



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FISIOLOGÍA VEGETAL

**“REGULADORES DE CRECIMIENTO Y  
OSMÓTICOS EN LA MADURACIÓN,  
GERMINACIÓN Y CONVERSIÓN DE  
EMBRIONES SOMÁTICOS DE CAFÉ (*Coffea  
arabica* var. Colombia)”**

ENRIQUE RIVIELLO COGCO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, **“Enrique Riviello Cogco”**, Alumno de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora **“Dra. Alejandrina Robledo Paz”**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **“Reguladores de crecimiento y osmóticos en la maduración, germinación y conversión de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* var. Colombia)”**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Texcoco, Estado de México, a 16 de julio de 2019

Enrique Riviello Cogco

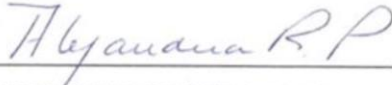
Vo. Bo. de la Dra. Alejandrina Robledo Paz

La presente tesis titulada: “**Reguladores de crecimiento y osmóticos en la maduración, germinación y conversión de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* var. Colombia)**” realizada por el alumno: “**Enrique Riviello Cogco**” bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS  
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD  
FISIOLOGÍA VEGETAL

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DRA. MARÍA ALEJANDRA GUTIÉRREZ ESPINOSA

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ OSCAR MASCORRO GALLARDO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, agosto de 2019.

**Reguladores de crecimiento y osmóticos en la maduración, germinación y conversión de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* var. Colombia)**

**Enrique Riviello Cogco, M. en C.  
Colegio de Postgraduados, 2019.**

**RESUMEN**

La variedad de café Colombia tiene alta resistencia a la roya y buenas características en calidad de taza y producción. Diversos protocolos para la propagación de café mediante embriogénesis somática han sido desarrollados; sin embargo, la tasa de maduración, germinación y conversión es baja. Callos embriogénicos fueron obtenidos a partir de explantes de hoja cultivados en un medio Murashige y Skoog (1962) (MS), suplementado con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP), 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel. Los callos fueron transferidos a un medio que contenía las sales de Yasuda *et al.* (1985) (Yasuda), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel para inducir la formación de embriones. Para su maduración, los embriones en estado globular y torpedo temprano se cultivaron en un medio Yasuda adicionado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA) y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP o 0.7-1.0 de AG<sub>3</sub> y 0.3-0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y con distintas concentraciones de ácido abscísico (ABA) (2-4 mg L<sup>-1</sup>), ácido salicílico (ASA) (1.38 g L<sup>-1</sup>), polietilenglicol 8000 (PEG) (50-75 g L<sup>-1</sup>) y sacarosa (50-80 g L<sup>-1</sup>). Los embriones fueron transferidos a un medio con 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP para inducir su germinación. Las plántulas generadas se colocaron *in vitro* en una mezcla de vermiculita y perlita (3:1) humedecida con un medio MS al 50% y 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. La aclimatación se llevó a cabo en invernadero, las plantas se cultivaron en perlita:turba:tezontle (1:1:1) o turba:tezontle (2:1). Cultivar embriones en etapa globular en un medio con 50 y 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa aumentó su maduración (81.7 y 45.0 %, respectivamente) y germinación (44.5 y 68.9 %, respectivamente). El porcentaje más alto de maduración y germinación de embriones torpedo se obtuvo con 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa o 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> más 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos durante la conversión de las plántulas en plantas. El potencial osmótico de los embriones no estuvo directamente relacionado con el grado de madurez de éstos. En la etapa de aclimatación 100% de las plantas sobrevivieron en las dos

mezclas de sustratos probados y no se encontraron diferencias significativas en las variables morfológicas ni en su tasa fotosintética.

**Palabras clave:** *Coffea arabica*, embriogénesis somática, maduración, germinación, conversión en planta, aclimatación.

**Growth regulators and sucrose in the synchronization, maturation and germination of somatic coffee embryos (*Coffea arabica* var. Colombia)**

**Enrique Riviello Cogco, M. S.  
Colegio de Postgraduados, 2019.**

**ABSTRACT**

Colombia variety of coffee has high resistance to rust and good characteristics in cup quality and production. Various protocols for the propagation of coffee by somatic embryogenesis have been developed; however, the rate of maturation, germination and conversion is low. Embryogenic callus were obtained from leaf explants cultured on Murashige and Skoog medium (MS), supplemented with 0.5 mg L<sup>-1</sup> 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 1.12 mg L<sup>-1</sup> 6-benzylaminopurine (BAP), 100 mg L<sup>-1</sup> citric acid, 200 mg L<sup>-1</sup> ascorbic acid, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 5.2 g L<sup>-1</sup> phytigel. The calli were subcultured on a medium which contained Yasuda *et al.* (1985) (Yasuda) salts, 1.12 mg L<sup>-1</sup> BAP, 30 g L<sup>-1</sup> sucrose and 5.2 g L<sup>-1</sup> phytigel to induce the embryos formation. For their maturation, globular and early torpedo embryos were cultured in a Yasuda medium with 0.2 mg L<sup>-1</sup> indoleacetic acid (IAA) and 0.2 mg L<sup>-1</sup> BAP or 0.7-1.0 mg L<sup>-1</sup> gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) and 0.3-0.5 mg L<sup>-1</sup> IAA and different concentrations of abscisic acid (ABA) (2-4 mg L<sup>-1</sup>), salicylic acid (SA) (1.38 g L<sup>-1</sup>), polyethylene glycol 8000 (PEG) (50-75 g L<sup>-1</sup>) and sucrose (50-80 g L<sup>-1</sup>). The embryos were transferred to a medium with 0.25 mg L<sup>-1</sup> of IAA and 0.25 mg L<sup>-1</sup> of BAP to induce their germination. The seedlings generated were placed *in vitro* on a mixture of vermiculite and perlite (3:1) moistened with half strength MS medium and 20 g L<sup>-1</sup> sucrose. The acclimatization was carried out in a greenhouse, plants were cultured on perlite:peat:tezontle (1:1:1) or peat:tezontle (2:1). Globular embryos cultured on a medium with 50 and 80 g L<sup>-1</sup> sucrose increased their maturation (81.7 and 45.0 %, respectively) and germination (44.5 and 68.9 %, respectively). The highest percentage of maturation and germination of torpedo embryos was obtained with 80 g L<sup>-1</sup> of sucrose or 1.0 mg L<sup>-1</sup> of GA<sub>3</sub> plus 0.5 mg L<sup>-1</sup> of IAA. No significant differences were found between the treatments during the conversion of the seedlings in plants. The osmotic potential of the embryos was not directly related to the degree of maturity of the embryos. During acclimatization 100% of the plants survived in the two mixtures of tested

substrates and no significant differences were found in the morphological variables or in their photosynthetic rate.

**Key words:** *Coffea arabica*, somatic embryogenesis, maturation, germination, plant conversion, acclimatization.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Colegio de Posgraduados-Campus Montecillo por haberme dado la oportunidad de formar parte de su comunidad, por haberme formado profesionalmente y haber contribuido en mi formación personal.

Al Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Fisiología Vegetal por permitirme ser parte de su matrícula.

Al Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para la realización de mis estudios de postgrado.

A la Dra. Alejandrina Robledo Paz por apoyarme en la dirección de este proyecto y facilitarme las instalaciones de los laboratorios utilizadas en este trabajo.

A la Dra. María Alejandra Gutiérrez Espinosa por la revisión de este proyecto y por su apoyo, amistad y consejos durante mi estancia como estudiante de maestría.

Al Dr. José Oscar Mascorro Gallardo por la revisión de este proyecto.

Al Dr. Víctor Manuel Ordaz Chaparro, por su apoyo con el material vegetal, por su asesoramiento, amistad y consejos durante mi estancia.

A los Dres. Víctor Arturo González Hernández y Nicacio Cruz Huerta por el asesoramiento, instalaciones y equipo prestado para la evaluación de las variables morfológicas y fisiológicas de este trabajo, por su amabilidad y disponibilidad cada que necesitaba de su ayuda.

Al Dr. Javier Suárez Espinosa por el asesoramiento en el análisis e interpretación de los datos obtenidos en la presente investigación.

Al Dr. Oscar Javier Ayala Garay por la revisión de este proyecto y su amistad durante mi estancia.

Al Dr. Eduardo García Villanueva por el asesoramiento sobre la anatomía y morfología de los embriones somáticos, plántulas y plantas regeneradas en esta investigación.

A cada uno de los profesores que durante mis estudios de maestría me compartieron sus conocimientos, consejos y experiencias.

Al personal que labora en el Laboratorio de Fisiotecnia Vegetal: Sr. Juan Carlos, Naty y Victor por todo el apoyo brindado. Así como a la Sra. Alicia de la coordinación de semillas.



## **DEDICATORIAS**

A Dios y al Universo por la oportunidad de “existir” y poder realizar las cosas que he hecho, gracias por presenciar los eventos de su magnificencia.

A mis padres: Enrique Riviello Flores y Remedios Cogco Quesada por ser mi inspiración, por estar en todo momento, por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, por sus consejos y sobre todo por todo su amor y por creer en mí; en especial a mi mamá por ser mi mayor apoyo e inspiración a lo largo de mi vida, por siempre darme su amor, creer y cuidar de mi y sobre todo por ser la mejor persona que he conocido.

A mi hermana Doryam gracias por estar conmigo en todo momento, por todo lo que hemos compartido en la vida, y porque a pesar de no estar todo el tiempo juntos sabemos podemos contar el uno con el otro.

A mi sobrino Carlos Yahvé por ser mi inspiración y mi gran amigo, por siempre darme su cariño y apoyo, y darme sus buenas vibras. A mi cuñado Roberto por todo su apoyo.

A mis abuelitos Metodio Riviello, Auxilio Quesada e Ines Cogco gracias por darme su amor y amistad y sobre todo por transmitirme su amor al campo y al café. Gracias por enseñarme el valor del trabajo duro y las lecciones que la vida nos pone. Gracias a mi abuelita Juana por su apoyo.

A mis amigos de maestría del PREGEP-Fisiología vegetal: Raúl (Tata), Vicky, Marlén, Yamir, Adriana, Victor, Sandoval, Deisy, Orlando, Nancy, Hagg, Julio y su novia Nancy; Amigos de Fruticultura: Quiahua, Joshua, Viry, Manuel, Jesús, Juanito, Emanuel, Toño y PepeTony; Amigos de Ganadería: Uriel y Efraín. A mis amigos de Genética: Corrales, Hernán, Chendo y Cárcamo. A mis amigas de Chapingo: Karla, Naty y Caro.

A todos mis amigos del COLPOS, que haya omitido.

A mis amigos de Huatusco, amigos de toda la vida y que nunca me han abandonado.

A mis perros Zac, Blacky y Paloma así como a mis gatos Lana, Campanita, Mickey, que, aunque parezca raro ponerlos siempre han estado conmigo y me han ayudado en mi vida.

## **PLUR**

## CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	vi
AGRADECIMIENTOS .....	viii
DEDICATORIAS .....	ix
LISTA DE CUADROS.....	xv
LISTA DE FIGURAS .....	xvi
I. INTRODUCCIÓN GENERAL .....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1 Origen y descripción botánica de <i>Coffea arabica</i> .....	4
2.2 Variedades comerciales de café .....	4
2.3 Importancia del café.....	6
2.4 Formas de propagación de café.....	6
2.5 Cultivo <i>in vitro</i> : Micropropagación .....	7
2.6 Embriogénesis somática.....	7
2.7 Embriogénesis somática en café .....	8
2.8 Limitantes en la embriogénesis somática en <i>Coffea arabica</i> L. ....	11
2.9 Relaciones hormonales en la embriogénesis somática .....	11
2.10 El papel del estrés y hormonas en la embriogénesis somática.....	12
2.10.1 Inducción.....	12
2.10.2 Sincronización.....	14
2.10.3 Maduración .....	14
2.10.4 Germinación de embriones somáticos y conversión en plantas.....	17
2.11 Aclimatación de plantas obtenidas por embriogénesis somática .....	18
2.12 Fisiología de las plantas durante el crecimiento <i>ex vitro</i> .....	20

III. MATERIALES Y MÉTODOS .....	21
3.1 OBTENCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	21
3.1.1 Ubicación .....	21
3.1.2 Material vegetal.....	21
3.1.3 Desinfestación del material vegetal .....	21
3.1.4 Medio de cultivo y siembra.....	21
3.1.5 Variables respuesta .....	22
3.2 DIFERENCIACIÓN (FORMACIÓN) DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	23
3.2.1 Efecto del BAP, AIA y TDZ en la diferenciación .....	23
3.2.2 Variables respuesta .....	23
3.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico.....	24
3.3 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA FORMACIÓN SINCRÓNICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	25
3.3.1 Efecto de agentes osmóticos en la sincronización .....	25
3.3.2 Efecto del ANA y cinetina en la sincronización .....	25
3.3.3 Variables respuesta .....	26
3.3.4 Diseño experimental y análisis estadístico.....	26
3.4 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES GLOBULARES Y TORPEDO TEMPRANO DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia .....	29
3.4.1 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones globulares .....	29

3.4.2 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones torpedo temprano (primer experimento) .....	29
3.4.3 Efecto de reguladores de crecimiento (AIA y AG <sub>3</sub> ) en la maduración de embriones torpedo temprano (segundo experimento) .....	30
3.4.4 Variables respuesta .....	30
3.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico.....	31
3.5 GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS MADUROS DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	32
3.5.1 Medio de cultivo .....	32
3.5.2 Variables respuesta .....	32
3.5.3 Diseño experimental y análisis estadístico.....	33
3.6 CONVERSIÓN <i>in vitro</i> DE EMBRIONES EN PLANTAS .....	34
3.6.1 Sustrato y medio de cultivo.....	34
3.6.2 Variables respuesta .....	34
3.6.3 Diseño experimental y análisis estadístico.....	35
3.7 ACLIMATACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLANTAS DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	36
3.7.1 Sustratos de aclimatación.....	36
3.7.2 Variables respuesta .....	36
3.7.3 Diseño experimental y análisis estadístico.....	37
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	38
4.1 INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	38
4.2 DIFERENCIACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	40

4.3 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA FORMACIÓN SINCRÓNICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	42
4.4 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES GLOBULARES Y TORPEDO TEMPRANO DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia .....	44
4.4.1 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones globulares .....	44
4.4.2 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones torpedo temprano (primer experimento) .....	48
4.4.3 Efecto de reguladores de crecimiento (AIA y AG <sub>3</sub> ) en la maduración de embriones torpedo temprano (segundo experimento) .....	49
4.4.4 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en el potencial osmótico de embriones globulares y torpedo temprano (primer experimento) .....	51
4.5 GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS MADUROS DE <i>Coffea arabica</i> L. ....	55
4.5.1 Efecto del ABA y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la germinación de embriones globulares .....	55
4.5.2 Efecto de la sacarosa en la germinación de embriones torpedo temprano (primer experimento) .....	56
4.5.3 Efecto de reguladores de crecimiento (AIA y AG <sub>3</sub> ) en la germinación de embriones torpedo temprano (segundo experimento) .....	58
4.6 CONVERSIÓN <i>in vitro</i> DE EMBRIONES EN PLANTAS .....	61
4.6.1 Efecto de la sacarosa en la conversión de embriones globulares.....	61
4.6.2 Efecto de la sacarosa en la conversión de embriones torpedo temprano (primer experimento) .....	62

4.6.3 Efecto del AIA y AG3 en la conversión de embriones torpedo temprano (segundo experimento) .....	63
4.7 ACLIMATACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLANTAS DE <i>Coffea arabica</i> L. var. Colombia.....	66
4.7.1 Efecto de los sustratos en la supervivencia de las plantas y las variables morfológicas .....	66
4.7.2 Efecto de los sustratos en las variables fisiológicas.....	70
V. CONCLUSIONES .....	76
VI. LITERATURA CITADA.....	77

## LISTA DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos utilizados para probar el efecto de BAP, AIA y TDZ en la diferenciación de embriones somáticos de café var. Colombia.....	24
<b>Cuadro 2.</b> Tratamientos utilizados para probar el efecto de agentes osmóticos en la sincronización de los embriones somáticos de café var. Colombia.....	27
<b>Cuadro 3.</b> Tratamientos utilizados para probar el efecto de ANA, cinetina y sorbitol en la sincronización de los embriones somáticos de café var. Colombia.....	28
<b>Cuadro 4.</b> Componentes del intercambio gaseoso en plantas de <i>C. arabica</i> var. Colombia cultivadas durante 110 días en condiciones de invernadero. ....	70
<b>Cuadro 5.</b> Relación del cociente entre el largo/ancho de las hojas y el área foliar observada en plantas de <i>C. arabica</i> var. Colombia cultivadas durante 110 días en condiciones de invernadero.....	74

