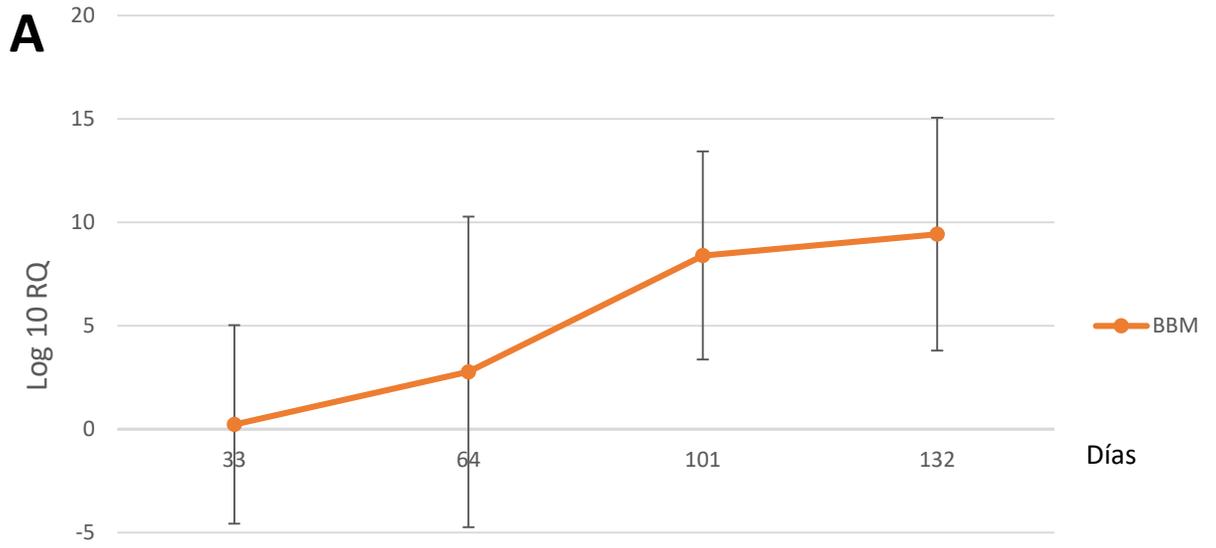
	Concentración Acido Nucleico (ng/ μ L)	260/280	260/230
33	284.6	1.82	0.63
64	288.6	1.86	0.70
101	120.7	1.84	0.71
132	160.3	1.57	0.17
33''	252.4	1.85	0.73
64''	362.1	1.91	0.72
101''	155.7	1.74	0.44
132''	103.6	1.48	0.18

*Las comillas (") representando las réplicas biológicas

EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE LOS GENES *LEC*, *BBM* Y *WOX4* EN CAFÉ

El análisis de expresión diferencial buscaba examinar la expresión de los genes *LEC1*, *BBM* y *WOX4* en los diferentes muestreos realizados durante el proceso de la ESD en café en el medio de cultivo Yasuda et al. (1985). Para dicho análisis se tomaron las muestras extraídas del medio de cultivo Yasuda.

Los niveles de expresión se evaluaron comparando los ΔC_t obtenidos en las qRT-PCR de cada gen con respecto al ΔC_t basal del housekeeping *UB19* en un tejido control, el cual en este caso fue una hoja proveniente de vitroplantas. Con ello, se obtuvo un análisis de expresión relativa y los resultados obtenidos se resumen en la Figura 12. Tal como se observa, en el caso de la expresión del gen *BBM*, esta fue en aumento durante todo el proceso de ESD. Este gen pasó de expresarse solo 0.23 veces más que *UB19* a los 33 días, casi triplicar su expresión a los 64 días (2.8 veces más que *UB19*), para finalmente llegar a expresarse 9.4 veces más que *UB19* en la última fecha de muestreo (Figura 11.A). Por su parte la expresión de los genes *LEC1* (Figura 11.B) y *WOX4* (Figura 11.C) en las primeras etapas disminuyeron su expresión y conforme avanza el desarrollo de los embriones, es decir transcurridos, 101 a 132 días en el medio de cultivo su expresión va en aumento. En la primera fecha de muestreo, los 3 mostraron una expresión similar (*LEC* 0.4 y *WOX4* 0.6 veces mayor a *UB19*). En la segunda fecha, la expresión de *LEC* y *WOX4* más bien disminuyó 0.5 y 1.4 veces la expresión de *UB19*. Sin embargo, en la siguiente fecha ambos aumentaron su expresión hasta lograr expresarse 1.6 y 5.6 veces más que *UB19* en la última fecha de muestreo (Figura 11).



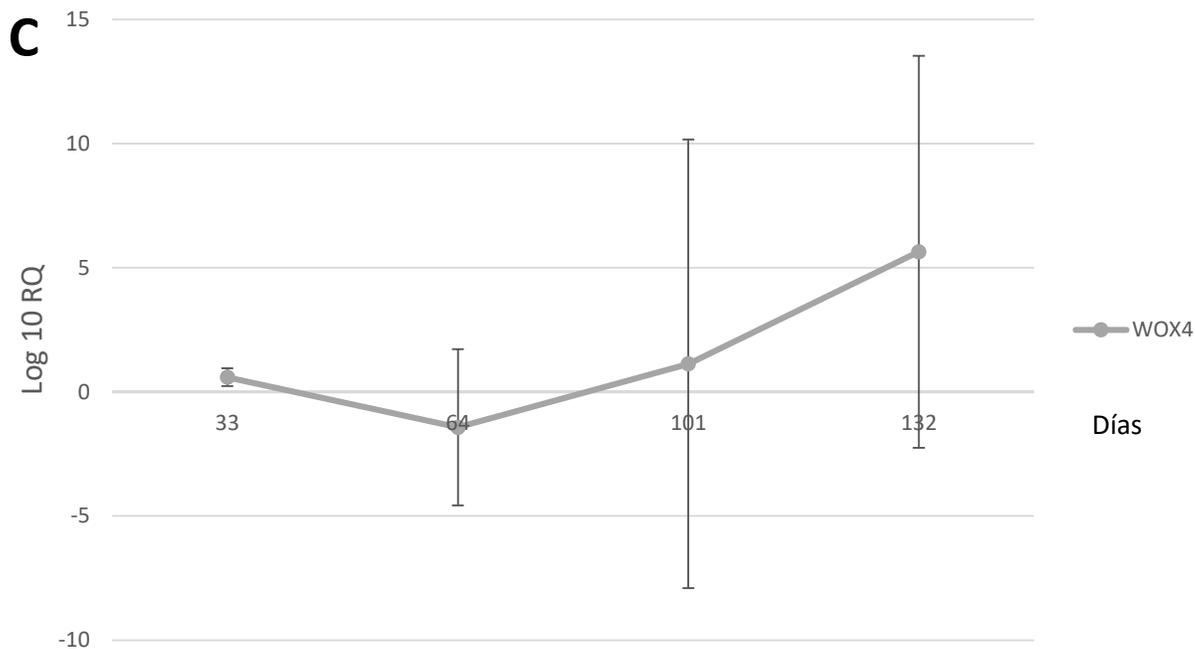


Figura 11. Expresión genética relativa (RQ) de los genes *BBM* (A), *LEC1* (B) y *WOX4* (C) y sus respectivas desviaciones estándares, con respecto a *UBI9* durante la ESD de *C. arabica* L. cv. Caturra.

En cuanto a las diferencias entre cada una de las fechas de cada uno de los genes, con el análisis de varianza (ANOVA), se logró determinar que las diferencias fueron significativas ($p < 0.0001$).

Sin embargo, las desviaciones estándares de la expresión relativa son muy amplias en todos los casos, por ende, en todos los casos se obtuvo coeficientes de variación muy amplios (Cuadro 13).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los coeficientes de variación (CV) en todos los casos fueron muy altos (Cuadro 13) y la expresión relativa de estos genes en cada una de las fechas de muestreo fue significativamente distinta. Aún con esa variación, se logró determinar que la expresión relativa del gen *BBM* fue significativamente diferente a la de *LEC1* y *WOX4*, quienes tuvieron una expresión similar durante todo el proceso de ESD, excepto en la última fecha de muestro en donde la expresión relativa fue significativamente distinta entre los 3 (Figura 11).

Cuadro 13. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación (CV) de la expresión relativa de 3 genes, en cada fecha de muestreo durante la ESD de *C. arábica* cv. Caturra.