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Origen de la variedad Colombia de <i>Coffea arabica</i> (Cortina, 2013). .....	6
<b>Figura 2.</b> Estados de desarrollo de embriones somáticos de café del genotipo INIFAP 00-28.....	9
<b>Figura 3.</b> Inducción de callo en hojas de café var. Colombia.....	22
<b>Figura 4.</b> Diferenciación de embriones somáticos de café var. Colombia. ....	23
<b>Figura 5.</b> Sincronización del desarrollo de embriones somáticos de café var. Colombia. ....	26
<b>Figura 6.</b> Maduración de embriones somáticos globulares y torpedo temprano de café var. Colombia.....	31
<b>Figura 7.</b> Germinación de embriones somáticos maduros (torpedo tardío y cotiledonar) de café var. Colombia. ....	32
<b>Figura 8.</b> Conversión <i>in vitro</i> de embriones germinados a plantas en café var. Colombia. ....	34
<b>Figura 9.</b> Aclimatación de plantas de café var. Colombia en condiciones de invernadero. ....	36
<b>Figura 10.</b> Callo formado en los explantes foliares de <i>C. arabica</i> var. Colombia después de 8 semanas de cultivo. ....	39
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de embriones globulares que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración.....	44
<b>Figura 12.</b> Porcentaje de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración (primer experimento). ....	48
<b>Figura 13.</b> Porcentaje de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración (segundo experimento).....	49
<b>Figura 14.</b> Potencial osmótico de embriones globulares que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración.....	52
<b>Figura 15.</b> Potencial osmótico de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración (primer experimento)....	53
<b>Figura 16.</b> Porcentaje de germinación de embriones globulares que alcanzaron la madurez.. ...	56



<b>Figura 17.</b> Porcentaje de germinación de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez (primer experimento). .....	57
<b>Figura 18.</b> Porcentaje de germinación de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez (segundo experimento). .....	59
<b>Figura 19.</b> Porcentaje de conversión de embriones madurados desde el estado globular. ....	61
<b>Figura 20.</b> Planta procedente del medio de maduración con 80 g L <sup>-1</sup> de sacarosa obtenida después de 24 semanas de cultivo en un sustrato <i>in vitro</i> a base de vermiculita y perlita (3:1). .....	62
<b>Figura 21.</b> Porcentaje de conversión de embriones madurados desde el estado torpedo temprano (primer experimento). .....	63
<b>Figura 22.</b> Porcentaje de conversión de embriones madurados desde el estado torpedo temprano (segundo experimento). .....	64
<b>Figura 23.</b> Plantas aclimatadas en invernadero 90 días después de siembra .....	66
<b>Figura 24.</b> Tamaño de plúmula (cm) de plantas de <i>C. arabica</i> var. Colombia durante su crecimiento en invernadero por 90 días. ....	68
<b>Figura 25.</b> Número de hojas en plantas de <i>C. arabica</i> var. Colombia durante su crecimiento en invernadero por 90 días. ....	69
<b>Figura 26.</b> Área foliar de plantas de <i>C. arabica</i> var. Colombia después de 110 de crecimiento en invernadero. ....	73

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

*Coffea arabica* L. (café arábigo) junto con *Coffea canephora* P. (café robusta) son las dos especies de café cultivadas comercialmente (Cortina, *et al.*, 2013); a nivel mundial este cultivo representa uno de los productos más valiosos (ICO, 2017). En México el café es importante desde el punto de vista económico, social y ambiental, generando más de tres millones de empleos directos e indirectos, contribuyendo con cerca de 900 millones de dólares anuales (Escamilla, 2014; SAGARPA, 2015). La superficie cultivada de café en el país es de aproximadamente 708,247 hectáreas, las cuales se distribuyen en 488 municipios de los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Estado de México, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz. Los principales estados productores son Chiapas (35.28%), Veracruz (19.88%), Oaxaca (19.27%) y Puebla (9.93%) (SIAP, 2019; SAGARPA, 2017a).

En los últimos años la producción de café en México ha reportado su nivel mínimo desde que se tiene registro, debido a factores como la avanzada edad de los agroecosistemas, afectaciones climatológicas, la mala nutrición y la roya del café causada por el hongo *Hemileia vastatrix* Berk. y Br., que durante el ciclo productivo 2012-2013 afectó severamente las zonas cafetaleras de los estados de Chiapas, Puebla y Veracruz (Renard y Larroa, 2017; USDA, 2018).

Hasta 2013 las variedades de café no resistentes a la roya del cafeto (Typica, Bourbon y Caturra rojo) tenían una marcada dominancia en México, situación que llevó al uso constante de fungicidas para controlar esta enfermedad, (Renard y Larroa, 2017). Es por ello que el gobierno mexicano ha implementado programas cuyo objetivo es aumentar la productividad del sector cafetalero creando viveros certificados para suministrar a los productores plantas de calidad resistentes a diferentes razas de dicha enfermedad. La meta para el año 2019 es renovar 250000 hectáreas para lo cual se requerirán 750 millones de plantas (FIRA, 2016; USDA, 2018).

La renovación de plantaciones con materiales resistentes a la roya como la variedad Colombia es parte de la estrategia para reducir los efectos de esta enfermedad (USDA, 2018); no obstante, la tasa de reproducción de los sistemas tradicionales de propagación mediante semillas o esquejes, no permite cubrir la demanda que se tiene de plantas con las cuales se lleve a cabo dicha renovación (Kumar *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos es una técnica que ha permitido la propagación a gran escala de distintas especies vegetales (Campos *et al.*, 2017; Georget *et al.*, 2017). Diversos protocolos para la propagación de café mediante embriogénesis somática han sido desarrollados (Etienne *et al.*, 2013; Montes-Cruz *et al.*, 2017); no obstante, la falta de sincronización en la diferenciación de embriones, así como el bajo porcentaje de maduración, germinación y conversión de los mismos, son algunos de los factores que limitan el desarrollo de protocolos eficientes de propagación de café mediante embriogénesis somática, requiriéndose mayor investigación en este tema (Costa *et al.*, 2011).

## **Objetivos**

### **General**

- Determinar el efecto de reguladores del crecimiento, sorbitol, PEG 8000 y sacarosa en el desarrollo, sincronización, maduración, germinación y conversión de embriones somáticos de café var. Colombia.

### **Específicos**

- Obtener cultivos embriogénicos de la variedad Colombia de café.
- Estudiar el efecto de reguladores crecimiento, PEG 8000, sorbitol y sacarosa en el desarrollo, sincronización, maduración, germinación y conversión de embriones somáticos de café.

## **Hipótesis**

### **General**

- Altas concentraciones de sacarosa o sorbitol en la fase de diferenciación de los embriones somáticos promoverán el desarrollo y sincronización de embriones somáticos de café var. Colombia; mientras que altas concentraciones de ABA, ASA, AIA, GA<sub>3</sub>, PEG 8000 o sacarosa promoverán mayor maduración, germinación y conversión de dichos embriones.

### **Específicas**

- El ácido 2,4-diclorofenoxiacético y bencilaminopurina en la misma proporción induce la formación de callos embriogénicos en explantes foliares de café var. Colombia.
- La exposición de los cultivos embriogénicos a los reguladores de crecimiento junto con agentes osmóticos (sorbitol y sacarosa) promoverá la formación sincronizada de embriones somáticos.
- La fase de desarrollo de los embriones (globular o torpedo) determinará su respuesta a los reguladores de crecimiento (ABA o ASA) o agentes osmóticos (PEG 800 y sacarosa).
- Al menos uno de los compuestos probados, ya sea reguladores de crecimiento (ABA o ASA) o agentes osmóticos (PEG 800 y sacarosa) promoverá la maduración, germinación y conversión de los embriones somáticos.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen y descripción botánica de *Coffea arabica*

En la actualidad, los estudiosos de este cultivo están de acuerdo que *Coffea arabica* se originó en Etiopía, albergándose allí la mayor diversidad del germoplasma de esta especie (Teketay, 1999). La mayoría de las variedades comerciales que se cultivan en el mundo pertenecen y proceden de dos bases genéticas que se extendieron desde Yemen (Anthony *et al.* 2002). El polimorfismo de esta especie se redujo durante los ciclos de selección, debido a la homogeneización de las estructuras genéticas, favorecido por su predominante autogamia (Carvalho *et al.*, 1991).

El género *Coffea*, forma parte de la familia Rubiaceae, este género alberga varias especies; sin embargo sólo *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre ex Froehner figuran como las más importantes económicamente. Todas las especies de este género son plantas leñosas ya sea de tipo arbustivo o arbóreo, en el caso de *Coffea arabica* presenta un tipo de hoja perenne y verde, siendo que las hojas recientemente desarrolladas de algunas variedades son bronceadas o teñidas de púrpura (Teketay, 1999).

*Coffea arabica* tiene hojas y ramas opuestas albergadas en brotes verticales (ortotrópicos) que producen ramas horizontales (plagiotrópicas) de los brotes superiores en cada axila de la hoja, mientras que los brotes inferiores pueden producir solamente brotes verticales nuevos, esta especie tiene flores fragantes y blancas, presentes en uno o más fascículos de flores con un tallo común (pedúnculo), los fascículos y las inflorescencias de una sola flor pueden aparecer en la misma axila, estas flores generan frutos de tipo drupa, generalmente carnosa, con piel llamada pulpa, o mesocarpio, que es jugoso y que envuelve al endocarpio o pergamino, dentro del cual se encuentra la semilla y el embrión el cual es erecto, algo curvo y está rodeado por el endospermo. Estos frutos tienen una gran variedad de colores, desde verde a rojo y violeta a negro, mientras que otros son amarillos (Teketay, 1999).

### 2.2 Variedades comerciales de café

En México la producción de café se basa principalmente en variedades de la especie *C. arabica* L., como Typica, Bourbon, Caturra Rojo, Mundo Novo, Garnica y Caturra Amarillo y en menor volumen la variedad Robusta de *C. canephora* P. (Escamilla *et al.*, 2005; SAGARPA, 2015). En su

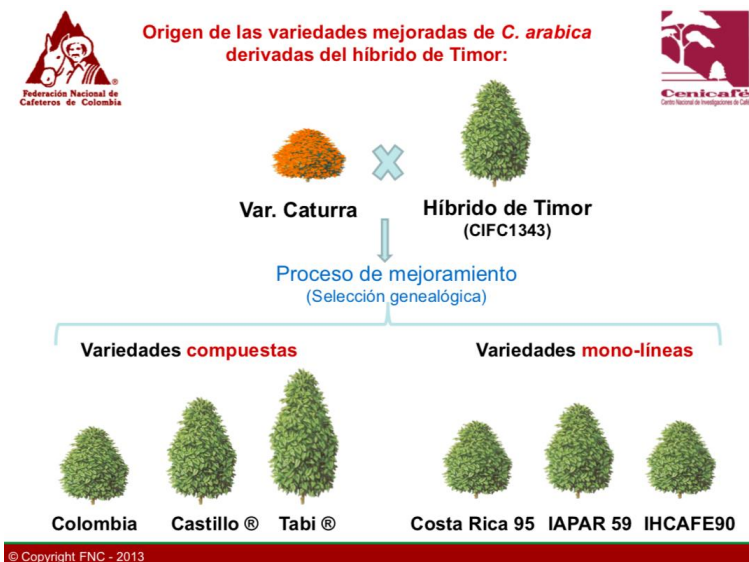
mayoría las variedades de *C. arabica* cultivadas en el mundo son parecidas genéticamente pero diferentes en su morfología y calidad tanto pre como postcosecha (Steiger *et al.*, 2002).

En las regiones cafetaleras de Latinoamérica las variedades de café arábica provienen de semillas de unas pocas plantas de las variedades Típica y Bourbon originarias de Etiopía, derivándose de ellas algunas otras variedades como Caturra, Mundo Novo, Catuaí, Pache, Villa Sarchí, Pacas, Maragogipe, etc., debido a cruzamientos espontáneos o dirigidos, y mutaciones naturales. Estas variedades no presentan resistencia genética a enfermedades y plagas, como las razas más agresivas de la roya del café causada por *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. (Anzueto, 2013).

#### *Coffea arabica* var. Colombia

Con base en distintos programas de mejoramiento genético se han logrado identificar fuentes de resistencia genética a la roya siendo *C. canephora* la especie más utilizada para la obtención de variedades resistentes, específicamente con la utilización del Híbrido de Timor cuyo origen es un cruzamiento espontáneo entre la variedad Típica de *C. arabica* y Robusta de *C. canephora*. A partir de tres accesiones (1, 2 y 3) de este material que presentaron resistencia a la roya se desarrollaron tres grupos mediante el cruzamiento con las variedades Caturra, Villa Sarchí y Caturra Amarillo las cuales son susceptibles y de porte bajo, dos de los cruzamientos fueron realizados en Portugal en el CIFC (Centro Internacional de las royas del cafeto) y un tercero por Cenicafé en Colombia (Anzueto, 2013).

De estos cruzamientos se generaron descendencias nombrándose “Catimores” a las obtenidas de la cruce de Caturra por el Híbrido de Timor 1 (CIFC 832/1), “Sarchimores” a los resultantes del cruzamiento de Villa Sarchí por el Híbrido de Timor 2 (CIFC 832/2) y por último de la cruce de Caturra Amarillo por el Híbrido de Timor 3 (CIFC 1343) se obtuvo la variedad multilínea “Colombia” (Anzueto, 2013) (Figura 1). Las variedades Colombia tanto de “Brote verde y Brote café”, son reportadas como resistentes a la roya; además, superan en producción (más de 20 kg por planta en 5 años) a los cultivares Pacamara, Pluma Hidalgo 177, Blue Mountain, y Typica, y presentan mejor aroma que la variedad Garnica TCPB (Garnica Tres Cruces Porte Bajo) (Escamilla *et al.* 2005; López-García *et al.*, 2016).



**Figura 1.** Origen de la variedad Colombia de *Coffea arabica* (Cortina, 2013).

### 2.3 Importancia del café

El café es un cultivo estratégico para México ya que representa 0.66% del PIB agrícola nacional y emplea a más de 500,000 agricultores de 488 municipios. México exporta café a Estados Unidos, Europa, Japón, Cuba y Canadá; sin embargo, la producción nacional ha caído un 43.51% en la última década, aumentando las importaciones provenientes principalmente de Brasil, Honduras y Vietnam (SAGARPA, 2017a). La reducción de la producción nacional se debe principalmente a los precios bajos en el mercado mundial, aunado a la incidencia de la roya. Tal situación llevó a redefinir la política pública del sector cafetalero para maximizar el desarrollo productivo nacional impulsando campañas de fitosanidad integradas a la región centroamericana, intensificar programas de replantación y recapea en parcelas existentes, incentivar la replantación de variedades élite, adquirir y la transferir de paquetes tecnológicos que permitan mejorar la capacidad de las plantaciones para adaptarse al cambio climático (SAGARPA, 2017b).

### 2.4 Formas de propagación de café

#### Semillas

Actualmente la mayoría de las plantas de café se obtienen a través de semillas (Da Rosa *et al.*, 2010), las cuales han sido clasificadas como intermedias, es decir, que toleran más la pérdida de

agua (7-12 %) que las semillas recalcitrantes, pero son menos tolerantes que las semillas ortodoxas. Dicha condición conlleva a una rápida pérdida de la viabilidad; asimismo, el embrión es muy susceptible de sufrir daño a temperaturas inferiores a 25 °C (Bytof *et al.*, 2007; Dussert *et al.*, 2006; Eira *et al.*, 2006). Las condiciones específicas de almacenamiento de semillas de café dificultan su conservación por periodos prolongados de tiempo, repercutiendo en su capacidad germinativa (Barboza y Herrera, 1990). Arizaleta *et al.* (2005) observó que la emergencia de *C. arabica* fue afectada por el período de almacenamiento, el tipo de empaque y por las condiciones de éste, produciéndose una notoria reducción desde el segundo mes y llegando a 58.05 %, después de 10 meses de almacenamiento. Se ha observado que las condiciones de humedad afectan la capacidad germinativa del café, encontrándose un gran deterioro de las semillas mientras más húmedos y calientes permanezcan los granos de café, siendo un 12.5% el nivel óptimo de humedad para su conservación (Puerta, 2013).

### **Estacas**

Una alternativa de propagación en café es el uso de estacas o esquejes enraizados (Kuit *et al.*, 2004); esta técnica se ha empleado desde mediados del siglo pasado en países productores de café como Brasil y Ecuador y es utilizada para el aprovechamiento de cafetos con características sobresalientes (Méndez *et al.*, 2015). En este método existe el inconveniente de que el sistema radical puede ser poco vigoroso o mal desarrollado y no es recomendable para zonas en donde las sequías son comunes (Kuit *et al.*, 2004).

## **2.5 Cultivo *in vitro*: Micropropagación**

La micropropagación vegetal es la producción de plantas a partir de un segmento de tejido, órgano o célula (explante), los cuales son cultivados bajo condiciones físicas y químicas controladas utilizando las técnicas de cultivo de tejidos (Taji *et al.*, 2002). La micropropagación puede llevarse a cabo mediante organogénesis (formación de órganos, vástago o raíz) o embriogénesis somática (formación de embriones asexuales) (Radice, 2010).