Gen	Días	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación (%)
LEC	33	3.12	2.67	85.39
LEC	64	0.43	0.38	88.50
LEC	101	3.65	5.46	149.78
LEC	132	173.11	289.78	167.40
BBM	33	1055.0	1216.6	115.3
BBM	64	4.94E+11	8.76E+11	177.2
BBM	101	1.63E+11	1.30E+11	80.0
BBM	132	1.43E+14	3.42E+14	239.9
WOX4	33	5.16	3.46	67.05
WOX4	64	4.64	5.87	126.42
WOX4	101	5.48E+09	5.63E+09	102.76
WOX4	132	6.96E+12	1.21E+13	173.15

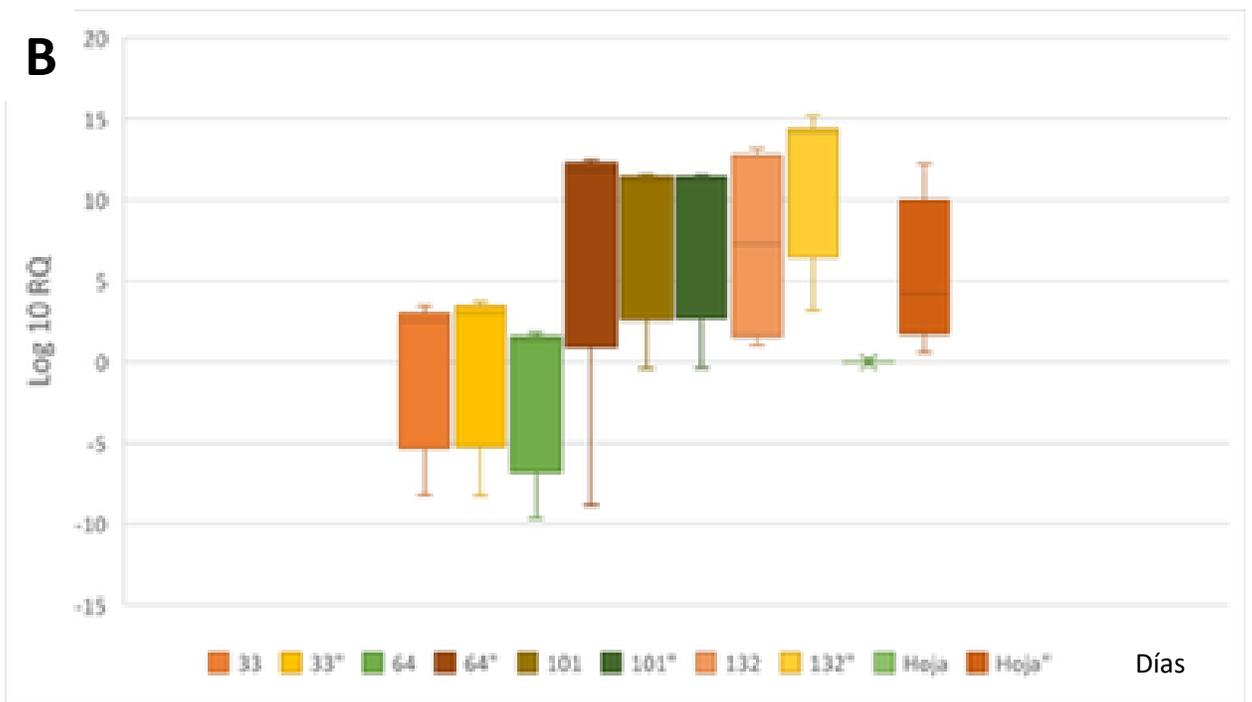
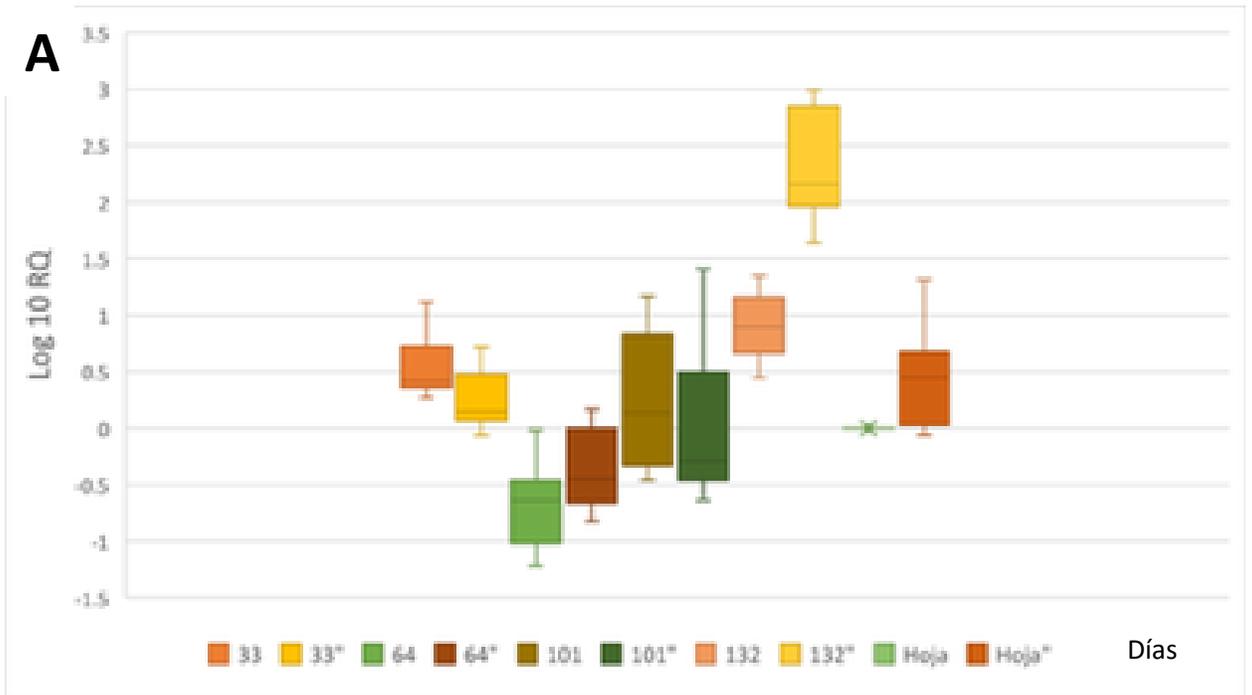
Por ello se realizó otro ANOVA, analizando las diferencias del RQ de cada uno de los genes en cada fecha de muestreo. De manera tal que se pudiese confirmar que las diferencias observadas en la figura 13 entre los genes fuese significativa. Y efectivamente lo fue ($p < 0.0001$). Además, se realizó la prueba Tukey (Cuadro 14), en la que se confirma las diferencias entre la expresión relativa de BBM y los otros dos genes en las 3 últimas fechas de muestreo.

Cuadro 14. Resultado de la prueba Tukey de las diferencias de la expresión relativa (RQ) de cada gen en cada una de las fechas de muestreo.

Genes	Promedio de diferencia a los 33 días	Promedio de diferencia a los 64 días	Promedio de diferencia a los 101 días	Promedio de diferencia a los 132 días
<i>BBM-LEC1</i>	0.15 (p=0.94)	3.3 (p=0.0003)	8.3 (p<0.0001)	7.82 (p<0.0001)
<i>BBM-WOX4</i>	0.34 (p=0.75)	4.2 (p<0.0001)	7.3 (p<0.0001)	3.8 (p=0.0005)
<i>LEC-WOX4</i>	0.20 (p=0.90)	0.91 (p=0.52)	1.0 (p=0.60)	4.03 (p=0.0002)

También se analizó por separado cada replica biológica (Figura 12) y cada replica técnica (Figura 13). Lo que permitió observar en cuales replicas se obtuvieron mayores diferencias. En el caso de la replicas biológicas, se logró observar, para los 3 genes que, en la mayoría

de las fechas de muestreo, el nivel de expresión con respecto a *UBI9* fue muy variable o se obtuvo una desviación estándar muy amplia (Figura 11). Sin embargo, se logró observar una tendencia en los cambios de esos niveles de expresión que se evidencia de manera más clara en la Figura 10. Por otro lado, al analizar las réplicas técnicas se observa que no solo los resultados son significativamente distintos, sino que en algunos casos hasta con niveles de expresión opuestos, sobre todo para el caso de la expresión del gen *WOX4* (Figura 13.C). Se observa que la mayor diferencia ocurre entre las réplicas técnicas. En el caso de las réplicas técnicas de las muestras hechas a los 101 días de ESD, tanto para el gen *LEC1* (Figura 13.A) como para el gen *BBM* (Figura 13.B) la expresión relativa es contradictoria. En una réplica se sobreexpresa y en la otra su expresión es menor que el gen *UBI9* (Figura 13).