## **2.6 Embriogénesis somática**

La embriogénesis somática es definida como el proceso a partir del cual se obtienen estructuras similares a embriones cigóticos sin que ocurra la unión de los gametos masculino y femenino. Este proceso al igual que en otros tipos de morfogénesis ha sido dividido en tres fases conocidas como



fase de adquisición de competencia, fase de inducción y fase de diferenciación (Radice, 2010). La formación de embriones puede llevarse a cabo directamente de las células del explante (directa) o a partir de una masa desorganizada de células llamada callo (indirecta) (George y Debergh, 2008). La capacidad embriónica de una especie depende de factores como el genotipo, el tipo de explante, su estado fisiológico, la edad de la planta madre, la composición del medio de cultivo, la concentración hormonal endógena del explante, así como por estrés y luz (Jiménez, 2005; Radice, 2010; López-Gómez *et al.*, 2010; Pérez-Jiménez *et al.*, 2014).

La embriogénesis somática es una importante herramienta biotecnológica que ofrece la oportunidad de regenerar plantas completas a partir de una estructura bipolar (embrión) sin conexión vascular con el tejido circundante (Germana y Lambardi, 2016; Winkelman, 2016). Esta técnica representa el método más rápido para la multiplicación masiva de genotipos élite en un gran número de especies económicamente importantes (Landey *et al.*, 2013; Nic-Can *et al.*, 2015).

En la embriogénesis somática indirecta las llamadas masas proembriónicas se forman de grupos de células pequeñas y con un citoplasma denso las cuales dan origen a la diferenciación de embriones (Winkelman, 2016). Actualmente, dos son las teorías sobre el origen de células de carácter embriónico, la primera y más aceptada propone que las células somáticas pueden recuperar su capacidad embriónica cuando reciben un estímulo correcto, al pasar células por una fase de dediferenciación. La segunda teoría, sugiere que en los tejidos de las plantas se conservan algunas células en estado totipotente (células madre embriónicas); por tal motivo la mayor cantidad de células no responden a un estímulo proporcionado debido a que no tienen la capacidad para hacerlo y solo las que conservan esta capacidad formarán embriones, además de que con el envejecimiento de los tejidos, la proporción de células madre totipotentes/células diferenciadas disminuye, por ello se recomienda utilizar tejidos jóvenes como explantes (Campos *et al.*, 2017).

## **2.7 Embriogénesis somática en café**

Diversos protocolos sobre embriogénesis somática en el género *Coffea* han sido desarrollados (Etienne *et al.*, 2013; Montes-Cruz *et al.*, 2017; Georget *et al.*, 2017; Carlsson *et al.* 2019), lo que demuestra que esta técnica es confiable para la propagación a gran escala de variedades élite, exhibiendo un comportamiento genético y agronómico sin limitaciones para su uso comercial (Campos *et al.*, 2017; Afreen *et al.*, 2002; de Rezende *et al.*, 2016; Landey *et al.*, 2013). Además,

las plantas procedentes de embriones somáticos de híbridos F1 han mostrado mayor vigor en el vivero que el de las plantas propagadas por semillas (Menéndez-Yuffa *et al.*, 2010).

En Centro América la embriogénesis somática de *C. arabica* se ha llevado a escala comercial con alrededor de 7 millones de plantas que se han puesto en campo. En México (Veracruz) en 2012 se estableció una unidad de producción para proveer de plantas a los productores de la región (Etienne *et al.*, 2010; Etienne *et al.*, 2013).

El primer reporte de iniciación y desarrollo de embriones somáticos en el género *Coffea* fue hecho por Staritsky en 1970, quien logró obtener plantas de *C. canephora*; posteriormente, Sharp *et al.* (1973), obtuvieron callos de *C. arabica* al cultivar semillas, hojas y anteras y más tarde, Herman y Haas (1975), reportaron por primera vez la regeneración de plantas a través de embriogénesis somática en *C. arabica*.



**Figura 2.** Estados de desarrollo de embriones somáticos de café del genotipo INIFAP 00-28, de izquierda a derecha: etapa globular, etapa corazón, etapa torpedo y etapa cotiledonar, barra = 1 mm. (López-Gómez *et al.*, 2010).

Por su parte, Moncada *et al.* (2004) reportaron la formación de callo embriogénico en la variedad Catuaí a partir de segmentos de hoja cultivados en un medio Murashige y Skoog (1962), (MS), más  $2.7 \text{ mg L}^{-1}$  de 6-bencilaminopurina (BAP) y  $1.0 \text{ mg L}^{-1}$  de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los mejores resultados en cuanto a la formación de embriones (57.6%) se observaron en el

medio que contenía 2.7 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.3 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D ó 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA) y 1.2 mg L<sup>-1</sup> de KNO<sub>3</sub>. Los embriones somáticos obtenidos se transfirieron a un medio con 20 g L<sup>-1</sup> sacarosa sin reguladores de crecimiento.

Samson *et al.* (2006) indujeron callo colocando explantes foliares de *C. arabica* de las variedades AR 38-05 y AR 26-06 durante un mes en un medio MS adicionado con 0.6 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 1 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP; posteriormente los callos se transfirieron a un medio con 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP durante 2 meses para generar callo embriogénico, mientras que para la formación de embriones utilizaron 2 mg L<sup>-1</sup> de 6-furfurilaminopurina (cinetina).

Gatica-Arias *et al.* (2008) obtuvieron callos embriogénicos de la variedad Caturra y Catuaí al cultivar explantes foliares en un medio MS suplementado con 4 mg L<sup>-1</sup> de cinetina y 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D. La mayor cantidad de embriones (307.6), se observó al colocar 1.15 g L<sup>-1</sup> de callo embriogénico en el medio propuesto por Van Boxtel y Berthouly (1996). Estos autores lograron germinar y convertir dichos embriones en plántulas en un medio Yasuda líquido en un recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA®).

López-Gómez *et al.* (2010) estudiaron la respuesta morfogénica de hojas inmaduras, jóvenes y maduras de 10 genotipos de café de *C. canephora* y tres líneas ‘Catimor F7’ de *C. arabica*. Estos autores encontraron que las hojas inmaduras y jóvenes cultivadas en medio Yasuda *et al.* (1985) con 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 5.0 g L<sup>-1</sup> phytigel formaron embriones somáticos con mayor frecuencia que las hojas maduras y que los genotipos de la especie *C. canephora* mostraron una mayor capacidad morfogénica.

Asimismo, Costa *et al.* (2011) probaron el efecto de 2,4-D y 2-isopenteniladenina (2-iP) en la inducción de callo embriogénico en 10 cultivares de *C. arabica* x *C. racemosa* (4-20, 20-5, 10-1, 5-14, 6-38, 14-8, 14-3, 8-10, 02 y 10-8). Estos autores encontraron que el máximo porcentaje de explantes que formó callo embriogénico (38.4 %) se obtuvo en un medio Van Boxtel y Berthouly (1996), suplementado con 4.4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 4.1 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP.

Landey *et al.* (2015) estudiaron el efecto de la edad de los callos en su capacidad para regenerar plantas. Los callos se cultivaron durante 4, 11 y 27 meses en un medio de multiplicación que contenía las sales MS al 50% más 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 2.7 mg L<sup>-1</sup> de BAP, y luego se transfirieron

a uno que contenía 3.8 mg L<sup>-1</sup> de BAP. Los autores observaron que los callos de las tres edades lograron regenerar plantas, pero las plántulas obtenidas de los callos de 11 y 27 meses de edad eran fenotípicamente anormales.

En otro trabajo Ayil-Gutiérrez *et al.* (2013) colocaron plántulas por 14 días en un medio MS con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina para estimular la síntesis y acumulación endógena de AIA y después transfirieron los explantes foliares en un medio MS con 1.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP, obteniendo así embriones somáticos. Por su parte, Montes-Cruz *et al.* (2017) utilizaron un medio MS con 1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D y 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP para la formación de callo embriogénico, mientras que para la formación de embriones utilizaron uno con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina. Asimismo, Bartos *et al.* (2018a) generaron callo en un medio MS con 4.4 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, 2 mg L<sup>-1</sup> de 2-iP y 1 mg L<sup>-1</sup> AIB, y después lo colocaron en un medio con 2.2 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D, obteniendo así callo embriogénico; dicho callo regeneró embriones somáticos cuando se cultivó con 2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de ANA.

### **2.8 Limitantes en la embriogénesis somática en *Coffea arabica* L.**

El proceso mediante el cual se obtienen embriones somáticos en *Coffea arabica* es más tardado que en otras especies (9-10 meses); asimismo, la falta de sincronización en la diferenciación de los embriones, la baja tasa de formación de embriones, la presencia de anomalías, la ineficiencia en la fase de maduración y conversión de embriones en plantas, son algunos de los aspectos que limitan el desarrollo de protocolos eficientes para la propagación masiva de plantas en esta especie (Afreen *et al.* 2002; Etienne *et al.*, 2006; Srinivas *et al.* 2006; Gatica-Arias *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2011; Campos *et al.*, 2017).

### **2.9 Relaciones hormonales en la embriogénesis somática**

Uno de los factores que afectan la embriogénesis somática es el nivel hormonal endógeno, especialmente el equilibrio entre auxinas y citocininas, las cuales interactúan entre sí y con una variedad de señales metabólicas y de desarrollo (Gaj, 2004; Campos *et al.*, 2017). Gaj (2004) propone que para que exista la transición de una célula somática a una célula embriogénica debe de haber un aumento en el nivel endógeno de ácido indolacético (AIA) desde los primeros días de cultivo; en general se ha visto que los explantes con niveles endógenos de auxinas más altos son

más sensibles al proceso de inducción (Jimenez, 2005), debido a que promueven la reactivación de la división de células individuales o grupos celulares (Pasternak *et al.*, 2002; Jimenez, 2005; Fehér, 2019; Fehér, 2015).

En la mayoría de los protocolos desarrollados para inducir embriogénesis somática es frecuente el uso de auxinas solas o en combinación con citocininas, siendo el 2, 4-D la auxina más utilizada. Dichos reguladores afectan directa o indirectamente el equilibrio de auxinas endógenas, así como la reprogramación genómica de las células debido a cambios dinámicos en la estructura de la cromatina por la metilación del ADN obteniendo así la competencia embriogénica (Gaj 2004; Vondráková *et al.*, 2011; Xu *et al.* 2013; Fehér, 2015; Fehér, 2005; Karami y Saidi, 2010). La concentración óptima de reguladores de crecimiento así como el tiempo de exposición y el tipo de regulador varían no sólo de acuerdo a la especie sino también entre variedades de la misma especie (Campos *et al.*, 2017).

Aunque para la embriogénesis somática de algunas variedades de *C. canephora* se ha mencionado no ser necesario el uso de auxinas (López-Gómez *et al.*, 2010; López-Gómez *et al.*, 2016), para *C. arabica* las auxinas en conjunto con citocininas son de vital importancia (Van Boxtel y Bertouly, 1996; Gaj 2004; Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013). En este sentido para la obtención de callo primario Berthouly y Michaux-Ferriere (1996) utilizaron una relación auxina-citocinina de 1:2, mismo que se ha usado en protocolos actuales de esta especie con concentraciones que van de 0.6- 2.2 mg L<sup>-1</sup> de auxina y de 1.0-4.0 mg L<sup>-1</sup> mg de citocinina; luego los callos se transfieren a un medio que contenga una relación 1:3 de auxina:citocinina. Por último, los callos embriogénicos son cultivados en un medio de diferenciación con citocininas solamente (0.5- 2 mg L<sup>-1</sup>) (Samson *et al.*, 2006; Ribas *et al.*, 2011; Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013; Montes-Cruz *et al.*, 2017; Bartos *et al.*, 2018a).

## **2.10 El papel del estrés y hormonas en la embriogénesis somática**

### **2.10.1 Inducción**

Las plantas son organismos sésiles, que presentan mecanismos de adaptación continua para garantizar su supervivencia debido a que dependen de las condiciones de su entorno, en el cual se encuentran expuestas a diversos factores ambientales como alta salinidad, deshidratación, frío, o

calor (Karami y Saidi, 2010; Fehér, 2015). Zavattieri *et al.* (2010) y Fehér (2015) mencionan que la embriogénesis somática *in vitro* es el resultado del estrés celular asociado con la eliminación de las células de su entorno tisular, por estrés oxidativo y/o con la alteración de su equilibrio hormonal endógeno.

Se ha propuesto que la inducción de la embriogénesis somática puede ser estimulada por factores que causan estrés como un choque osmótico, estrés hídrico, iones de metales pesados, alteraciones del pH del medio de cultivo, tratamientos de choque térmico, hipoxia, antibióticos, radiación ultravioleta, agentes químicos, alta concentración de auxinas, baja o alta salinidad, intensidad de luz o por el simple estrés oxidativo causado por la herida del explante (Cabrera-Ponce *et al.*, 2015; Cueva Agila *et al.*, 2015; Chagas *et al.*, 2018; Rose, 2019). Dichos factores de estrés no solo causan la desdiferenciación de las células de los explantes sino también su posterior diferenciación en embriones somáticos (Zavattieri *et al.*, 2010). El mecanismo molecular del efecto estimulante del tratamiento del estrés sobre la diferenciación celular y la morfogénesis no está claro (Gaj, 2004); sin embargo, se sabe que las primeras fases de la embriogénesis somática se caracterizan por la activación de genes relacionados con el estrés, lo que lleva a la hipótesis de que la embriogénesis somática es una respuesta de las células al estrés, la cual es dependiente del nivel de tensión y del estado fisiológico de las células (Karami y Saidi, 2010; Zavattieri *et al.*, 2010).

Compuestos como sorbitol, manitol y sacarosa han sido utilizados como agentes de estrés osmótico para inducir la embriogénesis somática en especies como *Arabidopsis thaliana* (Ikeda-Iwai *et al.*, 2003), *Picea mariana* y *P. glauca* (Iraqi *et al.*, 2005), *Dianthus caryophyllus* (Karami *et al.*, 2006), *Cinnamomum camphora* (Shi *et al.*, 2009), *Copiapoa tenuissima* (Lema-Rumińska *et al.*, 2013), *Phaseolus vulgaris* (Cabrera-Ponce *et al.*, 2015). La respuesta a dichos compuestos ha estado en función del tipo y duración del tratamiento.

Por otra parte, la sacarosa es el principal carbohidrato sintetizado por las plantas y se ha usado como fuente de carbono para sostener el crecimiento y la diferenciación de los cultivos celulares; no obstante, la sacarosa en altas concentraciones también puede actuar como un agente osmótico (De Paiva y Otoni, 2003). El estrés osmótico causado por altas concentraciones de sacarosa ha inducido la embriogénesis somática en especies como *Cinnamomum camphora*, esta respuesta embriogénica puede estar relacionada con un aumento en el suministro de carbono en el interior

de las células, estas condiciones hipotónicas impiden la expansión celular y finalmente conducen a la formación de embriones somáticos (Shi *et al.*, 2009).

### 2.10.2 Sincronización

Diversos estudios confirman que en condiciones de cultivo *in vitro* el sorbitol puede actuar como un agente osmótico en una etapa temprana, y posteriormente, como una fuente de carbono, aunque se sabe que las células de algunas especies no lo pueden metabolizar o su capacidad de metabolizarlo es diferente (Geng *et al.*, 2008; Al-Kaaby, 2013; Shahsavari, 2011). La enzima sorbitol-deshidrogenasa (SDH) es la encargada de metabolizar el sorbitol en plantas superiores; en plantas de la familia Rosaceae se han encontrado de 1 a 16 copias de estos genes (Jia *et al.*, 2015); en tanto que en *C. arabica* se han reportado solo cuatro copias del gen (NCBI, 2018). Aunado a la acumulación de azúcares en células tratadas con sorbitol, también se ha encontrado que el estrés osmótico causado por la presencia de sorbitol genera la acumulación de proteínas involucradas en la embriogénesis somática (Kramut y Te-chato, 2010).

Montalbán *et al.* (2010) evaluaron el efecto de ABA (15.9 o 23.8 mg L<sup>-1</sup>) y sacarosa (30 y 60 g L<sup>-1</sup>) en la formación de embriones somáticos de *Pinus radiata*; los autores encontraron que en un medio de maduración de callo para la producción de embriones con 15.9 mg L<sup>-1</sup> de ABA y 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, incrementaba la eficiencia en la formación de embriones somáticos con hasta 1550 embriones por cada 100 mg de callo embriogénico.

### 2.10.3 Maduración

Durante la etapa de maduración de los embriones somáticos ocurren cambios morfológicos y bioquímicos como el aumento en la talla y la deposición de materiales de reserva, los cuales son esenciales para el posterior desarrollo de la planta, así como la capacidad de volverse fotoautótrofos (Etienne, 2005; Aslam *et al.*, 2011; Márquez-Martín *et al.*, 2011). En este sentido Von Arnold *et al.* (2002), afirma sólo los embriones maduros que hayan acumulado suficientes materiales de reserva al final de la maduración se desarrollarán en plantas normales. Para provocar estos cambios morfológicos y bioquímicos y lograr la maduración de los embriones somáticos es necesario incrementar la osmolaridad en el medio de cultivo de maduración, lo cual se consigue con una disminución en el potencial hídrico; dicha disminución puede lograrse en los cultivos

embriogénicos, mediante el empleo de agentes osmóticos (Martínez *et al.*, 2017; Márquez-Martín *et al.*, 2011).

Una alternativa para aumentar la maduración de embriones somáticos es su desecación en condiciones estériles, sin embargo ya que las semillas cigóticas de café son clasificadas como intermedias, y que los embriones somáticos presentan características fisiológicas similares a los embriones cigóticos (Etienne *et al.*, 2013; Bartos *et al.*, 2018b), un proceso de desecación previa para inducir su maduración y germinación no parece ser necesaria, ya que las bajas temperaturas y el bajo contenido de agua (generado por una desecación) en semillas de café generan un efecto perjudicial sobre su supervivencia (Eira *et al.*, 2006), lo cual puede también ser perjudicial en embriones somáticos de esta especie.

Existen diversos estudios que se centran en el papel de diferentes carbohidratos u otras moléculas que causan estrés osmótico y que cuando se incluyen en el medio de cultivo promueven la maduración de los embriones somáticos (Lipavská *et al.*, 2000). Como se mencionó anteriormente la sacarosa en altas concentraciones en el medio de cultivo puede actuar como un agente osmótico, permitiendo la acumulación de sustancias de reserva (principalmente almidón) que se utilizarán durante la germinación y conversión (Iraqi y Tremblay, 2001; Etienne, 2005). La sacarosa en el medio de cultivo se hidroliza rápidamente por parte de la sacarosa sintasa (SuS) o la invertasa (Inv) para dar lugar a la acumulación de reservas de glucosa, fructuosa y almidón y consecuentemente a un aumento gradual de la presión osmótica (Wobus y Weber, 1999).

En cultivos embriogénicos de *Picea mariana* se observó que concentraciones altas de sacarosa (60 g L<sup>-1</sup>) estimularon la acumulación y la actividad de una invertasa apoplástica (Ap Inv) y la liberación de otra invertasa denominada invertasa extracelular en el medio de cultivo, las cuales contribuyen a la utilización y degradación de la sacarosa generando la deposición de almidón (Iraqi *et al.*, 2005), además de que la hidrólisis de la sacarosa genera una señal que promueve la síntesis de proteínas de reserva considerándose así como un regulador de la expresión de genes relacionados con la síntesis de estas proteínas (Iraqi y Tremblay, 2001).

Asimismo, el ácido abscísico (ABA) es una hormona que juega un papel importante en las señales de estrés (Rudus *et al.*, 2009). En las semillas sexuales el ABA está implicado en los procesos de



maduración, síntesis y almacenamiento de sustancias de reserva y la síntesis de las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) las cuales están involucradas en la tolerancia a la desecación (Chakrabortee *et al.*, 2007). En el cultivo de tejidos el ABA ha sido recientemente utilizado para inducir la acumulación de sustancias de reserva y la maduración de embriones somáticos de nuez persa (*Juglans regia* L.) (Vahdati *et al.*, 2008). Al respecto, Ruduś *et al.* (2009) observó que durante la diferenciación y el desarrollo de los embriones somáticos de *Medicago sativa* L., la síntesis de ABA se incrementó pero disminuyó cuando los embriones alcanzaron el estado cotiledonar tardío.

Por otra parte, Thomas (2006) estudió la maduración de embriones somáticos de *Tylophora indica*; para tal fin, cultivó dichos embriones en un medio con diferentes concentraciones de sacarosa (0, 17.1, 34.2, 68.4, y 102.6 g L<sup>-1</sup>) o glucosa (0, 9, 18, 36, 54 g L<sup>-1</sup>) o la combinación entre éstas dos así como 0, 0.7, 1.7, 3.5, y 6.9 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>), y 0, 0.1, 0.3, 0.5, y 1.3 mg L<sup>-1</sup> de ácido abscísico (ABA). Este autor encontró que el mayor porcentaje de maduración de los embriones ocurrió cuando incluyó 68.4 g L<sup>-1</sup> de sacarosa en el medio de cultivo. Asimismo, para promover la maduración y germinación de embriones somáticos de guayaba (*Psidium guajava*) Rai *et al.* (2007) colocaron embriones inmaduros en un medio con 10, 30 y 50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y sin reguladores del crecimiento durante 2 meses; ellos encontraron que 50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa generaba embriones mejor desarrollados, más compactos y de color blanco lechoso.

Sghaier-Hammami *et al.* (2010) cultivaron durante cuatro semanas embriones somáticos de palma datilera en presencia de ABA (1.3-10.6 mg L<sup>-1</sup>) o sacarosa (30 o 90 g L<sup>-1</sup>). Estos autores observaron que con 90 g L<sup>-1</sup> de sacarosa el grosor de los embriones y la cantidad de proteínas de reserva (leguminas) fue mayor que en aquellos cultivados con ABA.

Un estrés osmótico puede ser generado al aumentar la concentración osmótica del medio ya sea al utilizar un osmótico permeable como sacarosa o un osmótico no permeable como polietilenglicol (PEG) (Attree *et al.*, 1991). Por ello el PEG ha sido ocupado como un agente osmótico para aumentar la maduración de embriones somáticos en distintas especies, y el efecto de este compuesto se ha relacionado con su naturaleza no permeable (Attree y Fowke, 1993, Blanc *et al.*, 2002).

En *Carica papaya* Vale *et al.* (2014) evaluaron el efecto de distintas concentraciones de polietilenglicol (PEG 3350) en la maduración de embriones somáticos. Los resultados indican que 60 g L<sup>-1</sup> de PEG generó el número más alto de embriones cotiledonares; en estos embriones el contenido de materia seca y la síntesis y acumulación de proteínas como la enolasa, esterasa y alcohol deshidrogenasa (ADH3), involucradas en el metabolismo de carbohidratos, de ácidos grasos y de óxido-reducción, respectivamente, incrementó notoriamente. Por otro lado, en *Sapindus mukorossi*, Singh *et al.* (2015) colocaron embriones somáticos globulares en un medio con 10-50 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, así como ABA (0.2 mg L<sup>-1</sup>) durante 7, 14 o 21 días. Estos autores encontraron que 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa fue más favorable para el desarrollo y la maduración, que la adición de ABA.

Asimismo, González *et al.* (2000) lograron que 56.1 % de los embriones somáticos de *C. canephora* var. Robusta maduraran cuando se cultivaron durante 12 semanas en un medio que contenía 1.0 mg L<sup>-1</sup> de ABA y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Por otro lado, Etienne (2005) para inducir la maduración de embriones somáticos de *C. canephora* var. Robusta, utilizó un medio líquido con 0.3 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 40 g L<sup>-1</sup> sacarosa; después de 8 semanas 86% de los embriones maduraron.

El estrés generado por los osmorreguladores puede inducir la expresión de genes implicados en el desarrollo de embriones somáticos, por ejemplo, con la adición de PEG durante la maduración de embriones somáticos de *Picea glauca* se estimuló la transcripción de los genes glutamina-sintetasa y glutamato-sintasa, que están involucrados en el metabolismo del nitrógeno y la deposición de proteínas de almacenamiento (Stasolla *et al.*, 2003).

#### 2.10.4 Germinación de embriones somáticos y conversión en plantas

Se ha hecho poco énfasis en la diferencia entre la germinación y la conversión, puesto que la germinación se refiere a la protrusión de la radícula y emergencia de los cotiledones (Merkle *et al.*, 1995), mientras que la conversión, se refiere a la supervivencia y desarrollo (crecimiento de raíces y hojas) de estas plántulas, para formar plantas *in vitro* o *ex vitro* (Stuart y Strickland, 1984). El éxito en la conversión dependen en gran medida de la eficacia de la fase de maduración (Etienne *et al.*, 2013).

En el caso de semillas de café se ha determinado que existe una correlación entre el grado de

madurez y su capacidad germinativa, vigor y anomalías presentes en las plántulas obtenidas, es decir, que aquellas semillas no maduras muestran bajas tasas de germinación (Herrera *et al.*, 1993).

Robichaud *et al.* (2004) desarrollaron un protocolo para la maduración y germinación de embriones somáticos de castaña americana (*Castanea dentata*). Ellos cultivaron embriones en estado de torpedo y cotiledorares en el medio basal WPM (Woody Plant Medium) con 3.3 g L<sup>-1</sup> de asparagina, 3.6 g L<sup>-1</sup> de L-glutamina, sacarosa (30-75 g L<sup>-1</sup>), ABA (0.1-2.0 mg L<sup>-1</sup>) o PEG 6000 (0.0-100 g L<sup>-1</sup>). El máximo porcentaje de germinación (14.7) se observó en el medio que contenía 3.3 g L<sup>-1</sup> de asparagina.

Cabrera-Ponce *et al.* (2015) lograron que 25% de los embriones somáticos de frijol (*Phaseolus Vulgaris*) de las variedades Negro Querétaro, Flor de Mayo, Negro Sinaloa, Flor de Junio, Mayacoba, y Pinto Americano, germinaran al colocarlos en un medio con 3 % glucosa, 3.0 g L<sup>-1</sup> de gelrite, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 0.1 mg L<sup>-1</sup> de AIB, y 0.01 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, una vez que fueron madurados en presencia de 40 g L<sup>-1</sup> de PEG 8000.

Hazubska-Przyby *et al.* (2016) encontraron que la germinación de los embriones de *Picea abies* y *P. omorika* estuvo influenciada por las condiciones de maduración, ya que aquellos cultivados en presencia de 17 g L<sup>-1</sup> de sacarosa o 2.6 mg L<sup>-1</sup> de ABA germinaron precozmente, en tanto que los que se mantuvieron con 68 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, mostraron mayor tamaño de radícula al germinar.

Sánchez *et al.* (2003) lograron 32 % de conversión cuando cultivaron embriones somáticos maduros de *Quercus robur* en un medio de germinación con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 3 mg L<sup>-1</sup> de ácido giberélico (AG<sub>3</sub>) durante dos semanas, para luego transferirlos a un medio con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa.

### **2.11 Aclimatación de plantas obtenidas por embriogénesis somática**

La fase de aclimatación de las plantas jóvenes se refiere a su remoción de condiciones *in vitro* para ser colocadas en un sustrato en condiciones *ex vitro*. Durante la etapa de aclimatación ocurren cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que permiten que las plantas sobrevivan y se desarrollen vigorosamente (Sama *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2006). De manera tradicional, el

ambiente de aclimatación *ex vitro* se ajusta reduciendo gradualmente la humedad relativa ambiental y los niveles de luz (Kumar y Rao 2012). La optimización del proceso de aclimatación implica el suministro de nutrientes, el uso de sustratos adecuados, el uso de reguladores de crecimiento y el control del entorno de cultivo, para garantizar un rápido y correcto desarrollo de las plantas (de Rezende *et al.* 2016; Afreen *et al.*, 2001).

Se ha visto que una baja tasa de supervivencia durante la aclimatación está relacionada con un mal desarrollo y principalmente con la presencia de raíces cortas obtenidas durante la conversión (Esayas y Yashwant, 2017). Llebrés *et al.* (2018) encontraron que la arquitectura y el tamaño de las raíces obtenidas durante la conversión son de vital importancia durante la aclimatación de plantas de *Pinus strobus* obtenidas por embriogénesis somática, siendo necesario un mínimo de 2 cm de la raíz antes de transferirlas a condiciones *ex vitro*.

Otra característica primordial durante la conversión es la cutícula de las hojas, en este sentido Zobayed *et al.* (2000) encontraron que al reducir la humedad relativa durante la conversión se puede aumentar la deposición de cera epicuticular sobre la superficie de la hoja, evitando la pérdida de agua durante la aclimatación y aumentando la probabilidad de supervivencia y su crecimiento.

La etapa de aclimatación es muy importante en café, ya que de ella depende la aceptación de plantas vigorosas y morfológicamente uniformes por parte de los productores, por ello la homogeneidad y desarrollo de las plantas obtenidas es de gran relevancia Menéndez-Yuffá *et al.* (2010).

Pese a que la embriogénesis somática es la técnica más prometedora para la propagación vegetativa de materiales élite de café, la fase de aclimatación resulta una parte clave en la producción de plantas de alta calidad (de Rezende *et al.* 2016). En la actualidad existen pocos trabajos que hablen sobre los procesos fisiológicos y moleculares que ocurren durante la aclimatación, pues la mayoría de las investigaciones se han centrado en el aumento de la inducción de la embriogénesis, pero carecen de esfuerzos en la investigación durante la aclimatación de plantas (Yang *et al.*, 2012).

Un buen sustrato utilizado durante la aclimatación debe cumplir con una excelente composición, baja densidad, alta porosidad, alta capacidad de intercambio de cationes y buena retención de agua,

debe estar libre de patógenos o semillas, y debe ser abundante, operativa y económicamente viable (de Rezende *et al.*, 2016). Materiales como perlita y turba, han demostrado que sus propiedades exhiben efectos directos e indirectos en la fisiología de las plantas (Cantliffe *et al.*, 2001; Jafarnia *et al.*, 2010). La composición del sustrato a utilizar es de vital importancia debido a que en las plantas obtenidas por embriogénesis somática como en las obtenidas por métodos convencionales, el crecimiento y la arquitectura de las raíces dependen, de la composición del sustrato y, en particular, de la disponibilidad de agua y nutrientes minerales (Llebrés *et al.* 2018).

Para la producción de plantas de café se han utilizado materiales como vermiculita, aserrín, bagazo, corteza de pino, humus de lombriz y turba (Dias y Melo, 2009; de Rezende *et al.*, 2016).

### **2.12 Fisiología de las plantas durante el crecimiento *ex vitro***

Si bien durante la fase de aclimatación son muy importantes las características anatómicas y morfológicas de las plantas, además de reconocer las diferencias entre un entorno *in vitro* y un entorno de invernadero, lograr comprender los mecanismos fisiológicos involucrados durante la aclimatación y crecimiento de las plantas ayuda a que estas fases se logren de manera exitosa (Kumar y Rao, 2012; Sama *et al.*, 2015; Moreira *et al.*, 2006).

La fotosíntesis es un proceso biológico mediante el cual los órganos fotosintéticos utilizan la energía radiante para sintetizar carbohidratos a partir de dióxido de carbono y agua, y liberar oxígeno (Taiz y Zeiger, 2010). De acuerdo con Parry *et al.* (2010), la fotosíntesis total de un cultivo depende de los siguientes factores:

- La habilidad de interceptar y capturar la energía radiante.
- Duración de la captura de radiación.
- Capacidad, eficiencia y tamaño del aparato fotosintético del dosel.

El área foliar es una variable importante en estudios fisiológicos y está relacionada con el crecimiento de plantas, la intercepción de la luz, la eficiencia fotosintética, la evapotranspiración y las respuestas a los tratamientos de nutrición (Blanco y Folegatti, 2005; Ali y Anjum, 2004).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 OBTENCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

##### 3.1.1 Ubicación

La presente investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Biotecnología y Patología de Semillas ubicado en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados

##### 3.1.2 Material vegetal

Se utilizaron plantas de café de la variedad Colombia obtenidas de semilla y crecidas en un invernadero del Colegio de Postgraduados del Campus Montecillo. De estas plantas se obtuvieron el primer y segundo par de hojas jóvenes libres de plagas y enfermedades y con ausencia de malformaciones físicas visibles.

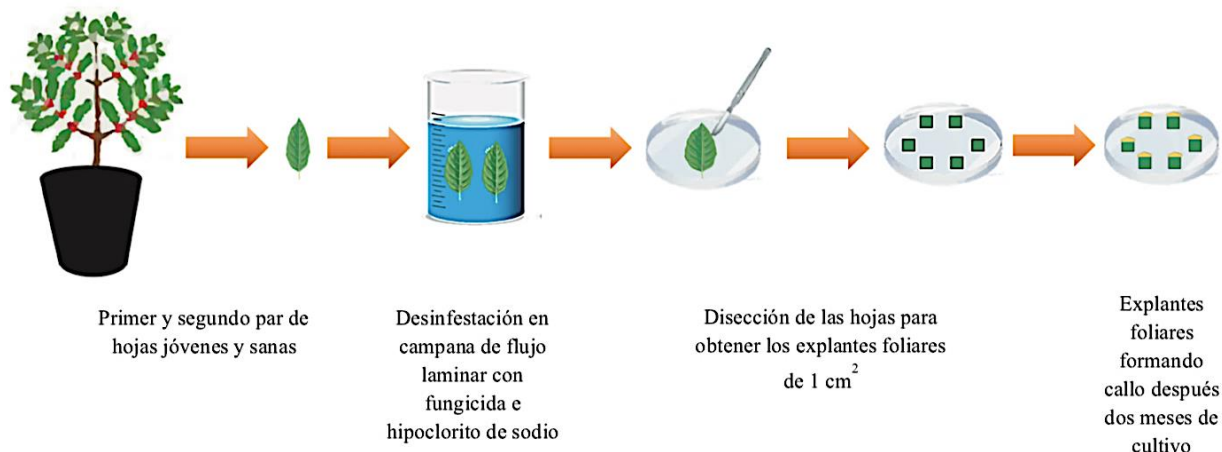
##### 3.1.3 Desinfestación del material vegetal

En condiciones asépticas, los dos primeros pares de hojas jóvenes se colocaron en una solución fungicida con 1 g L<sup>-1</sup> de Promyl® (Benomilo, 50 %), durante 15 minutos y luego en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) con 1.2% de cloro activo durante 20 minutos, enseguida las hojas se enjuagaron tres veces con agua destilada esterilizada.