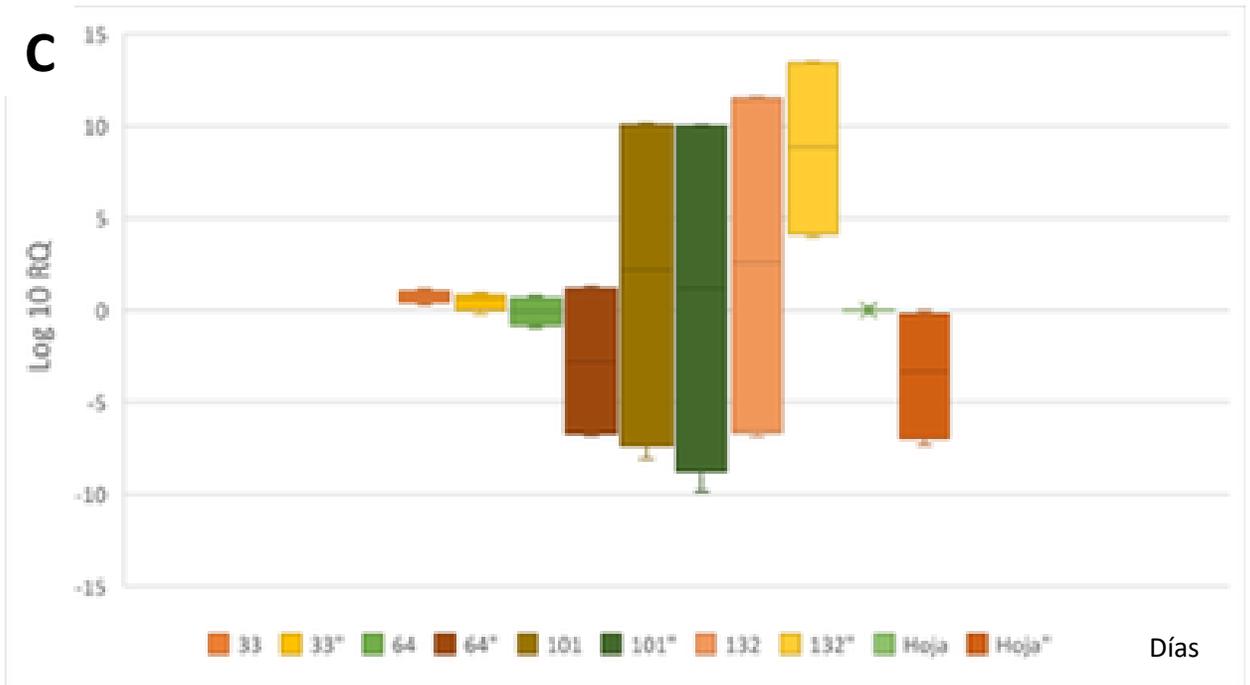
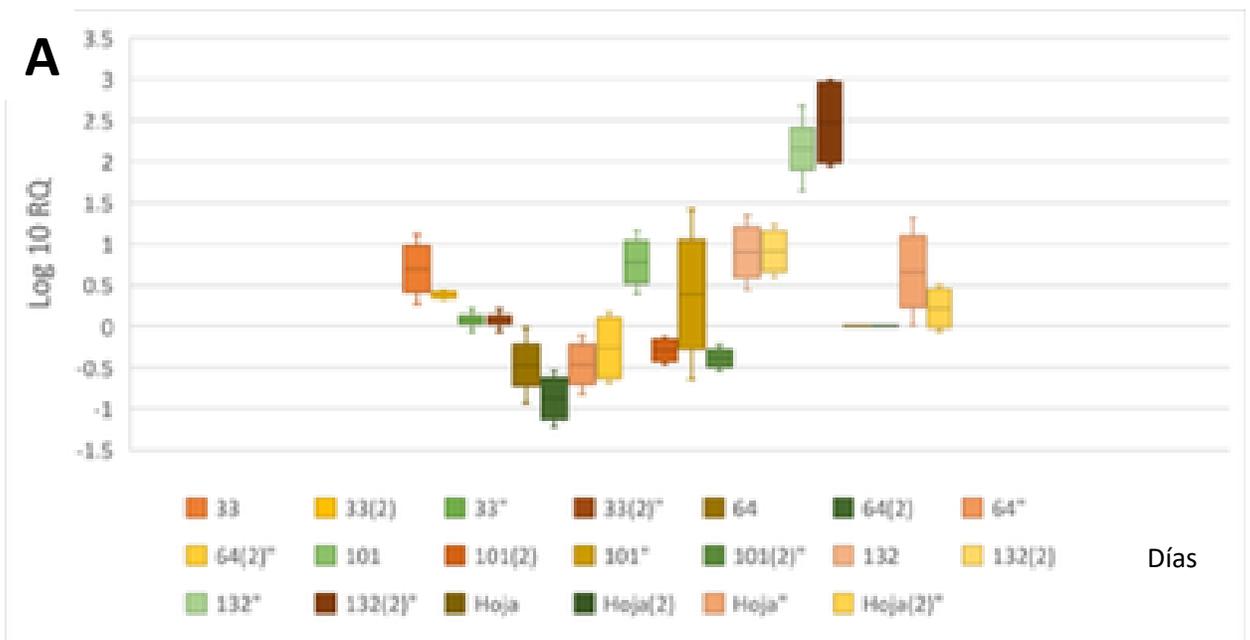


Figura 12. Expresión relativa y desviación estándar de *LEC1* (A), *BBM* (B) y *WOXA* (C) y cada réplica biológica obtenida en las qRT-PCR realizadas. Las réplicas biológicas representadas con comillas.



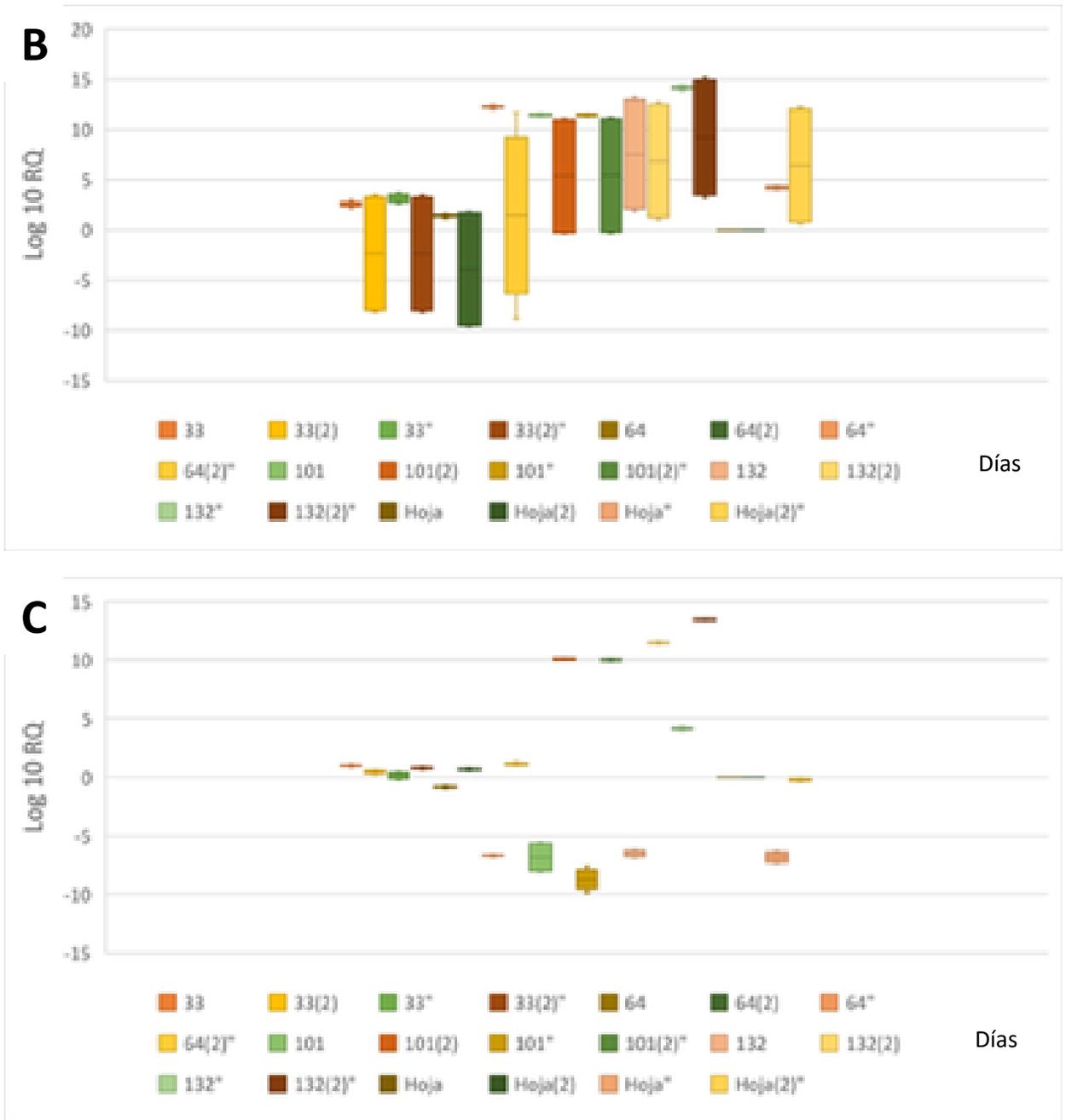


Figura 13. Expresión relativa y desviación estándar de *LEC1* (A), *BBM* (B) y *WOX4* (C) y cada réplica técnica obtenida en las qRT-PCR realizadas. Las réplicas técnicas representadas con un 2 y las réplicas biológicas representadas con comillas.

	Concentración Acido Nucleico (ng/μL)	260/280	260/230
33	550.7	1.80	1.43
64	746.3	1.73	1.19
101	319.1	1.74	1.05
132	642.3	1.73	1.17
33''	473.6	1.76	1.24
64''	605.6	1.73	1.21
101''	354.2	1.72	1.06
132''	237.8	1.58	0.73

Por medio de la electroforesis, se determinó que el ADN obtenido no presentaba degradación, por lo tanto, se observaron bandas claras y de alto peso molecular (Figura 14).

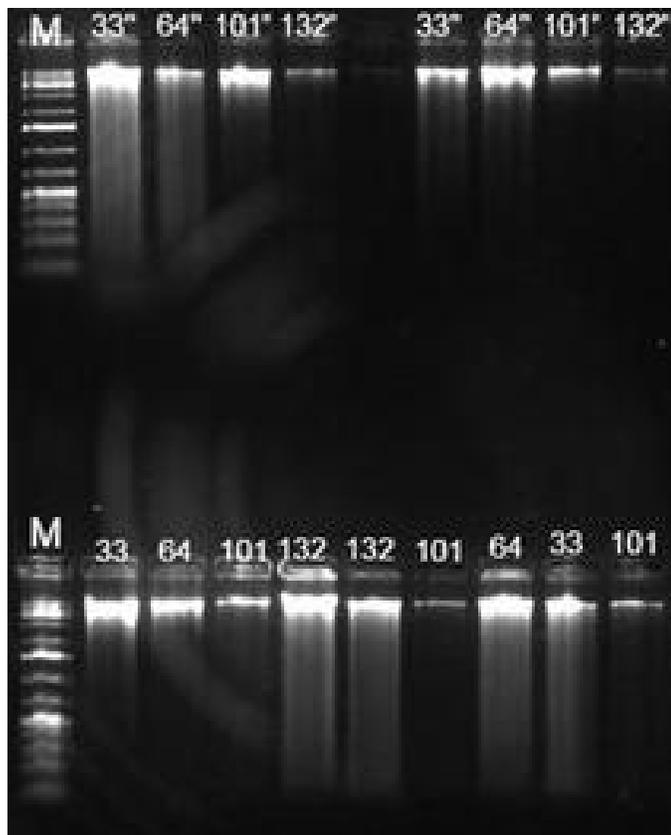


Figura 14. Electroforesis de ADN extraído de cada fecha de muestreo (33 días, 64 días, 101 días y 132 días y réplicas biológicas) y un marcador molecular M (100pb).

ANÁLISIS EPIGENÉTICO

De acuerdo a los resultados obtenidos en la electroforesis capilar automatizada y la construcción de la matriz de datos binarios, se obtuvo un total de 285 loci (loci obtenidos en cada combinación:60, 40, 56, 41, 44, 44) en las combinaciones (Cuadro 8) que presentaron una tasa de error inferior al 5%. Al correr el análisis del paquete *msap* en R, se obtuvo un 82.8% (236 loci) catalogados como loci sensibles a la metilación (MSL) de los cuales el 56% presentó polimorfismo, y un 17.2% (49 loci) no sensibles a la metilación (NML), de los cuales el 31% presentó polimorfismo.

De los resultados totales del análisis de metilación, en el Cuadro 16 se detallan las proporciones de loci sensibles a la metilación (MSL), loci no metilados y loci no sensibles a la metilación (NML) que se obtuvieron para cada uno de los tejidos analizados. En este caso,

la hoja presentó el porcentaje más alto de loci sensibles a la metilación con un 38 % (Hemimetilado + Metilación en citosina interna), seguido del callo no embriogénico. Por su parte el embrión somático, fue el tejido en presentar menor MSL y mayor loci hipermetilados o con ausencia de objetivo.

Cuadro 16. Resultados del análisis de metilación (MSAP) de ADN genómico total en diferentes tejidos de *C. arabica* L. cv Catuaí.

Nivel de metilación	Tipo de Tejido Vegetal			
	Callo	Callo no embriogénico	Embrión somático	Hoja
HPA+/MSP+ (No metilado)	0.2267	0.2415	0.2288	0.1801
HPA+/MSP- (Hemimetilado)	0.1441	0.1419	0.1356	0.2309
HPA-/MSP+ (Metilación en citosina interna)	0.1208	0.1589	0.1144	0.1525
HPA-/MSP- (hipermetilación o ausencia de objetivo)	0.5085	0.4576	0.5212	0.4364

*MSL=Hemimetilado + Metilación en citosina interna y NML= hipermetilación o ausencia de objetivo

De acuerdo al índice de diversidad de Shannon calculado, la diversidad epigenética (MSL) fue de un 0.59 (SD=0.11) y la diversidad genética de 0.50 (SD=0.11). Tanto la cantidad de loci sensibles a la metilación como los no sensibles a la metilación obtuvieron una diversidad alta. Sin embargo, estas fueron significativamente distintas de acuerdo al Wilcoxon Rank Sum test ($W=1443$ $p=0.003$), por lo tanto, la diversidad en la cantidad de loci sensibles a la metilación fue mayor.

Por otro lado, gracias a la prueba de Mantel entre las matrices MSL y NML, se logró determinar que las variaciones epigenéticas (MSL) y las variaciones genéticas (NML) entre los diferentes tejidos, no están relacionadas estadísticamente ($r = 0.2549493$, $p= 0.171$; $nperm=10000$).

En el caso de las variaciones epigenéticas (MSL), según el análisis molecular de varianza (AMOVA), un 25.33% de la variación total es explicada por las diferencias dentro de cada tipo de tejido vegetal analizado ($\phi_{STMSL}=0,16$, $p=0,02$). Sin embargo, se observa en un PCoA (Figura 15), una distancia entre el callo no embriogénico y el resto de los tejidos.

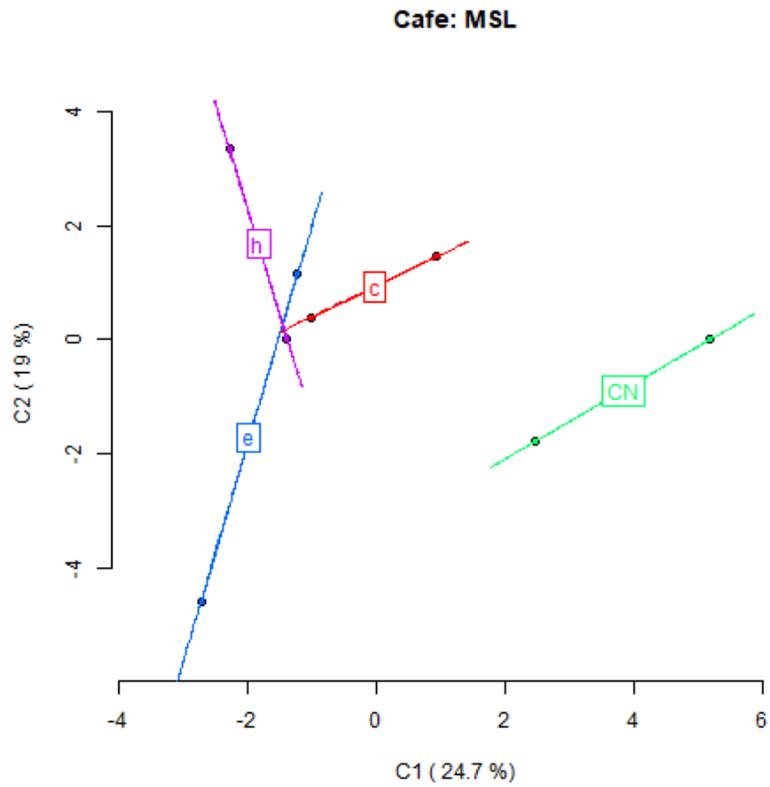


Figura 15. Análisis de coordenadas principales (PCoA) según tejido vegetal. En paréntesis a la par de cada coordenada se muestran los porcentajes de varianza. Cada uno de los puntos representa muestras individuales (rojo: callo embriogénico, verde: callo no embriogénico, azul: embrión somático, lila: hoja). Las etiquetas indican el centroide de puntos para cada tipo de tejido vegetal.

DISCUSIÓN

MEDIOS DE CULTIVO EVALUADOS PARA LA INDUCCIÓN DE LA ESD EN CAFÉ

Los resultados obtenidos de 2.39 explantes con embriones y 1.54 embriones por explante de la ESD en el medio Yasuda et al. (1985), en promedio fueron más exitosos que los obtenidos en el medio SG (Sridevi & Giridhar, 2014). Si bien estadísticamente no hubo diferencias entre medios, el número de embriones en el medio de cultivo Yasuda fue mayor al de SG. Cabe también recalcar que, en cada fecha la población total era distinta, en cada muestreo se extraían un total 33 explantes, se eliminaban las placas contaminadas y explantes muy oxidados. Por lo tanto, los resultados no eran comparables entre sí, más que por fechas como datos independientes. Por otra parte, aunque si se lograron obtener embriones somáticos, la cantidad fue muy baja en comparación con la efectividad del mismo medio y misma variedad de café obtenida en otras investigaciones (Gatica et al., 2007; Gatica, Arrieta, et al., 2008). En estas, los investigadores lograron obtener un resultado hasta 6 veces mayor al resultado obtenido en la presente investigación.