##### 3.1.4 Medio de cultivo y siembra

Segmentos de 1 cm<sup>2</sup> (explantes) obtenidos de las hojas previamente desinfestadas se colocaron durante 10 días en cajas Petri con un medio de cultivo que contenía las sales basales de Murashige y Skoog (1962) (MS) más 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP), 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 109 mg L<sup>-1</sup> de sorbitol y 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel. El pH del medio fue ajustado a 5.7 y esterilizado a 121 °C durante 15 minutos, para luego vaciarlo en cajas Petri de plástico estériles de

100 x 15 mm (30 mL del medio en cada caja). Cada explante fue colocado con el lado adaxial en contacto con el medio de cultivo. Después de 10 días los explantes fueron colocados en el medio anterior sin sorbitol (medio de inducción) en el que permanecieron durante dos meses. Las cajas fueron incubadas en oscuridad en una cámara de ambiente controlado a  $25 \pm 2$  °C.



**Figura 3.** Inducción de callo en hojas de café var. Colombia.

### 3.1.5 Variables respuesta

Después de 8 semanas se evaluó el porcentaje de explantes que formaron callo y la cantidad de callo (porcentaje del explante cubierto con callo) producido por explante. Los callos se sometieron a una fase de multiplicación, para lo cual fueron separados del explante y cultivados durante 10 meses en matraces de 250 mL con 100 mL de medio de inducción líquido.

## 3.2 DIFERENCIACIÓN (FORMACIÓN) DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

### 3.2.1 Efecto del BAP, AIA y TDZ en la diferenciación

Cuatrocientos miligramos de callo obtenido en la fase de multiplicación se transfirieron a un medio de diferenciación que consistió de las sales y vitaminas de Yasuda *et al.* (1985) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. El medio se suplementó con distintas combinaciones de reguladores de crecimiento: 1) 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP con 0.25, 0.5 ó 0.7 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA); 2) 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP más 2.0 mg L<sup>-1</sup> de ácido abscísico (ABA); 3) 1 mg L<sup>-1</sup> de thidiazuron (TDZ) (1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)urea) con 0.0 ó 0.55 mg L<sup>-1</sup> de AIA; 4) 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP (testigo). El pH de todos los medios fue ajustado a 6.3 y gelificados con 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytagel, realizando subcultivos a los mismos medios cada dos meses durante seis meses. Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento en oscuridad a 25 ± 2 ° C.



**Figura 4.** Diferenciación de embriones somáticos de café var. Colombia.

### 3.2.2 Variables respuesta

Después de tres meses de cultivo en los medios de diferenciación se evaluó el número embriones por gramo de callo y el número de embriones en estado globular, corazón y torpedo.



### 3.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar con siete tratamientos (medios de cultivo) y 10 repeticiones por tratamiento, siendo una repetición una caja Petri con 400 mg de callo. El análisis de los datos se hizo mediante el paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, 1997) y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 1.** Tratamientos utilizados para probar el efecto de BAP, AIA y TDZ en la diferenciación de embriones somáticos de café var. Colombia.

Tratamiento	Composición
1	1.12 mg BAP + 0.25 mg AIA
2	1.12 mg BAP + 0.5 AIA
3	1.12 mg BAP + 0.7 mg AIA
4	1.12 mg BAP + 2.0 mg ABA
5	1 mg TDZ
6	1 mg TDZ + 0.55 mg AIA
7 (testigo)	1.12 mg BAP

BAP: 6-bencilaminopurina; AIA: ácido indolacético; ABA: ácido abscísico; TDZ: thidiazuron.

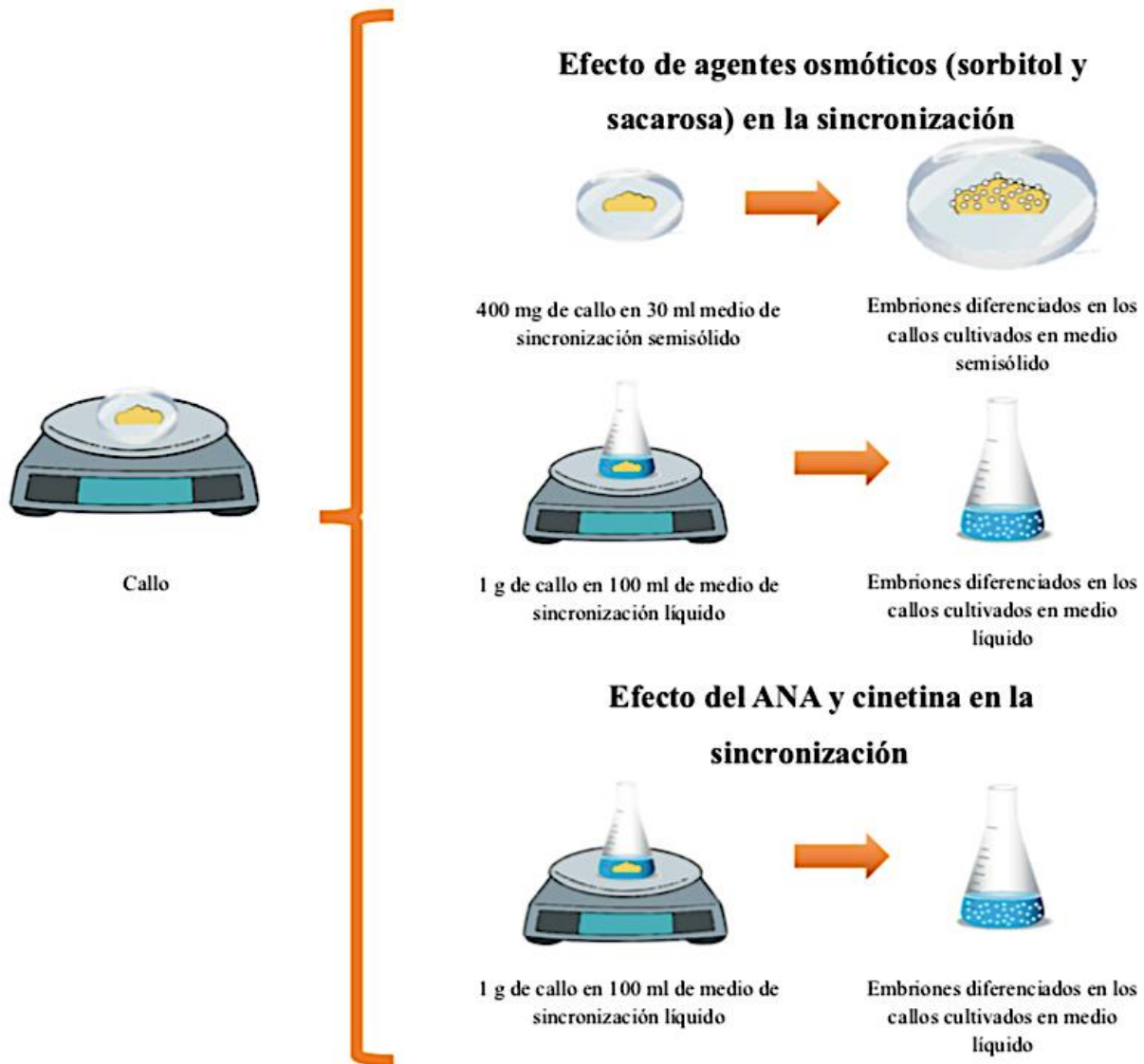
### **3.3 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA FORMACIÓN SINCRÓNICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Coffea arabica* L. var. Colombia**

#### **3.3.1 Efecto de agentes osmóticos en la sincronización**

Cien miligramos de callo obtenido en la fase de multiplicación fueron colocados en el medio de sincronización que contenía las sales y vitaminas de Yasuda *et al.* (1985) (Yasuda), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP, sorbitol, 0.0 (testigo) ó 73.86 g L<sup>-1</sup> (0.41 M) o 0.6 mg L<sup>-1</sup> de AIA con 30 g L<sup>-1</sup> (testigo) u 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (0.08 ó 0.23 M, respectivamente), y 0.0 ó 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel (medio líquido o medio sólido respectivamente). El pH de todos los medios fue ajustado a 6.3. El medio de cultivo fue vertido en cajas Petri de 60 X 15 mm (medio sólido) o matraces de 250 mL (medio líquido), a los cuales se les añadieron 15 o 100 mL, respectivamente. Los matraces fueron colocados en un agitador orbital a 90 revoluciones por minuto (rpm). Todos los cultivos se incubaron en oscuridad en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C. Después de 5, 10 o 15 días los callos cultivados tanto en los medios sólidos como líquidos fueron transferidos a un medio con 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP o 0.6 mg L<sup>-1</sup> de AIA (según su procedencia), con sólo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa durante 10 meses, en las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente.

#### **3.3.2 Efecto del ANA y cinetina en la sincronización**

Un gramo de callo se colocó en matraces de 250 mL con 100 mL del medio de sincronización líquido propuesto por Márquez-López *et al.* (2018); dicho medio consistió de las sales MS y fue suplementado con 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, 0.5 mg L<sup>-1</sup> de cinetina, 30 g de sacarosa, ajustando el pH a 5.7; los matraces fueron colocados en un agitador orbital a 90 rpm. Los cultivos fueron incubados durante 14 días en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C, y un fotoperiodo de 16 h con una intensidad lumínica de 80 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Luego de este tiempo los callos fueron transferidos a un medio Yasuda líquido con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa más 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP, en el que permanecieron por tres meses. El tratamiento testigo consistió de un medio líquido MS con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP, el cual fue cultivado en oscuridad.



**Figura 5.** Sincronización del desarrollo de embriones somáticos de café var. Colombia.

### 3.3.3 Variables respuesta

Después de seis meses de cultivo se evaluó el número de embriones por gramo de callo y el número de embriones en estado globular, corazón y torpedo.

### 3.3.4 Diseño experimental y análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los agentes osmóticos en la sincronización se utilizó un diseño completamente al azar de tipo factorial 8 x 2 en donde los factores fueron: 1) combinación de

reguladores-osmótico-tiempo de exposición y 2) estado físico del medio, dando lugar a 16 tratamientos. Cada tratamiento constó de 4 repeticiones y una repetición consistió de un matraz o caja Petri con callo. Para medir el efecto del ANA, cinetina y sorbitol en la sincronización se empleó un diseño completamente al azar con 2 tratamientos (medios de cultivo), con 10 repeticiones, siendo una repetición un matraz con 1 g de callo. El análisis de los datos se hizo mediante el paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, 1997) y la comparación de medias con la prueba de LSmeans ( $p < 0.05$ ).

**Cuadro 2.** Tratamientos utilizados para probar el efecto de agentes osmóticos en la sincronización de los embriones somáticos de café var. Colombia.

Factor 1	Factor 2
<b>Combinación de regulador del crecimiento-agente osmótico-tiempo de exposición</b>	<b>Estado físico del medio</b>
1.12 mg L <sup>-1</sup> BAP + 30 g L <sup>-1</sup> de sacarosa + sorbitol 73.8 g L <sup>-1</sup> (5,10,15 días) (después transferidos al medio basal por 10 meses)	Líquido y sólido
1.12 mg L <sup>-1</sup> BAP + 30 g L <sup>-1</sup> de sacarosa sin sorbitol (10 meses-testigo)	Líquido y sólido
0.6 mg L <sup>-1</sup> de AIA + sacarosa 80 g L <sup>-1</sup> (5,10,15 días) (después transferidos al medio basal por 10 meses)	Líquido y sólido
0.6 mg L <sup>-1</sup> de AIA + sacarosa 30 g L <sup>-1</sup> (10 meses-testigo)	Líquido y sólido

BAP: 6-bencilaminopurina; AIA: ácido indolacético; 5, 10, 15 días de cultivo.

**Cuadro 3.** Tratamientos utilizados para probar el efecto de ANA, cinetina y sorbitol en la sincronización de los embriones somáticos de café var. Colombia.

<b>Tratamiento</b>	
<b>1</b>	0.1 mg L <sup>-1</sup> de ANA, 0.5 mg L <sup>-1</sup> de cinetina (14 días luz + 3 meses de oscuridad)
<b>2 (Testigo)</b>	30 g L <sup>-1</sup> de sacarosa y 1.12 mg L <sup>-1</sup> de BAP (3 meses de oscuridad).

ANA: ácido 1-naftalenacético; Cinetina: 6-furfurilaminopurina; BAP: 6-bencilaminopurina.

### **3.4 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES GLOBULARES Y TORPEDO TEMPRANO DE *Coffea arabica* L. var. Colombia**

Para estos experimentos se ocuparon embriones somáticos obtenidos en experimentos previos (datos no mostrados), para lo cual segmentos de hoja de 1 cm<sup>2</sup> (explantos) se colocaron por dos meses en cajas Petri con 15 ml de un medio de cultivo que contenía las sales de MS más 0.5 mg L<sup>-1</sup> de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de 6-bencilaminopurina (BAP), 100 mg L<sup>-1</sup> de ácido cítrico, 200 mg L<sup>-1</sup> de ácido ascórbico, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, y 5.2 g L<sup>-1</sup> de phytigel. Transcurrido este tiempo los callos se subcultivaron en un medio Yasuda con 1.12 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Los medios se ajustaron a un pH de 5.7 y 6.3 respectivamente y se esterilizaron durante 15 min en una autoclave a 121 °C. Luego de tres meses en el medio Yasuda embriones en etapa globular y torpedo temprano fueron colectados para llevar a cabo los experimentos de maduración.

#### **3.4.1 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones globulares**

Treinta embriones en estado globular se cultivaron durante 40 días en cajas Petri de 60 X 15 mm que contenían 15 mL de medio de maduración (MM) formulado con las sales de Yasuda más 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel. Dicho medio fue suplementado con distintas concentraciones de ácido abscísico (2, 3 y 4 mg L<sup>-1</sup>), 1.38 g L<sup>-1</sup> de ácido salicílico (ASA), polietilenglicol (PEG) 8000 (50 y 75 g L<sup>-1</sup>) y sacarosa (30 g L<sup>-1</sup> (testigo), 50, 60 y 80 g L<sup>-1</sup>).

Para evaluar la maduración a partir de embriones en etapa torpedo temprano se realizaron dos experimentos:

#### **3.4.2 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones torpedo temprano (primer experimento)**

En un primer experimento se cultivaron 20 embriones torpedo (temprano) durante 40 días en cajas Petri de 60 X 15 mm que contenían 15 ml de medio de maduración (MM) formulado con las sales de Yasuda más 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel. Dicho medio fue suplementado con distintas concentraciones de ácido abscísico (2, 3 y 4 mg L<sup>-1</sup>),

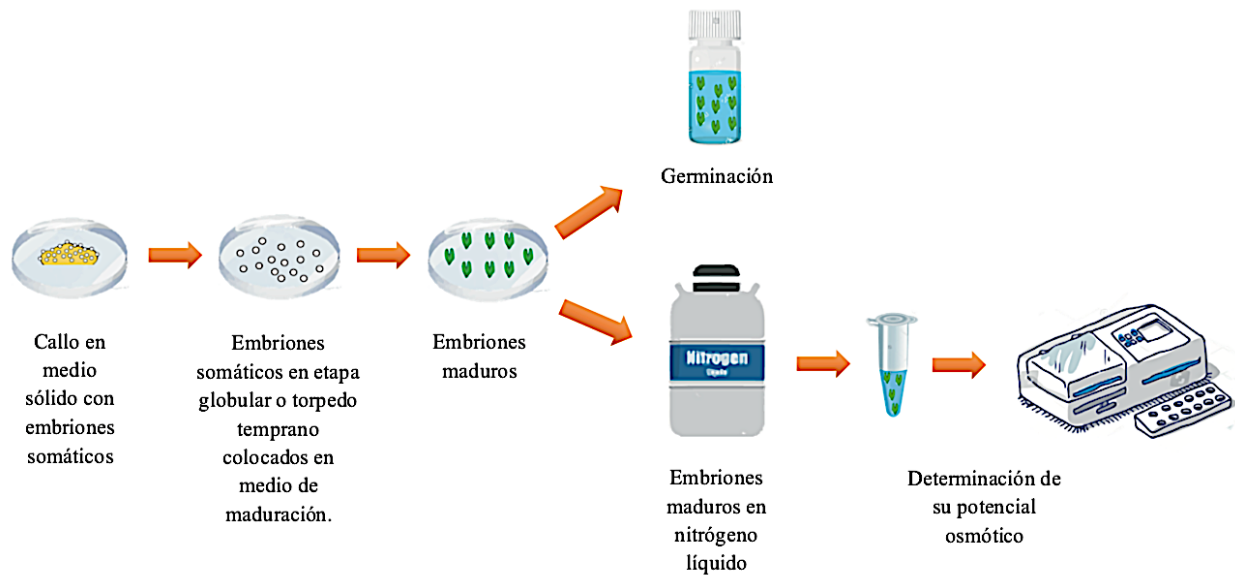
1.38 g L<sup>-1</sup> de ácido salicílico (ASA), polientilenglicol (PEG) 8000 (50 y 75 g L<sup>-1</sup>) y sacarosa (30 g L<sup>-1</sup> (testigo) y 80 g L<sup>-1</sup>).