A pesar de su baja efectividad, este resultado sigue siendo aún más rápido que la embriogénesis somática indirecta (ESI)(requiere la formación de callos embriogénicos), la cual puede requerir un aproximado de hasta 5 meses para poder empezar a obtener los primeros estadíos de los embriones (Etienne et al., 2012). Y, de acuerdo al protocolo publicado por Etienne (2005), con la ESI, *C.arabica* tarda entre 9 y 10 meses en lograr una frecuencia alta en producción de embriones somáticos. En cambio, en esta investigación, como se mencionó, los primeros embriones se obtuvieron a los 64 días en cultivo. Además, en la ESI, el medio de cultivo para la inducción de callos embriogénicos es distinto al utilizado para la inducción a embriones somáticos, por lo que es más propenso a contaminación o variaciones de los resultados debido a la manipulación (Campos et al., 2017; Muniswamy et al., 2017). En esta primera etapa, de la ESI los callos embriogénicos producidos tienden también, a aumentar la presencia de variaciones somaclonales debido también a la manipulación y a los largos periodos en un mismo medio de cultivo (Campos et al., 2017).

En cuanto a las ventajas de los medios de cultivo por sus componentes, se ha reportado que los reguladores de crecimiento como la auxina (AIA), juegan un papel muy importante en la activación de enzimas que liberan oligosacáridos, los cuales de manera indirecta o directamente regulan los procesos fisiológicos de la planta (Nieves et al., 2006). Sin embargo también se ha reportado que las auxinas afectan negativamente el desarrollo del embrión por lo que se recomienda eliminarlo del medio después de la multiplicación de las células

totipotenciales y así permitir la diferenciación celular (Campos et al., 2017). Por su parte, la utilización de nitrato de plata en distintas aplicaciones biotecnológicas pareciera tener éxito. Su utilización en la propagación clonal de otras especies vegetales, como el tamarindo y la guayaba (*Tamarindus indica* y *Psidium guajava*) (Giridhar et al., 2003; Sridevi & Giridhar, 2014), lo convierten en componente prometedor en el medio de inducción de ESD en café. Si bien ya hay reportados trabajos con resultados positivos en *Coffea dewevrei* (Sridevi et al., 2010; Sridevi & Giridhar, 2014), en estos mismos se hace la aclaración que la concentración del mismo podría generar resultados contraproducentes, es decir reducir la producción de embriones somáticos a un 0%. Por lo tanto, si bien el medio de cultivo SG presentaba una mayor concentración de reguladores de crecimiento, su continua presencia en el medio, más el nitrato pudo haber causado la desventaja en la producción de embriones en las últimas fechas de muestro.

Otro aspecto que pudo influir en la baja producción de embriones somáticos, fue la oxidación de los explantes. Esta, en algunos explantes ocurrió muy temprano durante la ESD y en otros hasta detenía el desarrollo de los embriones somáticos. Esto no es una problemática únicamente en la ES en café, sino que ha sido reportado también en cultivos muy comerciales como la fresa (*Fragaria X ananassa Duch*), *Pinus virginiana*, *Annona cherimola* Mill, aguacate (*Persea americana* Mill), mango (*Mangifera indica* L.), la carambola (*Averrhoa carambola* L.) y la papaya (*Carica papaya* L.) entre otras (Azofeifa-Delgado, 2008; Cuevas & Salaverría, 2004; Hernández & González, 2010; López-Gómez et al., 2010; Villegas F et al., 2008). La muerte de los explantes ocurre debido a la oxidación por radicales libres, entre ellos la oxidación de componentes fenólicos catalizado por la enzima polifenol oxidasa (PPO) en la que se producen quinonas (Azofeifa-Delgado, 2008). Las quinonas son especies químicas fitotóxicas que al polimerizarse afectan las proteínas inhibiendo así el crecimiento y viabilidad de los explantes (Hernández & González, 2010). En condiciones normales, las plantas producen un mayor nivel de especies de oxígeno reactivo (ROS) o radicales libres cuando se ven sometidas a algún tipo de estrés. Si bien en el medio ambiente, este estrés puede ser generado por varios factores como herbicidas, patógenos, presencia de metales pesados, entre otros, en el caso de los cultivos *in vitro* la oxidación puede deberse a los cortes generados en el explante, la intensidad de la luz, la composición del medio de cultivo y desinfección de los explantes (Azofeifa-Delgado, 2008; Hernández & González, 2010, 2010).

Entre las opciones para contrarrestar esta problemática se ha reportado el uso de medio líquido, el cambio del agente gelificante el uso de carbón activado, el uso de polivinil pirrolidona, disminuir la temperatura y la luminosidad, o bajar el pH del medio de cultivo (Azofeifa-Delgado, 2008). Por su parte, en su investigación Cuevas & Salaverría, (2004), en cultivo *in vitro* de fresa, concluyen que al agregarle cisteína (4g/L), el 100% de sus explantes

lograban sobrevivir, eliminando así la pérdida de explantes debido a la oxidación de los mismos.

EXPRESIÓN DIFERENCIAL ENTRE *LECI*, *BBM* Y *WOX4* DURANTE LA ESD

La expresión de genes es vital para el inicio o finalización de muchos procesos biológicos de todos los organismos. Dado que en muchas investigaciones (Costanzo et al., 2014; Hirakawa et al., 2010, 2010; Jha & Kumar, 2018; Kumar & Van Staden, 2017; Maulidiya et al., 2020; Nakata et al., 2012; Nic-Can et al., 2013; Ohmori et al., 2013; Orłowska & Kępczyńska, 2018; Rupps et al., 2016) en *Arabidopsis thaliana*, *Daucus carota*, *Dactylis glomerata*, *Ocotea catharinensis*, *Oryza sativa*, *Cocos nucifera*, *Musa acuminata*, *Zea mays*, *Theobroma cacao*, entre otras se han reportado los genes *LECI*, *BBM* y *WOX4* como genes de interés por su rol durante la ES, se intentó analizar su participación en el transcurso del tiempo durante la ESD en una de las especies de café más importantes para nuestro país, *C. arabica* L. cv Caturra.

Una de las grandes problemáticas de estos resultados fue la diferencia en la expresión relativa obtenida entre réplicas técnicas. Esta diferencia pudo deberse a la presencia de proteínas ya que como se observó en los resultados del NanoDrop, hubo un rango amplio en las absorbancias 260 nm/280 nm entre las réplicas. También pudo afectar la degradación del ADNc entre la primer réplica y la segunda (Fleige & Pfaffl, 2006), como consecuencia del tiempo transcurrido entre una réplica y la otra.

EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *BBM* DURANTE LA ESD

Como parte de la familia de factores de transcripción *AP2/ERF*, el gen *BBM* se expresa en los meristemas, semillas y raíces de las plantas (Jha & Kumar, 2018; Kulinska-Lukaszek et al., 2012). Además este gen promueve la totipotencialidad durante la germinación de la semilla (Jha & Kumar, 2018) y la diferenciación de células embrionales en células somáticas (Boutilier et al., 2002). Por lo tanto, el aumento significativo de la expresión de *BBM* después de transcurridos 64 días de la ESD concuerda con el hecho de que fue a partir de esa fecha que se dio la producción de los primeros embriones en algunos explantes (segmentos de hoja) de café.

La expresión de *BBM*, promueve la proliferación celular y también se ha reportado que va acompañada de una serie de efectos pleiotrópicos en el desarrollo de la planta que pueden resultar en organogénesis o embriogénesis (El Ouakfaoui et al., 2010). Por esta razón, tal y

como se observó en la presente investigación, la expresión relativa de *BBM* fue en aumento durante todas las fechas de muestreo.

Es importante recalcar que los patrones embriogénicos pueden variar entre especies, y no siempre la expresión de este gen va a desencadenar la embriogénesis como sucede en el caso del tabaco transgénico (El Ouakfaoui et al., 2010). En la investigación de Srinivasan et al.(2006), tomando en cuenta la expresión ectópica del dominio del factor de transcripción *BABY BOOM (BBM) AP2/ ERF* en *Arabidopsis thaliana* y *Brassica napus* en la embriogénesis somática espontánea, realizaron tabaco transgénico con genes *BBM* proveniente de estas dos especies. Con ello buscaban analizar la expresión de estos genes durante el desarrollo y regeneración de una especie heteróloga como el tabaco (*Nicotiana tabacum*). Para su sorpresa, la embriogénesis somática espontanea inducida por *BBM* (como ocurre en las otras dos especies) no ocurrió con el transgénico creado, pero si obtuvieron notables diferencias fenotípicas en estos individuos transformados. Por lo tanto, concluyen que, la secuencia de los genes ortólogos es lo suficientemente distinta como para haber activado la expresión de un set de genes blanco distintos a los que el gen *BBM* de tabaco activaría normalmente. O que, existen diferencias inherentes en las células y tejidos en el tabaco que no cumplen con los requerimientos moleculares o fisiológicos para que se dé una embriogénesis somática espontanea mediada por *BBM*.

Otro aspecto importante y que concuerda con los resultados de esta investigación, es que el gen *BBM* pareciera regular transcripcionalmente al gen *LEC1*, quien a su vez es también un factor de transcripción (Horstman et al., 2017; Jha & Kumar, 2018). Por ello es que, el gen *LEC1* empieza a expresarse hasta que la expresión de *BBM* es dos veces mayor que la del gen *UBI9*.

EXPRESIÓN RELATIVA DEL GEN *LEC1* DURANTE LA ESD

LEC1, siendo otro factor de transcripción, perteneciente a la familia *LEC* de factores de transcripción, tiene una función un poco más específica que *BBM*. Este gen está directamente relacionado con la embriogénesis, se desconoce aún el mecanismo molecular, pero se ha reportado como el controlador del desarrollo del embrión cigótico, la morfogénesis y la maduración del embrión (Kumar et al., 2020). *LEC1*, pertenece a una familia de reguladores de transcripción que participan en estos procesos biológicos, pero este gen específicamente, en *Arabidopsis thaliana*, se ha reportado inclusive hasta como el activador del resto de genes de su misma familia (Rupps et al., 2016). A este grupo de genes que actúan en conjunto se les conoce como la red LAFL (haciendo referencia a *LEC1/LIL*, *ABI3*, *FUS3* y *LEC2*, como sus integrantes) (Horstman et al., 2017).

Al observar la Figura 12, vemos que a los 64 días la expresión de *LECI* es aún inferior a la de *UBI9*. Si bien ya había algunos embriones en los que se pudiese estar expresando el gen *LECI*, la mayoría de los explantes no presentaban embriones. En esa fecha el promedio de embriones por explante era de 0.15, y un promedio de 1 explante con embriones. Por lo tanto, no había suficientes embriones para lograr capturar la posible expresión del gen *LECI* en esta fecha de muestreo.

Por otra parte, *LECI*, aparte de participar en la maduración del embrión, su expresión también conlleva a la formación de las hojas cotiledonares (Junker & Bäumllein, 2012). Era entonces de esperar el aumento progresivo de la expresión de *LECI* durante todo el proceso de embriogénesis somática que se observó en esta investigación.

EXPRESION RELATIVA DEL GEN *WOX4* DURANTE LA ESD

WOX4 al igual que *LECI*, pertenece a una familia de factores de transcripción. Esta familia conocida como *WUSCHEL-related homeobox (WOX)*, es específica para plantas y es factor de transcripción para homeodominios (homeobox) (Daude et al., 2020; Hirakawa et al., 2010). Esta familia puede ser bastante amplia, por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* se han reportado 15 miembros involucrados en varios procedimientos como la regulación de células embriogénicas, el mantenimiento de células meristemáticas, la regulación de la polaridad embriogénica y el desarrollo de órganos laterales (Daude et al., 2020; Ji et al., 2010; Nic-Can et al., 2013).

Para el caso específico de *WOX4*, se ha reportado en tomate y *Arabidopsis thaliana*, que su expresión es necesaria para la regulación del crecimiento lateral de la planta, lo cual realiza por medio de la diferenciación celular en el procambium (Hirakawa et al., 2010; Ji et al., 2010, p. 4; Nic-Can et al., 2013). El procambium por su parte está formado por células meristemáticas localizadas en la periferia tanto de los tallos como de raíces en las plantas (Costanzo et al., 2014; Nic-Can et al., 2013).

En su investigación Ji et al. (2010) demuestran que la expresión de *WOX4*, en tomate y *Arabidopsis* se da en el desarrollo de tejido vascular pero se limita a ciertas etapas del crecimiento, ya que su mayor expresión se da en los primordios tanto de las hojas como del tallo y luego disminuye. Esto concuerda el resultado obtenido en esta investigación en cuanto al comportamiento de la expresión de este gen en las cuatro fechas de muestreo. Este gen inicia su expresión después de 101 días de cultivo donde los estadíos de los embriones son más avanzados y podrían estar requiriendo el desarrollo de tejido vascular y la expresión aumenta para la siguiente fecha de muestreo.

NIVELES DE METILACIÓN DEL ADN DURANTE LA ESI DE CAFÉ

Si bien no se logró evaluar el nivel de metilación durante la ESD en *C. arabica* L. cv Caturra, en esta investigación se logró evaluar los diferentes niveles de metilación entre distintos tejidos de café durante la ESI. Este primer análisis de metilación buscaba evidenciar las diferencias en el control epigenético que podían existir entre tejidos embriogénicos y no embriogénico.

En primer lugar, un resultado importante fue el alto porcentaje de loci sensibles a la metilación. Este 82,8% de loci sensibles a la metilación en estos tejidos, presentó un 56% de polimorfismo. Estos resultados refuerzan los reportes que indican que tanto en animales como en plantas los patrones de metilación podrían estar involucrados en el control de diversas fases de desarrollo (Baránek et al., 2016; He et al., 2011; Nic-Can et al., 2013).

Además, se logró determinar que las variaciones genéticas y epigenéticas no estaban correlacionadas y en ambos casos la diversidad fue alta, respaldando así la existencia de diversos mecanismos de regulación y desarrollo en las plantas (Bobadilla Landey et al., 2015; Grafi et al., 2007; Morán & Pérez-Figueroa, 2011; Reyna-López et al., 1997).

Se observó que en el tejido de hoja hay un mayor porcentaje de loci metilados, si bien no hay certeza de qué parte de los genes están metiladas, este alto porcentaje podría ser indicativo de un control más estricto sobre la expresión de los genes por medio de la metilación (Grafi et al., 2007). En cambio, en los otros tejidos los niveles de metilación están similares, y menores que en el de hoja. Se ha reportado que los niveles de metilación en una planta pueden variar como respuesta a agentes externos o cambios en el medio ambiente que le produzcan algún tipo de estrés a la planta (Hanai et al., 2010). Pero también puede deberse a la necesidad de la expresión de algunos genes en específico durante la división celular y por ende durante la diferenciación o multiplicación celular en algún tejido (Grafi et al., 2007; Jaenisch & Bird, 2003), lo cual evidentemente debió ocurrir en los tejidos, callo, embrión y callo no embriogénico.

CONCLUSIONES

- Los protocolos para inducción a ESD no solo son específicos para cada especie de plantas, sino que también dependen de las plantas madres de las que se extraigan los explantes.
- Un componente como el nitrato de plata puede generar distintos resultados aun tratándose de una misma especie y variedad.
- Los genes *LEC1*, *BBM* y *WOX* se expresan durante el proceso de la ESD. Al igual que en otras especies, su participación en este procedimiento es importante. El nivel de expresión para cada uno no se da ni en las mismas etapas ni en la misma intensidad.
- Las diferencias en los niveles de expresión de los genes *LEC1*, *BBM* y *WOX4* durante los muestreos, demuestran que existe un control epigenético sobre estos genes durante el procedimiento de ESD.
- El tejido vegetal embriogénico y no embriogénico contiene en su ADN un alto nivel de loci (82.8%) sensibles a la metilación, por lo tanto, gran variedad de posibilidades para la regulación por medio de la metilación.
- El tejido vegetal proveniente de una hoja, presentó el nivel más alto de loci metilados (38%) en comparación a los otros tejidos que evidentemente sufrieron algún tipo de multiplicación celular. Dicho porcentaje es una evidencia de una regulación por medio de metilación, ya que en los tejidos donde hubo actividad celular el porcentaje disminuyó.
- Los resultados de esta investigación aportan al conocimiento sobre el proceso de ESD en *C. arabica*, una especie que, por sus características, definitivamente se aleja de las especies modelo para investigación. Esta es la primera investigación de carácter epigenético que se realiza en esta especie en nuestro país marcando un precedente para continuar la investigación sobre esta técnica de rápida propagación que nos podría traer muchos beneficios a nivel comercial.

RECOMENDACIONES

- Para obtener un mayor número de embriones somáticos por medio de ESD, se recomienda realizar varias pruebas de medios de cultivo y condiciones de incubación. Además, que por lo menos las hojas de las que se extraigan los explantes sean las más jóvenes. Disminuir la oxidación al máximo posible debe ser una de las prioridades en este tipo de investigación.
- Se recomienda que, en la medida de lo posible se trabaje con un mismo individuo (planta madre) para minimizar las variables que puedan afectar tanto la producción de embriones somáticos como las variabilidades genéticas o en todo caso tenerlos identificados.
- Por otra parte, en caso de tener una producción alta de embriones somáticos, se recomendaría separar los diferentes estadíos de embriones y hacer los análisis por separado.
- Luego de analizar los posibles componentes del medio de inducción a ESD de acuerdo a la especie con la que se vaya a trabajar, se deben realizar varias pruebas con diferentes intensidades de luz, temperatura, concentraciones de hormonas de crecimiento para minimizar la oxidación de los explantes.
- En cuanto a la utilización de la técnica de qRT-PCR, es muy importante no solo alicuotar desde la extracción de ARN, si no cuantificar cada uno de esas alícuotas para asegurarse tanto de la calidad como cantidad de ese ARN, ADNc con el que se va a trabajar en las réplicas de qRT-PCR. Además, la planificación previa de todas las réplicas técnicas y biológicas durante todas las corridas que se realicen y no realizar menos de 3 réplicas técnicas.
- Una vez realizadas las qRT-PCR, realizar geles a los resultados para poder analizar los fragmentos obtenidos en cada una de ellas. Lamentablemente este punto quedó pendiente por las medidas sanitarias tomadas por la pandemia y que limitaron el acceso a los laboratorios.