### **3.4.3 Efecto de reguladores de crecimiento (AIA y AG<sub>3</sub>) en la maduración de embriones torpedo temprano (segundo experimento)**

En un segundo experimento, 10 embriones torpedo (temprano) fueron colocados en dos medios de cultivo que contenían las sales de Yasuda más 2.3 g L<sup>-1</sup> de phytigel, 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa y dos combinaciones de reguladores de crecimiento: 1) 0.7 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y 0.3 mg L<sup>-1</sup> de AIA, y 2) 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA. Ambos medios fueron comparados con un testigo suplementado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; el pH de todos los medios fue ajustado a 6.3. Los cultivos fueron incubados en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C y 16 h de luz con una intensidad lumínica de 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

### **3.4.4 Variables respuesta**

Se evaluó el número de embriones en diferentes etapas, número de embriones maduros considerándose como maduros a aquellos embriones en etapa torpedo tardía y/o cotiledonares, además se midió el potencial osmótico de los mismos, para lo cual se depositaron embriones maduros (4 repeticiones) en tubos de microcentrífuga de 1 mL, los cuales se colocaron en nitrógeno líquido. Posteriormente con una micropipeta se tomó el contenido líquido resultante del rompimiento de las paredes celulares de los embriones congelados y fue colocado en un Osmómetro Vapro (Wescor Vapor Pressure Osmometer 5520).



**Figura 6.** Maduración de embriones somáticos globulares y torpedo temprano de café var. Colombia.

### 3.4.5 Diseño experimental y análisis estadístico

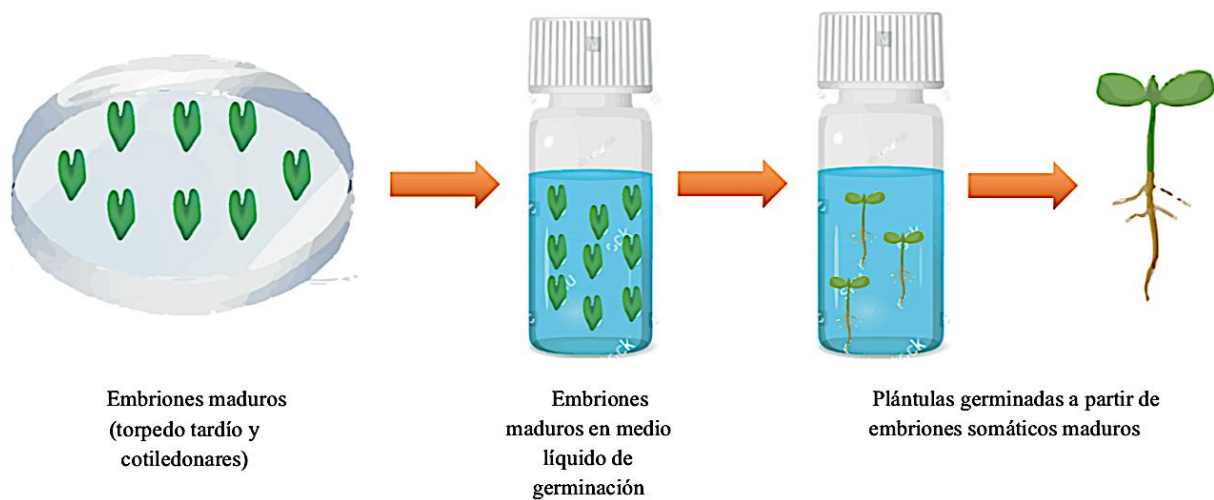
Para evaluar la maduración de ambos tipos de embriones (globulares y torpedo temprano) se utilizó un diseño experimental completamente al azar en regresión logística; en el caso de los embriones globulares se tuvieron 10 tratamientos (medios de cultivo) con 10 repeticiones, considerando como una repetición una caja Petri con 30 embriones. Para la maduración de los embriones torpedo del primer experimento y segundo experimento se probaron 8 y 2 tratamientos (medios de cultivo), respectivamente. En el primer experimento hubo 10 repeticiones por tratamiento, siendo una repetición una caja Petri con 20 embriones; en tanto que el segundo experimento constó de 6 repeticiones (una caja Petri con 10 embriones). El análisis de los datos se hizo mediante el paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, 1997) y la comparación de medias mediante la prueba de LSmeans ( $p < 0.05$ ).



### 3.5 GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS MADUROS DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

#### 3.5.1 Medio de cultivo

Los embriones que lograron alcanzar la etapa torpedo tardío o cotiledonar en cada uno de los medios de maduración, fueron cultivados en viales de cristal con 7 mL de medio de germinación líquido elaborado a base de las sales de Yasuda suplementado con 0.25 mg L<sup>-1</sup> de AIA, 0.25 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa ajustando el pH a 6.3. Durante esta fase los cultivos permanecieron en un agitador orbital a 100 rpm dentro de una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C con 16 h de luz y una intensidad lumínica de 80 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.



**Figura 7.** Germinación de embriones somáticos maduros (torpedo tardío y cotiledonar) de café var. Colombia.

#### 3.5.2 Variables respuesta

La germinación de los embriones somáticos (embriones con protrusión de la radícula) fue evaluada después de 60 días de cultivo en el medio de germinación.

### **3.5.3 Diseño experimental y análisis estadístico**

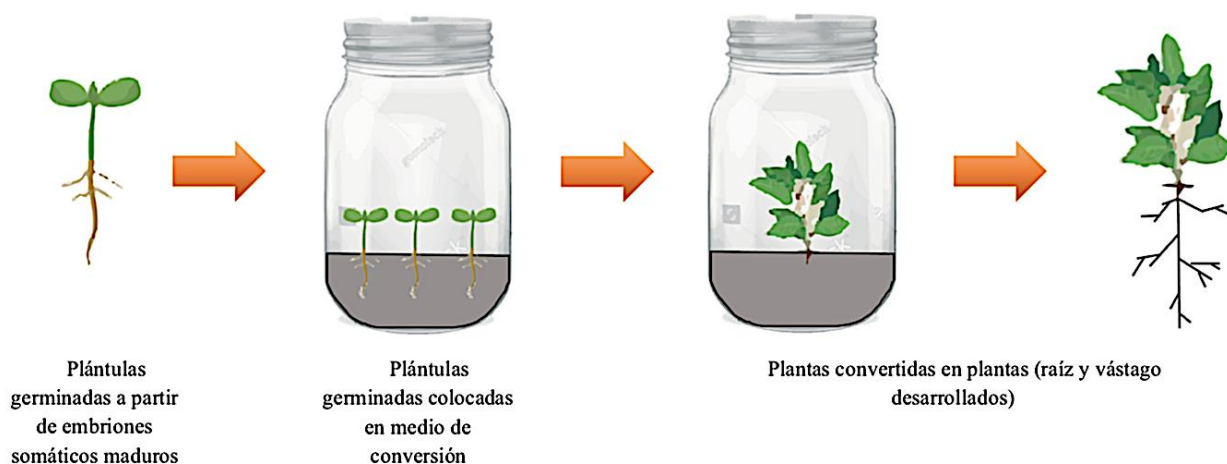
Para los embriones madurados desde el estado globular se empleó un diseño experimental completamente al azar en regresión logística desbalanceado con 9 tratamientos (excepto embriones del tratamiento con ASA por no contar con embriones maduros). Para los embriones madurados a partir de la etapa torpedo, hubo dos tratamientos tanto para el primero como el segundo experimento (sólo medios de maduración con suficiente número de embriones maduros). Todos los experimentos tuvieron diferente número de repeticiones por tratamiento, siendo una repetición un vial con diferente número de embriones maduros (pseudorepeticiones). El análisis de los datos se hizo mediante el paquete estadístico SAS versión 9.5 (SAS Institute, 1997) y la comparación de medias mediante la prueba de LSmeans ( $p < 0.05$ ).

### 3.6 CONVERSIÓN *in vitro* DE EMBRIONES EN PLANTAS

En esta fase de la investigación solo se tomaron en cuenta aquellos embriones que lograron germinar, es decir, en los que se observaba la protrusión de la radícula y expansión de los cotiledones dando origen a una plántula.

#### 3.6.1 Sustrato y medio de cultivo

Los embriones germinados se colocaron en frascos tipo Gerber que contenía 30 mL de una mezcla de vermiculita y perlita (3:1) con tamaño de partícula de 0.25 mm previamente esterilizada durante 40 minutos a 121 °C. A la mezcla se le agregaron 15 mL de un medio MS líquido al 50 % con 20 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; los frascos conteniendo el sustrato y el medio de cultivo fueron esterilizados durante 20 minutos.



**Figura 8.** Conversión *in vitro* de embriones germinados a plantas en café var. Colombia.

#### 3.6.2 Variables respuesta

Las variables a evaluar en esta fase fueron el número de embriones germinados (plántulas) que dieron origen a una planta normal, es decir, el número de plantas con raíz y vástago.

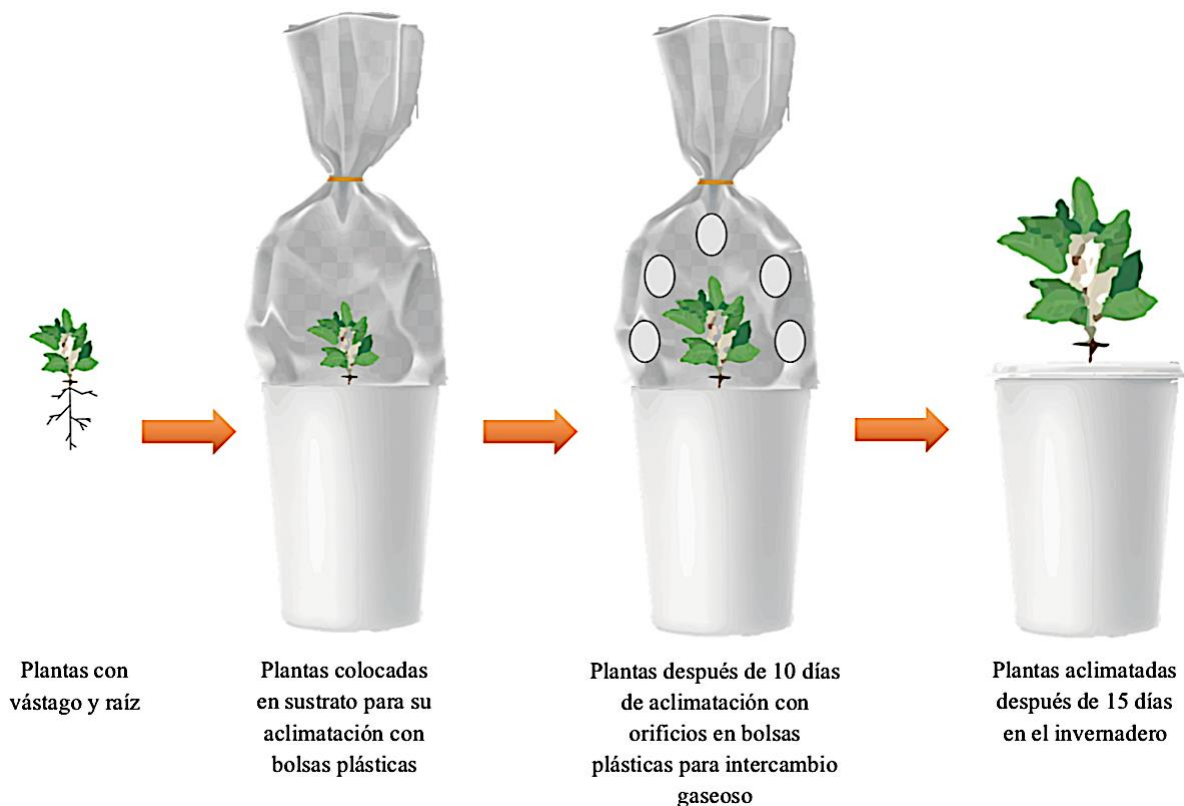
### **3.6.3 Diseño experimental y análisis estadístico**

Cuando se partió de embriones globulares se utilizó un diseño experimental completamente al azar desbalanceado en regresión logística con 4 tratamientos (medios de maduración de procedencia); para los experimentos 1 y 2 en los que se partió de embriones torpedo hubo dos tratamientos. En cada uno de los experimentos el número de repeticiones por tratamiento fue diferente; una repetición consistió de un frasco con tres embriones germinados. El análisis de los datos se hizo mediante el paquete estadístico SAS versión 9.5 (SAS Institute, 1997) y la comparación de medias mediante la prueba de LSmeans ( $p < 0.05$ ).

### 3.7 ACLIMATACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLANTAS DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

#### 3.7.1 Sustratos de aclimatación

Una vez que las plantas obtenidas en la fase de conversión alcanzaron 2 cm y presentaban al menos 5 pares de hojas fueron transferidas a vasos de unicel de 250 mL con dos mezclas de sustratos: perlita-turba (Peat Moss PRO-MIX FLX)-tezontle (1:1:1) y turba-tezontle (2:1); el sustrato fue humedecido hasta capacidad de contenedor con solución Steiner (1966) al 25 %. Los vasos se cubrieron con bolsas de plástico y cada 3 días se les hicieron perforaciones, de modo que después de 15 días éstas fueron retiradas. Las plantas fueron llevadas a un invernadero ubicado en el Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados.



**Figura 9.** Aclimatación de plantas de café var. Colombia en condiciones de invernadero.

#### 3.7.2 Variables respuesta

Las variables evaluadas durante esta fase de la investigación fueron morfológicas y fisiológicas:

**Variables morfológicas:** Se midió la supervivencia, longitud de la parte aérea (tamaño de plúmula) y número de las hojas de las plantas a los 30, 60 y 90 dds (días después de siembra).

**Variables fisiológicas:** Después de 110 en invernadero, se midió el intercambio gaseoso durante la fotosíntesis y la respiración y el área foliar de las plantas con las siguientes metodologías:

- a) *Intercambio gaseoso.* Con ayuda de un analizador de gases en infrarrojo IRGA (LICOR-6400 XT Portable Photosynthesis System), se midió la tasa instantánea de fotosíntesis (A), la conductancia estomática (gs), la transpiración (E) y la concentración interna de CO<sub>2</sub> (Ci).
  
- b) *Area foliar.* Esta variable se midió de acuerdo el modelo alométrico no destructivo para la estimación del área foliar propuesto por Antunes *et al.* (2008), cuya ecuación es:

$$LA = 0.6626 (L*W)^{1.0116}$$

En donde:

LA= Área foliar

0.6626 y <sup>1.0116</sup> son parámetros establecidos,

L es el largo de la hoja y

W es el ancho de la hoja.

### 3.7.3 Diseño experimental y análisis estadístico

Para esta etapa se usó un diseño completamente al azar con dos tratamientos (sustratos) y 4 repeticiones, considerando 1 repetición a una planta. El análisis de los datos se hizo mediante una prueba de T-student para observar las diferencias entre los tratamientos.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 INDUCCIÓN DE CALLOS A PARTIR DE EXPLANTES FOLIARES DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

Los resultados del presente experimento mostraron que el medio de inducción de callo utilizado promovió la formación de callo no friable, acuoso y esponjoso en 66 % de los explantes foliares de café, dicho callo se observó principalmente en los bordes del explante y la cantidad de callo generado por explante fue en promedio de 317.23 mg. Cabe mencionar que tanto los explantes que produjeron callo como los que no lo hicieron se oxidaron (100 %) (Figura 10). Zamarripa (1993) señala que la oxidación polifenólica juega un papel importante en la inducción de callo ya que los niveles bajos de oxidación de los explantes son favorables para la formación de callos.

Durante el cultivo *in vitro* de tejidos, por lo general las células de los explantes cercanas a la herida responden a las condiciones de cultivo, promoviendo la división celular activa dando como resultado una masa de células no organizada denominada callo.

Se ha documentado que para que exista la transición de una célula somática a una célula embriogénica debe haber un aumento en el nivel de ácido indolacético (AIA) endógeno desde los primeros días de cultivo, pues los explantes con niveles endógenos más altos de esta auxina son más sensibles al proceso de inducción de la embriogénesis (Gaj, 2004; Jimenez, 2005). Algunos autores mencionan que un incremento en la concentración de AIA endógeno puede lograrse al retirar o disminuir el 2,4-D de los medios durante la última fase de la formación del callo (Márquez-López *et al.*, 2018, Su *et al.*, 2009).

Para la obtención de un callo con características embriogénicas en café Berthouly y Michaux-Ferriere (1996) utilizaron una relación auxina-citocinina 1:2. Otros autores reportan concentraciones que van de 0.6 a 2.2 mg L<sup>-1</sup> de auxina y de 1.0 hasta 4 mg L<sup>-1</sup> mg de citocinina para inducir callos embriogénicos; sin embargo en estos protocolos después de uno o dos meses los explantes o callos primarios obtenidos son transferidos a un medio de formación de callo embriogénico con una relación auxina-citocinina de 1:3 ó 1:4 con concentraciones entre 0.1 a 1 mg L<sup>-1</sup> de auxina y de 0.5 a 4 mg L<sup>-1</sup> de citocinina (Samson *et al.*, 2006; Ribas *et al.*, 2011; Ayil-Gutiérrez *et al.*, 2013; Montes-Cruz *et al.*, 2017; Bartos *et al.*, 2018a).