BIBLIOGRAFÍA

- Arimarsetiowati, R. (2017). Embryo Germination Development of *Coffea arabica* L.at Various Media Composition, Subcultures Stages and Embryo Size. *Pelita Perkebunan (a Coffee and Cocoa Research Journal)*, 33(3), 156. <https://doi.org/10.22302/iccricri.jur.pelitaperkebunan.v33i3.290>
- Azofeifa-Delgado, Á. (2008). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados in vitro. *Agronomía Mesoamericana*, 20(1), 153. <https://doi.org/10.15517/am.v20i1.4990>
- Baránek, M., Čechová, J., Kovacs, T., Eichmeier, A., Wang, S., Raddová, J., Nečas, T., & Ye, X. (2016). Use of Combined MSAP and NGS Techniques to Identify Differentially Methylated Regions in Somaclones: A Case Study of Two Stable Somatic Wheat Mutants. *PLOS ONE*, 11(10), e0165749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165749>
- Barbosa de Paula, M., Ságio, S., Lazzari, F., Barreto, H., Paiva, L., & Chalfun-Junior, A. (2012). *Efficiency of RNA extraction protocols in different types of coffee plant tissues*. <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/7925>
- Bobadilla Landey, R. (2013). *Influence of micropropagation through somatic embryogenesis on somaclonal variation in coffee (Coffea arabica): Assessment of variations at the phenotypical, cytological, genetic and epigenetic level (Amérique centrale)* [Thesis, UM2]. <https://agritrop.cirad.fr/577598/>

- Bobadilla Landey, R., Cenci, A., Georget, F., Bertrand, B., Camayo, G., Dechamp, E., Herrera, J. C., Santoni, S., Lashermes, P., Simpson, J., & Etienne, H. (2013). High genetic and epigenetic stability in *Coffea arabica* plants derived from embryogenic suspensions and secondary embryogenesis as revealed by AFLP, MSAP and the phenotypic variation rate. *PloS One*, 8(2), e56372. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056372>
- Bobadilla Landey, R., Cenci, A., Guyot, R., Bertrand, B., Georget, F., Dechamp, E., Herrera, J.-C., Aribi, J., Lashermes, P., & Etienne, H. (2015). Assessment of genetic and epigenetic changes during cell culture ageing and relations with somaclonal variation in *Coffea arabica*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 122(3), 517–531. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0772-9>
- Boutilier, K., Offringa, R., Sharma, V. K., Kieft, H., Ouellet, T., Zhang, L., Hattori, J., Liu, C.-M., Lammeren, A. A. M. van, Miki, B. L. A., Custers, J. B. M., & Campagne, M. M. van L. (2002). Ectopic Expression of BABY BOOM Triggers a Conversion from Vegetative to Embryonic Growth. *The Plant Cell*, 14(8), 1737–1749. <https://doi.org/10.1105/tpc.001941>
- Campos, N. A., Panis, B., & Carpentier, S. C. (2017). Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>

- Costanzo, E., Trehin, C., & Vandebussche, M. (2014). The role of WOX genes in flower development. *Annals of Botany*, *114*(7), 1545–1553. <https://doi.org/10.1093/aob/mcu123>
- Cruz, F., Kalaoun, S., Nobile, P., Colombo, C., Almeida, J., Barros, L. M. G., Romano, E., Grossi-de-Sá, M. F., Vaslin, M., & Alves-Ferreira, M. (2009). Evaluation of coffee reference genes for relative expression studies by quantitative real-time RT-PCR. *Molecular Breeding*, *23*(4), 607–616. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9259-x>
- Cuevas, M., & Salaverría, J. (2004). Control de la oxidación y la contaminación en el cultivo in vitro de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.). *Revista Científica UDO Agrícola*, *4*(1), 21–26.
- Daude, M., Dos Santos Silva, T., Freitas, N., Ságio, S., Paiva, L., & Barreto, H. (2020). Transcriptional analysis of WUSCHEL-related HOMEODOMAIN (WOX) genes in *Coffea arabica* L. *Biologia*, *75*(9), 1483–1495. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00460-8>
- De Los Santos-Briones, C., & Hernández-Sotomayor, S. (2006). Coffee biotechnology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, *18*(1), 217–227. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202006000100015>
- De-la-Peña, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J., López-Torres, A., Wrobel, K., & Robert-Díaz, M. L. (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*, *12*(1), 203. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-203>

- Díaz Medina, M. (2014). *Análisis de la competitividad comercial centroamericana, intrarregional de la producción de café (Coffea arabica) 2000 -2010* [Masters, Universidad Nacional Agraria]. <https://repositorio.una.edu.ni/3803/>
- Eco-Negocios—Generalidades*. (n.d.). CATIE. Retrieved August 6, 2020, from <http://agronegocios.catie.ac.cr/index.php/eco-productos/cafe/generalidades>
- El Ouakfaoui, S., Schnell, J., Abdeen, A., Colville, A., Labbé, H., Han, S., Baum, B., Laberge, S., & Miki, B. (2010). Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant Molecular Biology*, 74(4–5), 313–326. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9674-8>
- Etienne, H. (2005). Somatic Embryogenesis Protocol: Coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In S. M. Jain & P. Gupta (Eds.), *Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants* (pp. 167–179). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_14
- Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E., Verdeil, J.-L., & Barry-Etienne, D. (2013). Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*, 33(6), 640–653. <https://doi.org/10.1093/treephys/tpt034>
- Etienne, H., Bertrand, B., Montagnon, C., Bodadilla Landey, R., Dechamp, E., Jourdan, I., Alpizar, E., Malo, E., & Georget, F. (2012). Un exemple de transfert de technologie réussi dans le domaine de la micropropagation: La multiplication de *Coffea arabica*

par embryogenèse somatique. *Cahiers Agricultures*.

<https://doi.org/10.1684/agr.2012.0553>

Fleige, S., & Pfaffl, M. (2006). RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(2–3), 126–139.

<https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.12.003>

Florez, S., Erwin, R., Maximova, S., Guiltinan, M., & Curtis, W. (2015). Enhanced somatic embryogenesis in *Theobroma cacao* using the homologous BABY BOOM transcription factor. *BMC Plant Biology*, 15(1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0479-4>

Fulneček, J., & Kovařík, A. (2014). How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles? *BMC Genetics*, 15(1), 2.

<https://doi.org/10.1186/1471-2156-15-2>

Gatica, A., Arrieta, G., & Espinoza, A. (2007). Comparison of three in vitro protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. Cvs. Caturra and Catuaí. *Agronomía Costarricense: Revista de Ciencias Agrícolas*, ISSN 0377-9424, Vol. 31, N°. 1, 2007, Pags. 86-94, 31.

Gatica, A., Arrieta, G., & Espinoza, A. (2008). Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí: Effect of tricontanol, light condition, and medium consistency. *Agronomía Costarricense*.

<https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost/article/view/6777>

- Gatica, A., Arrieta, G., & Espinoza Esquivel, A. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Electronic Journal of Biotechnology*, *11*(1), 101–112.
- Giridhar, P., Indu, E., Dirisala, V., & Gokare, R. (2003). Effect of silver nitrate on in vitro shoot growth of coffee. *Tropical Science*, *43*, 144–146.
<https://doi.org/10.1002/ts.106>
- Grafi, G., Ben-Meir, H., Avivi, Y., Moshe, M., Dahan, Y., & Zemach, A. (2007). Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. *Developmental Biology*, *306*(2), 838–846.
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.03.023>
- Hanai, L., Floh, E., Fungaro, M., Santa-Catarina, C., de Paula, F., Viana, A., & Vieira, M. (2010). Methylation patterns revealed by MSAP profiling in genetically stable somatic embryogenic cultures of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, *46*(4), 368–377. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9291-x>
- He, X.-J., Chen, T., & Zhu, J.-K. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research*, *21*(3), 442–465.
<https://doi.org/10.1038/cr.2011.23>
- Hernández, Y., & M. González. (2010). efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento In Vitro DE FRUTALES PERENNES. *Cultivos Tropicales*, *31*(4), 00–00.