**Figura 10.** Callo formado en los explantes foliares de *C. arabica* var. Colombia después de 8 semanas de cultivo.



## 4.2 DIFERENCIACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Coffea arabica* L. var.

### Colombia

No fue posible observar la diferenciación de embriones somáticos en ninguno de las combinaciones de reguladores de crecimiento probadas.

La morfogénesis *in vitro* es una respuesta a diversos factores internos y externos. Los embriones somáticos se forman a partir de células embriogénicas (masas proembriogénicas) competentes, las cuales son sensibles a los factores de inducción. Dentro de los factores que afectan el potencial embriogénico de las células está el nivel hormonal endógeno especialmente la relación entre auxinas y citocininas, las cuales interactúan entre sí y con una variedad de señales metabólicas y de desarrollo (Campos *et al.*, 2017, Gaj, 2004, Radice *et al.*, 2010).

Se ha dicho que las células no responden a un estímulo proporcionado debido a que el potencial embriogénico está ligado a las características celulares del mismo (Pádua *et al.*, 2014, Silva *et al.*, 2014). Por otra parte, solo algunas células conservan la capacidad para convertirse en embriones, por ello se propone que el estímulo hormonal solo “despierta” la expresión génica en las células receptivas que mantienen la capacidad embriogénica, es decir, funcionan como células madre, así las células que no tienen estas características nunca se convertirán en embriones aunque se les proporcione el estímulo correcto (Campos *et al.*, 2017).

Con base en lo anterior, es posible que los callos generados no formaran embriones en ninguno de los tratamientos de diferenciación utilizados debido a que la cantidad de células con potencial embriogénico presente en los mismos, era baja. Otra posible causa de la nula respuesta es que las condiciones de cultivo, especialmente la concentración de reguladores de crecimiento en los medios de diferenciación, no permitieron que las células con potencial embriogénico alcanzaran el balance hormonal endógeno necesario para generar un embrión. Se sabe que durante la formación de las masas proembriogénicas hay gran acumulación de AIA en el citoplasma y núcleo de dichas células (Márquez-López *et al.*, 2018). Como resultado del tratamiento auxínico es promovido un cambio en la morfología celular como el aumento de la densidad del citoplasma y el tamaño del núcleo, dando lugar a divisiones celulares, las cuales forman pequeños grupos de células que comienzan a desarrollarse en estructuras embrionarias. Se ha propuesto que el principal inductor de la respuesta embriogénica en las células puede ser una auxina exógena como el 2,4-D o el ANA que desencadenan la síntesis y/o acumulación de AIA (Fehér, 2015).

La falla en la diferenciación de embriones somáticos puede deberse a diversos factores ya que la capacidad embriogénica es un proceso multifactorial resultado de la interacción entre la concentración de las sales del medio, vitaminas, fuente de carbono, tipo de medio de cultivo, edad de los cultivos celulares, condiciones ambientales como la luz, la temperatura y el pH, así como la densidad y homogeneidad celular de los agregados embriogénicos en el caso de los cultivos en suspensión (Méndez-Hernández *et al.*, 2019; Rose 2004; Deo *et al.*, 2010; Nic-Can *et al.*, 2015; Fehér, 2019; Loyola-Vargas y Ochoa-Alejo, 2016). Las condiciones de estrés como el pH extremo, la exposición al choque térmico o el tratamiento con diversas sustancias químicas como osmóticos representan una de las mayores condiciones involucradas en la inducción de la embriogénesis somática (Méndez-Hernández *et al.*, 2019).

Uno de los factores que ha limitado la capacidad morfogénica de los cultivos celulares en distintas especies es la edad de los mismos; en general conforme la edad aumenta la proporción de células con capacidad embriogénica disminuye (Deo *et al.*, 2010, Kim *et al.*, 2010). En *C. arabica* var. Caturra, Ribas *et al.* (2011) encontraron que la edad del cultivo influyó directamente en la morfología celular y en su potencial embriogénico, el cual disminuyó en los cultivos de más de 10 meses. Dichos cultivos se caracterizaron por presentar células no embriogénicas, así como células aisladas y masas proembriogénicas las cuales no pasaron a una siguiente etapa de desarrollo, además, la capacidad para regenerar embriones somáticos se redujo en los cultivos que no fueron subcultivados continuamente.

Asimismo, otro factor que afecta la capacidad embriogénica es la liberación de moléculas orgánicas como metabolitos secundarios por parte de los tejidos en el medio de cultivo (Pais, 2019). En *C. arabica* se ha observado que la excreción de metabolitos secundarios como el ácido clorogénico, ácido hidroxibenzoico, ácido trans-cinámico y la cafeína, afectan el desarrollo de estructuras embriogénicas inhibiendo la formación de embriones, debido a que afectan la metilación del ADN (Nic-Can *et al.*, 2015).

### **4.3 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA FORMACIÓN SINCRÓNICA DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Coffea arabica* L. var. Colombia**

Aun cuando la embriogénesis somática ofrece un gran potencial para la producción de plantas, el desarrollo de embriones somáticos a partir de callos tiende a ser asincrónico (distintas fases de desarrollo de los embriones en un momento determinado), lo que puede representar un problema. Lograr la sincronización de cultivos facilitaría la producción de plantas mediante embriogénesis somática (Deo *et al.* 2010; Souza *et al.*, 2011; Méndez-Hernández *et al.*, 2019). Generalmente, la combinación de estrés con reguladores de crecimiento como las auxinas y citocininas en el medio de cultivo mejora la sincronía de los cultivos.

Debido a que los callos generados en el medio de inducción no lograron diferenciar embriones somáticos, no fue posible observar el efecto de las distintas combinaciones de reguladores de crecimiento y agentes osmóticos probados en la sincronización del desarrollo de los embriones.

El sorbitol es un azúcar-alcohol de seis carbonos que se considera comúnmente un regulador osmótico y su adición en cultivos celulares y callos puede favorecer las tasas de inducción y regeneración de embriones somáticos (Geng *et al.*, 2008), ya que aumenta la síntesis y acumulación de almidón y sacarosa en las células (Wang *et al.*, 1999). Lo anterior es debido a que en las plantas el sorbitol es translocado y después la sorbitol-deshidrogenasa (SDH), enzima encargada del metabolismo del sorbitol, lo convierte en glucosa, fructosa, sacarosa y almidón (Jia *et al.*, 2015, Traore y Guiltinan, 2006). Se han identificado 92 genes SDH responsables de la síntesis de esta enzima (Jia *et al.*, 2015), de los cuales cuatro se encuentran presentes en *C. arabica* (NCBI, 2018). Lo cual indica que en café el sorbitol a altas concentraciones además de generar un estrés osmótico puede ser metabolizado por sus células.

Por otro lado, de la sacarosa se sabe que su adición en cultivos celulares está involucrada en la ganancia óptima de peso celular, además de que su hidrólisis por parte de la sacarosa-sintasa (SuS) y la invertasa (Inv), genera la acumulación de glucosa, fructuosa y almidón (Jain *et al.*, 1997; Iraqi y Tremblay, 2001; Iraquí *et al.* 2005; Winter y Huber, 2000) y a altas concentración actúa como agente osmótico.

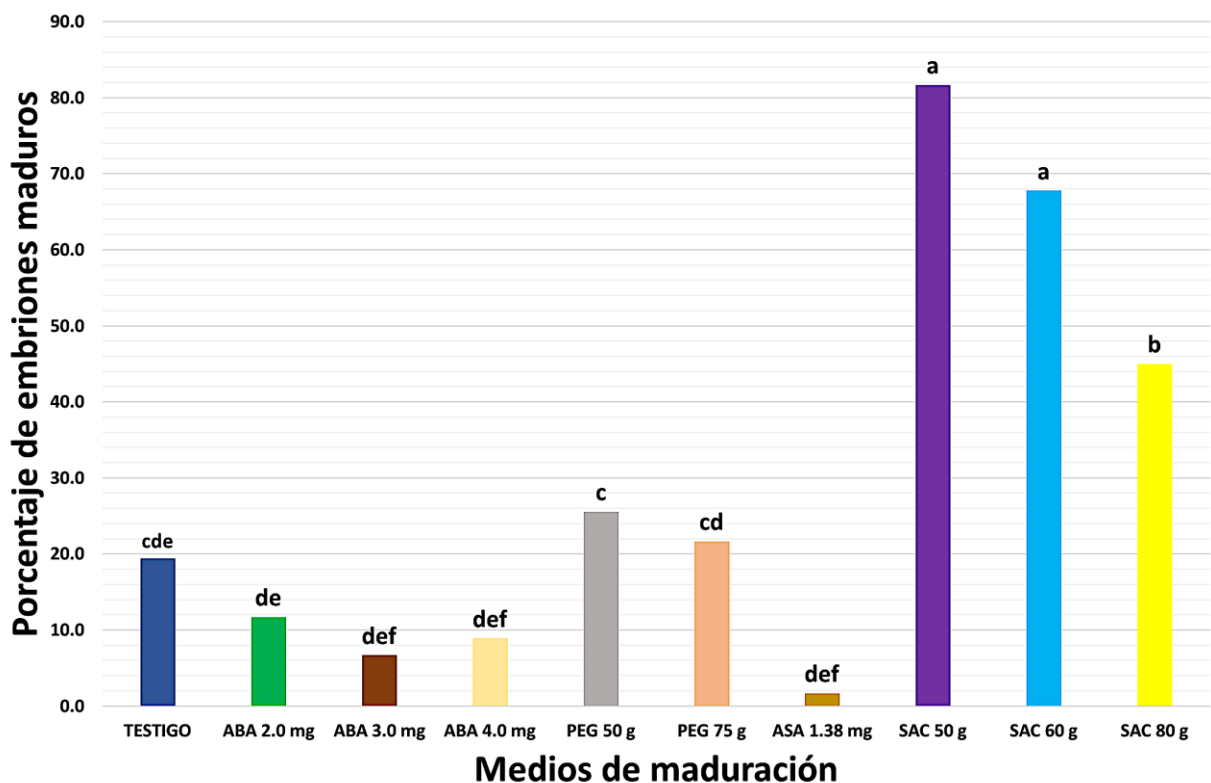
En *Cattleya maxima* se evaluó el efecto del estrés osmótico en la inducción de callos embriogénicos encontrando que una combinación de 72.8 g L<sup>-1</sup> de sorbitol y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D generó un 78.8% de callos embriogénicos que dieron origen a embriones somáticos en etapa globular (Cueva Agila *et al.*, 2015). En *Fraxinus angustifolia*, la adición de 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg L<sup>-1</sup> de bencilaminopurina (BAP) generó la formación sincrónica de embriones somáticos después de 6 semanas de cultivo (Tonon *et al.*, 2001). Colova *et al.* (2015), encontraron que colocar callos de *Muscadinia rotundifolia* en un medio suplementado con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 0.1 mg L<sup>-1</sup> de ANA, permitió la formación sincrónica de embriones somáticos mientras que el 2,4-D inhibió su formación, estos mismos autores mencionan que la sincronización del cultivo puede deberse a un efecto benéfico del cultivo en un medio libre de reguladores de crecimiento.

Aun cuando el estrés osmótico puede ayudar a sincronizar los cultivos se ha demostrado que, si es muy alto y supera la tolerancia de las células, éstas mueren; sin embargo, cuando el nivel es óptimo, aumenta el metabolismo celular y promueve la reprogramación de la expresión génica, la reorganización celular y el cambio del desarrollo (Altamura *et al.*, 2016).

#### 4.4 EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO Y AGENTES OSMÓTICOS EN LA MADURACIÓN DE EMBRIONES GLOBULARES Y TORPEDO TEMPRANO DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

##### 4.4.1 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones globulares

En esta fase se consideró como embriones somáticos maduros a aquellos que alcanzaron la etapa torpedo-tardía y/o cotiledonar. Los resultados mostraron que el porcentaje de embriones globulares que alcanzaron la madurez fue significativamente mayor en aquellos cultivados en los medios que contenían 50 y 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (81.7 y 67.8 % respectivamente), con respecto a los demás tratamientos probados incluyendo el testigo (30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa) (19.4 %) (Figura 11).



**Figura 11.** Porcentaje de embriones globulares que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración. Testigo: medio basal con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; ABA: Ácido abscísico PEG: Polietilenglicol 8000; ASA: Ácido salicílico; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

En algunos estudios la aplicación de concentraciones altas de sacarosa (superiores a 30 g L<sup>-1</sup>) han logrado aumentar la maduración de embriones somáticos de *Picea abies*, *P. mariana*, *P. glauca* y *Sorghum bicolor*, mostrando que durante esta fase las células de los embriones somáticos acumulan proteínas de reserva y carbohidratos como sacarosa, fructuosa, glucosa y almidón (Lipavská *et al.*, 2000; Iraqi y Tremblay, 2001; Rolland *et al.*, 2002; Martínez *et al.*, 2017).

Se sabe que cuando la sacarosa de los medios de cultivo entra en los tejidos de los embriones, se difunde y es hidrolizada por la enzima invertasa-apoplástica (Ap Inv), cuya actividad es estimulada por las altas concentraciones de sacarosa; esta hidrolización genera una gran deposición de hexosas en los tejidos del embrión, además de esto las altas concentraciones de sacarosa liberan de los embriones al medio a una Invertasa-Extracelular-Activa que hidroliza la sacarosa generando la acumulación de glucosa y fructuosa en el medio (Iraqi *et al.*, 2005). Como resultado de la acumulación de glucosa y fructuosa en los medios de cultivo por la hidrolización de la sacarosa, la presión osmótica del mismo aumenta en casi 150 mmol, lo cual induce la expresión de genes como glutamina-sintetasa y glutamato-sintasa involucrados en el metabolismo del nitrógeno y la deposición de proteínas de almacenamiento. Estas proteínas de reserva son similares a las requeridas por las semillas para su maduración y germinación (Iraqi y Tremblay, 2001; Stasolla *et al.*, 2003; Misra *et al.*, 1993; Kubeš *et al.*, 2014; Cangahuala- Inocente *et al.*, 2009; Bartos *et al.*, 2018a; Montalbán *et al.*, 2010).

Etienne *et al.* (2013) mencionan que anatómicamente los embriones somáticos maduros de *C. arabica* son muy similares a los cigóticos, pero que los somáticos acumulan menor cantidad de carbohidratos de reserva. También se sabe que el patrón de acumulación de proteínas de almacenamiento como las globulinas, prolaminas y las glutelinas (Shewry y Halford, 2002), es similar en embriones somáticos y cigóticos de *C. arabica* (Bartos *et al.*, 2018b). Estos mismos autores observaron que durante la maduración de embriones somáticos de *C. arabica*, el contenido de almidón, proteínas totales y sacarosa aumentan gradualmente en los tejidos en especial en los embriones cotiledonares.

Jariteh *et al.* (2015), resaltan la importancia de la acumulación de sustancias de reserva durante la fase de maduración, debido a que en la germinación la cantidad de energía necesaria es muy alta. En los embriones somáticos los aminoácidos de las proteínas funcionan como una forma

importante del transporte de nitrógeno y son una fuente de nutrientes en el desarrollo inicial de la planta (Cangahuala-Inocente *et al.*, 2013).

Kubeš *et al.* (2014) afirma que la adición de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa estimula la mayor maduración en embriones somáticos de *Picea abies*. Winkelmann *et al.* (2006) encontraron que incluir 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa en el medio de maduración de embriones somáticos de *Cyclamen persicum*, aumentó sustancialmente el contenido de proteínas de reserva así como de la superóxido dismutasa (SOD) y proteínas de choque térmico (relacionadas en la activación de la embriogénesis somática). Estos mismos autores encontraron un aumento en la concentración de las enzimas UDP-glucosa pirofosforilasa, fructosa bisfosfato aldolasa, trifosfosfato isomerasa y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa en embriones somáticos de *Cyclamen persicum*, las cuales metabolizan los carbohidratos en la ruta de la glucólisis, proporcionando sustratos requeridos en el ciclo del ácido cítrico y la biosíntesis de aminoácidos y lípidos (Krasavina *et al.*, 2014, Nunes-Nesi *et al.*, 2010). Asimismo, Klimaszewska *et al.* (2004a) observaron que los embriones somáticos de *Pinus strobus* cultivados en un medio de maduración con 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, mostraban niveles de globulinas 11S y de proteínas similares a vicilinas 7S en mayor concentración que en aquellos expuestos a 30 g L<sup>-1</sup>.

Por otro lado el ABA ha sido utilizado para promover la maduración, incrementar la tolerancia a la desecación y prevenir la germinación precoz de embriones somáticos de diversas especies (Rai *et al.*, 2011). No obstante, en la presente investigación ninguno de los tratamientos que incluían ABA superó al testigo con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Estos resultados difieren de lo encontrado por González *et al.* (2000) quienes al evaluar el papel del ABA en la maduración de embriones somáticos de *C. canephora* observaron que 56.1 % de los embriones lograron madurar al exponerlos a 1 mg L<sup>-1</sup> de ABA, mientras que con 2 mg L<sup>-1</sup> el porcentaje de embriones maduros fue menor (50 %). Lo anterior puede ser debido a que las especies utilizadas en ambos trabajos fueron diferentes, y la capacidad de respuesta de los cultivos embriogénicos al ABA depende en gran medida del genotipo (Stasolla *et al.*, 2002).