- Hirakawa, Y., Kondo, Y., & Fukuda, H. (2010). TDIF Peptide Signaling Regulates Vascular Stem Cell Proliferation via the WOX4 Homeobox Gene in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 22(8), 2618–2629. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076083>
- Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J., Angenent, G. C., & Boutilier, K. (2017). The BABY BOOM Transcription Factor Activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 Network to Induce Somatic Embryogenesis. *Plant Physiology*, 175(2), 848–857. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00232>
- Ikeda, M., Umehara, M., & Kamada, H. (2006). Embryogenesis-related genes; Its expression and roles during somatic and zygotic embryogenesis in carrot and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnology*, 23(2), 153–161. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.23.153>
- Jaenisch, R., & Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: How the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nature Genetics*, 33(3), 245–254. <https://doi.org/10.1038/ng1089>
- Jha, P., & Kumar, V. (2018). BABY BOOM (BBM): A candidate transcription factor gene in plant biotechnology. *Biotechnology Letters*, 40(11–12), 1467–1475. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2613-5>
- Ji, J., Strable, J., Shimizu, R., Koenig, D., Sinha, N., & Scanlon, M. J. (2010). WOX4 Promotes Procambial Development. *Plant Physiology*, 152(3), 1346–1356. <https://doi.org/10.1104/pp.109.149641>

- Junker, A., & Bäumllein, H. (2012). Multifunctionality of the LEC1 transcription factor during plant development. *Plant Signaling & Behavior*, 7(12), 1718–1720. <https://doi.org/10.4161/psb.22365>
- Kitimu, S., Taylor, J., March, T., Tairo, F., Wilkinson, M., & Rodríguez López, C. M. (2015). Meristem micropropagation of cassava (*Manihot esculenta*) evokes genome-wide changes in DNA methylation. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00590>
- Kulinska-Lukaszek, K., Tobojka, M., Adamiok, A., & Kurczynska, E. U. (2012). Expression of the BBM gene during somatic embryogenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Biologia Plantarum*, 56(2), 389–394. <https://doi.org/10.1007/s10535-012-0105-3>
- Kumar, V., Jha, P., & Van Staden, J. (2020). LEAFY COTYLEDONS (LECs): Master regulators in plant embryo development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 140(3), 475–487. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01752-x>
- Kumar, V., & Van Staden, J. (2017). New insights into plant somatic embryogenesis: An epigenetic view. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(9), 194. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2487-5>
- Kwong, R. W., Bui, A. Q., Lee, H., Kwong, L. W., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (2003). LEAFY COTYLEDON1-LIKE Defines a Class of Regulators Essential for Embryo Development. *The Plant Cell*, 15(1), 5–18. <https://doi.org/10.1105/tpc.006973>

- Lashermes, P., Combes, M., Prakash, N., Trouslot, P., Lorieux, M., & Charrier, A. (2001). Genetic linkage map of *Coffea canephora*: Effect of segregation distortion and analysis of recombination rate in male and female meioses. *Genome*, *44*(4), 589–595. <https://doi.org/10.1139/g01-041>
- López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivel, A., Aguirre-Medina, J. F., Ojeda-Zacarías, M. C., & Gutiérrez-Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista fitotecnia mexicana*, *33*(3), 205–213.
- Lotan, T., Ohto, M., Yee, K. M., West, M., Lo, R., Kwong, R. W., Yamagishi, K., Fischer, R. L., Goldberg, R. B., & Harada, J. J. (1998). Arabidopsis LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*, *93*(7), 1195–1205. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81463-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81463-4)
- Maulidiya, A., Sugiharto, B., Dewanti, P., & Handoyo, T. (2020). Expression of somatic embryogenesis-related genes in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, *23*(3), 207–214. <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00024-x>
- Megías M, Molist P, Pombal MA. (2019). *Atlas de histología vegetal y animal. Técnicas histológicas*. Recuperado. <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/1-introduccion.php>
- Mora, N. (2008, enero). *Agrocadena de Café—Infocafes*. Mag.Go.Cr. <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/E70-9314.pdf>

- Morán, P., & Pérez-Figueroa, A. (2011). Methylation changes associated with early maturation stages in the Atlantic salmon. *BMC Genetics*, *12*(1), 86. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-12-86>
- Muniswamy, B., Kosaraju, B., Mishra, M., & Yenugula, R. (2017). Field Performance and Genetic Fidelity of Micropropagated Plants of *Coffea canephora* (Pierre ex A. Froehner). *Open Life Sciences*, *12*(1), 1–11. <https://doi.org/10.1515/biol-2017-0001>
- Nakata, M., Matsumoto, N., Tsugeki, R., Rikirsch, E., Laux, T., & Okada, K. (2012). Roles of the Middle Domain–Specific WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN Genes in Early Development of Leaves in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, *24*(2), 519–535. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.092858>
- Nic-Can, G. I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V. M., Rojas-Herrera, R., & De-la-Peña, C. (2013). New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. *PLOS ONE*, *8*(8), e72160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072160>
- Nieves, N., Poblete, A., Cid, M., & Lezcano, Y. (2006). *EVALUACIÓN DEL PECTIMORF COMO COMPLEMENTO DEL 2,4-D EN EL PROCESO DE LA EMBRIOGÉNESIS*. 7.
- Ohmori, Y., Tanaka, W., Kojima, M., Sakakibara, H., & Hirano, H.-Y. (2013). WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Is Involved in Meristem Maintenance and Is Negatively

- Regulated by the CLE Gene *FCPI* in Rice. *The Plant Cell*, 25(1), 229–241.
<https://doi.org/10.1105/tpc.112.103432>
- Orłowska, A., & Kępczyńska, E. (2018). Identification of Polycomb Repressive Complex1, Trithorax group genes and their simultaneous expression with WUSCHEL, WUSCHEL-related Homeobox5 and SHOOT MERISTEMLESS during the induction phase of somatic embryogenesis in *Medicago truncatula* Gaertn. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(3), 345–356.
<https://doi.org/10.1007/s11240-018-1425-6>
- Ovalle-Rivera, O., Läderach, P., Bunn, C., Obersteiner, M., & Schroth, G. (2015). Projected Shifts in *Coffea arabica* Suitability among Major Global Producing Regions Due to Climate Change. *PLOS ONE*, 10(4), e0124155.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124155>
- Paula, M., Ságio, S. A., Lazzari, F., Barreto, H. G., Paiva, L. V., & Chalfun-Junior, A. (2012). *Eficiência de protocolos de extração de RNA em diferentes tecidos do cafeeiro* (No. 3). 7(3), 284–293. <https://doi.org/10.25186/cs.v7i3.385>
- Peredo, E., Arroyo-García, R., & Revilla, M. (2009). Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. *Journal of Plant Physiology*, 166(10), 1101–1111.
<https://doi.org/10.1016/j.jplph.2008.12.015>
- Pérez-Figueroa, A. (2013). msap: A tool for the statistical analysis of methylation-sensitive amplified polymorphism data. *Molecular Ecology Resources*, 13(3), 522–527.
<https://doi.org/10.1111/1755-0998.12064>

- Pfaffl, M. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Reyna-López, G. E., Simpson, J., & Ruiz-Herrera, J. (1997). Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics MGG*, 253(6), 703–710. <https://doi.org/10.1007/s004380050374>
- Rupps, A., Raschke, J., Rümmler, M., Linke, B., & Zoglauer, K. (2016). Identification of putative homologs of *Larix decidua* to BABYBOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON1 (LEC1), WUSCHEL-related HOMEODOMAIN-BOX2 (WOX2) and SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-like KINASE (SERK) during somatic embryogenesis. *Planta*, 243(2), 473–488. <https://doi.org/10.1007/s00425-015-2409-y>
- Sridevi, V., Giridhar, P., Simmi, P. S., & Ravishankar, G. (2010). Direct shoot organogenesis on hypocotyl explants with collar region from in vitro seedlings of *Coffea canephora* Pierre ex. Frohner cv. C × R and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9694-8>
- Sridevi, Vaddadi, & Giridhar, P. (2014). In vitro shoot growth, direct organogenesis and somatic embryogenesis promoted by silver nitrate in *Coffea dewevrei*. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 23(1), 112–118. <https://doi.org/10.1007/s13562-012-0186-2>

- Srinivasan, C., Liu, Z., Heidmann, I., Supena, E. D. J., Fukuoka, H., Joosen, R., Lambalk, J., Angenent, G., Scorza, R., Custers, J. B. M., & Boutilier, K. (2006). Heterologous expression of the BABY BOOM AP2/ERF transcription factor enhances the regeneration capacity of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Planta*, 225(2), 341–351. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0358-1>
- Tamay de Dios, L., Ibarra, C., & Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación En Discapacidad*, 2(2), 70–78.
- Villegas F., Giménez A., Vílchez P., Moreno C., Sandoval, L., & Colmenares E, M. (2008). Oxidación en la inducción de la embriogénesis somática a partir de flores masculinas inmaduras de Gran Enano (*Musa AAA*). *Revista de La Facultad de Agronomía*, 25(3), 570–588.
- Yasuda, T., Fujii, Y., & Yamaguchi, T. (Kobe U. (Japan) F. of A. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology* (Japan). <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP8603677>