Asimismo, los altos niveles y largos tiempos de exposición de los embriones a ABA utilizados en este experimento pudieron causar un letargo en los embriones, ya que se ha demostrado que el ABA se encuentra involucrado en la inducción del letargo primario en embriones cigóticos,

manteniéndolos inactivos y sin que el eje embrionario se desarrolle (Kermode, 2005). En embriones somáticos de *Tulipa* ‘Apeldoorn’ el crecimiento disminuyó al ser tratados por 2 y 4 semanas con concentraciones de 2 a 5 mg L<sup>-1</sup> de ABA debido a la inducción de un letargo en los embriones (Maślanka *et al.*, 2016; Maślanka y Bach, 2005).

Al final de esta etapa, los embriones maduros presentaron cotiledones con una coloración verde, esto concuerda con lo encontrado por otros autores, los cuales mencionan que a diferencia de los embriones cigóticos, los embriones somáticos de café presentan una gran plasticidad fenotípica y una alta adaptabilidad a estímulos ambientales como la luz; lo anterior debido a que existe una diferenciación temprana de los cotiledones hacía una estructura de folíolo y lo cual ha sido relacionado con una rápida fotoautotofía, más aún después de su transferencia a condiciones *ex vitro* (Etienne *et al.*, 2013).

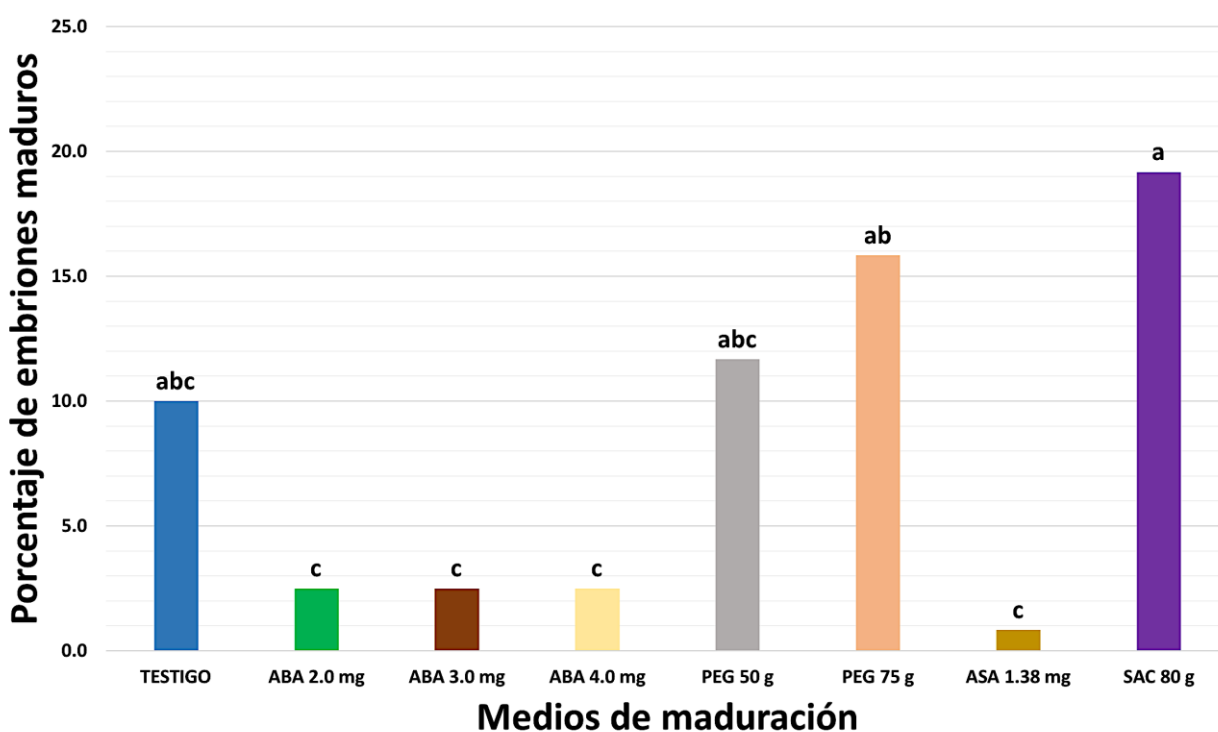
En *Carica papaya*, Mishra *et al.* (2010) afirman que al cultivar embriones somáticos en un medio de maduración con 45 g L<sup>-1</sup> de PEG 3350, 28.3% de logró madurar. Asimismo, Schuabb *et al.* (2013) mencionan que la exposición de los embriones de *C. papaya* PEG 3350 (60 g L<sup>-1</sup>) durante 50 días promovió que 83.3% de éstos maduraran. Por otro lado, Koehler *et al.* (2013) encontraron que la adición de 50 g de L<sup>-1</sup> de PEG 3350 al medio de cultivo mejoró la morfología de los embriones somáticos de *C. papaya*.

A diferencia de otros autores en el presente estudio se presentó un bajo porcentaje de maduración al cultivar embriones somáticos de café en 50 y 75 g L<sup>-1</sup> PEG 8000, lo cual puede ser debido a que las concentraciones empleadas de esta molécula hayan generado un estrés muy alto. Al respecto, Yadollahi *et al.* (2011) mencionan que el PEG es un osmótico que no entra a la célula sino que restringe la absorción de agua y proporciona un estrés hídrico durante el desarrollo del embrión, el cual depende de la concentración empleada. También se ha reportado que niveles altos (superiores a 50 g L<sup>-1</sup>) de PEG de alto peso molecular (como el PEG 8000) limitan la acumulación de sacarosa, almidón y proteínas en embriones somáticos de *Picea abies* (Businge *et al.*, 2013).



#### 4.4.2 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la maduración de embriones torpedo temprano (primer experimento)

La maduración de los embriones torpedo temprano cultivados en los medios que contenían 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 50 y 75 g L<sup>-1</sup> de PEG y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa no fue estadísticamente diferente; sin embargo, el porcentaje de maduración de los embriones del tratamiento con 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa fue significativamente mayor (19.2) que el de los embriones de los tratamientos con ABA y ASA (4-10 %) (Figura 12).



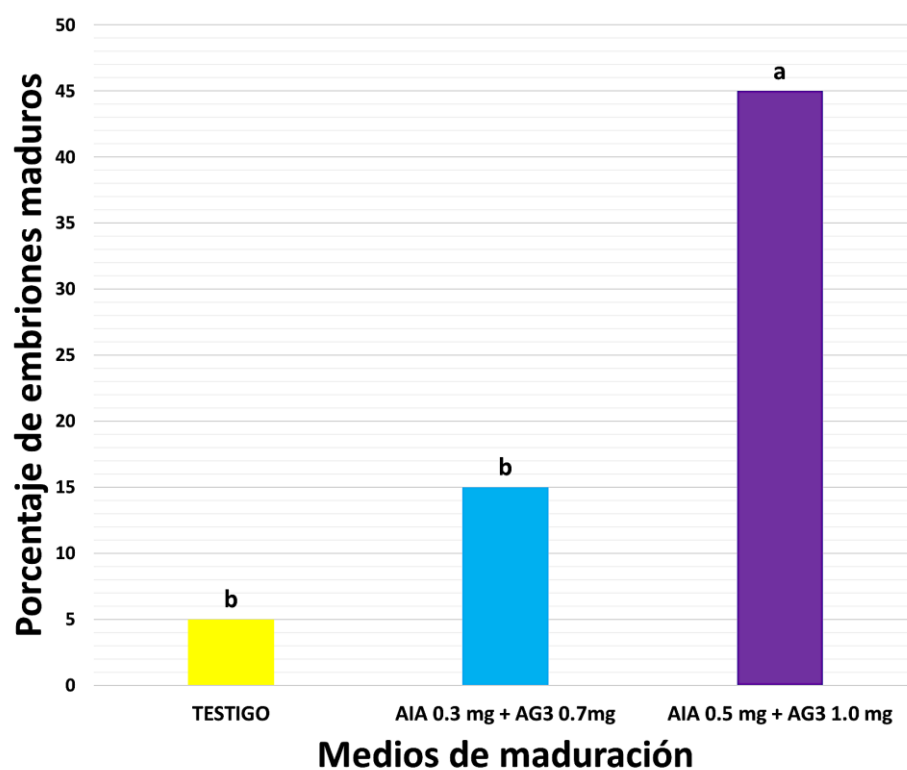
**Figura 12.** Porcentaje de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración (primer experimento). Testigo: medio basal con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; ABA: Ácido abscísico; PEG: Polietilenglicol 8000; ASA: Ácido salicílico; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

La diferencia en la respuesta de maduración entre las dos etapas embrionarias evaluadas (globular y torpedo), puede ser debida a los tipos de células presentes en ellas. Quiroz-Figueroa *et al.* (2002), mencionan que en embriones globulares las células son esféricas y presentan una alta actividad mitótica con lo cual existe un mayor crecimiento y desarrollo embrionario; mientras que en

embriones torpedo y cotiledonares existen células con un grado mayor de diferenciación. Asimismo, se ha observado que los niveles de proteínas, carbohidratos y de reguladores endógenos de los embriones en estado globular y torpedo cultivados bajo las mismas condiciones son diferentes, lo cual genera una respuesta diferencial a las condiciones de cultivo (Rode *et al.*, 2012; Bartos *et al.*, 2018a; Aslam *et al.*, 2011).

#### 4.4.3 Efecto de reguladores de crecimiento (AIA y AG<sub>3</sub>) en la maduración de embriones torpedo temprano (segundo experimento)

El número de embriones en etapa de torpedo temprano que lograron madurar fue significativamente superior cuando se cultivaron en el medio con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> (45%) que cuando permanecieron en presencia de 0.3 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 0.7 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> o con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 0.2 mg L<sup>-1</sup> de BAP y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (testigo) (Figura 13).



**Figura 13.** Porcentaje de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración (segundo experimento). Testigo: medio basal con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; AIA: ácido indolacético; AG<sub>3</sub>: ácido giberélico. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

Se ha observado que la exposición de los embriones somáticos a auxinas como el AIA induce cambios en su nivel endógeno, lo cual desencadena procesos necesarios para el desarrollo del embrión (Vondráková *et al.*, 2011; Vondráková *et al.*, 2016); sugiriendo que el AIA exógeno puede afectar positivamente el desarrollo de meristemas apicales y cotiledones en los embriones (Vondráková *et al.*, 2011).

En embriones somáticos de *Picea morrisonicola* el nivel endógeno de AIA aumentó en las primeras etapas de desarrollo y disminuyó al alcanzar el estado cotiledonar cuando se cultivaron en presencia de AIA, lo anterior indica que esta hormona influye en la formación de los embriones y sus primeros estadios de desarrollo ayudando a su posterior maduración (Liao *et al.*, 2008).

En *Coffea canephora* se ha observado que los niveles de AIA y su transportador aumentan gradualmente en los embriones globulares y después se transportan polarmente hacia las células que formarán los tejidos vasculares. El transporte de AIA a través del embrión es necesario para su correcta maduración y la formación del eje embrionario, los primordios de los cotiledones, y los tejidos vasculares, confirmando así la polaridad a los embriones (Márquez-López, 2018; Vondráková *et al.*, 2016; Vondráková *et al.*, 2011).

Al igual que con otras hormonas se ha visto que la adición de ácido giberélico al medio de cultivo durante el desarrollo de embriones somáticos puede estimular o inhibir su maduración (Jiménez y Thomas, 2006).

Resultados similares a los observados en la presente investigación se encontraron en embriones somáticos de *Citrus reticulata* var. Batu 55, en los cuales la tasa de maduración aumentó con la adición de 4 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, incrementando significativamente su peso (Firdiana *et al.*, 2015). Asimismo, una respuesta similar se encontró en *Medicago sativa* (Rudus, 2002) y *Tylophora indica* con la exposición de los embriones a esta hormona (Thomas, 2006).

En *Abies alba*, Krajňáková *et al.* (2013) demostraron que la adición de 3.5 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> al medio de maduración tuvo un efecto negativo en el desarrollo de embriones somáticos globulares; sin embargo, cuando se aplicó la misma concentración a embriones en la última fase de la maduración, el número de embriones somáticos que alcanzaron la etapa cotiledonar aumentó. Lo anterior parece

indicar que la respuesta a la maduración con AG<sub>3</sub> es dependiente no sólo de la dosis y el genotipo, sino de la etapa de desarrollo del embrión (Krajňáková *et al.*, 2013).

Los resultados obtenidos nos permitieron observar que es mejor aplicar los tratamientos de maduración en la etapa globular de los embriones que en la fase de torpedo, ya que un mayor número de ellos alcanzó la madurez y en menor tiempo.

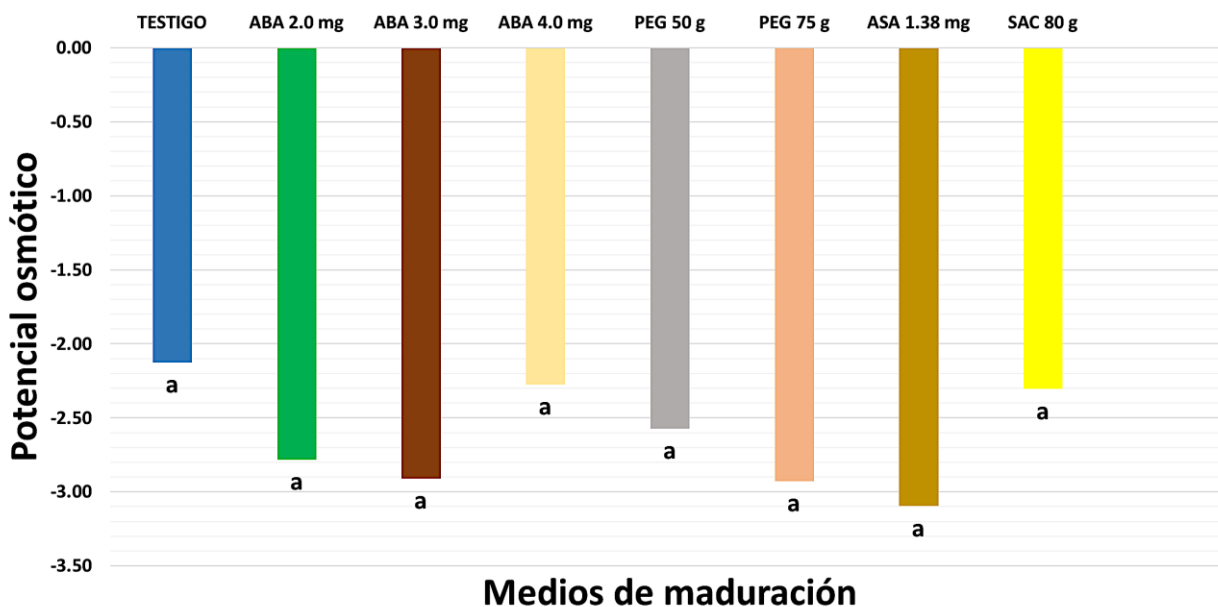
#### **4.4.4 Efecto de reguladores de crecimiento (ABA y ASA) y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en el potencial osmótico de embriones globulares y torpedo temprano (primer experimento)**

El potencial osmótico de los embriones globulares que se expusieron a distintos reguladores de crecimiento y osmóticos no mostró diferencias estadísticas entre tratamientos, encontrándose potenciales que van desde los -2.1 megapascuales (MPa) en los embriones testigo hasta los -3.1 MPa en los embriones cultivados con 1.38 g L<sup>-1</sup> de ASA (Figura 14); a pesar de que los porcentajes de maduración si fueron significativamente diferentes entre los tratamientos. De la misma forma, no se encontraron diferencias significativas en el potencial osmótico de los embriones torpedo temprano del primer experimento, con un potencial osmótico de -1.5 en los embriones del medio con 4 mg L<sup>-1</sup> de ABA, hasta -2.3 en los cultivados en 2 mg L<sup>-1</sup> de ABA (Figura 15). Cabe señalar que no fue posible determinar el potencial osmótico de los embriones globulares de los tratamientos con 50 y 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, así como de todos los tratamientos de los embriones torpedo temprano del segundo experimento debido a que no se contaba con un número suficiente de éstos.

Al respecto, Klimaszewska *et al.* (2004b) reportaron que el potencial hídrico de embriones maduros de *Pinus strobus* colectados después de nueve semanas de cultivo en un medio con 30 o 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa fue de -0.91 y -1.43 MPa, respectivamente. Los autores mencionan que los embriones cultivados con 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa mostraron una reducción en el potencial hídrico de sus tejidos, así como mayor acumulación de proteínas de almacenamiento.

Se ha informado que este aumento en la acumulación de proteínas puede estar relacionado con la síntesis de proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales se asocian con la adquisición de la tolerancia a la desecación del embrión en respuesta al estrés por la presión osmótica (Chagas

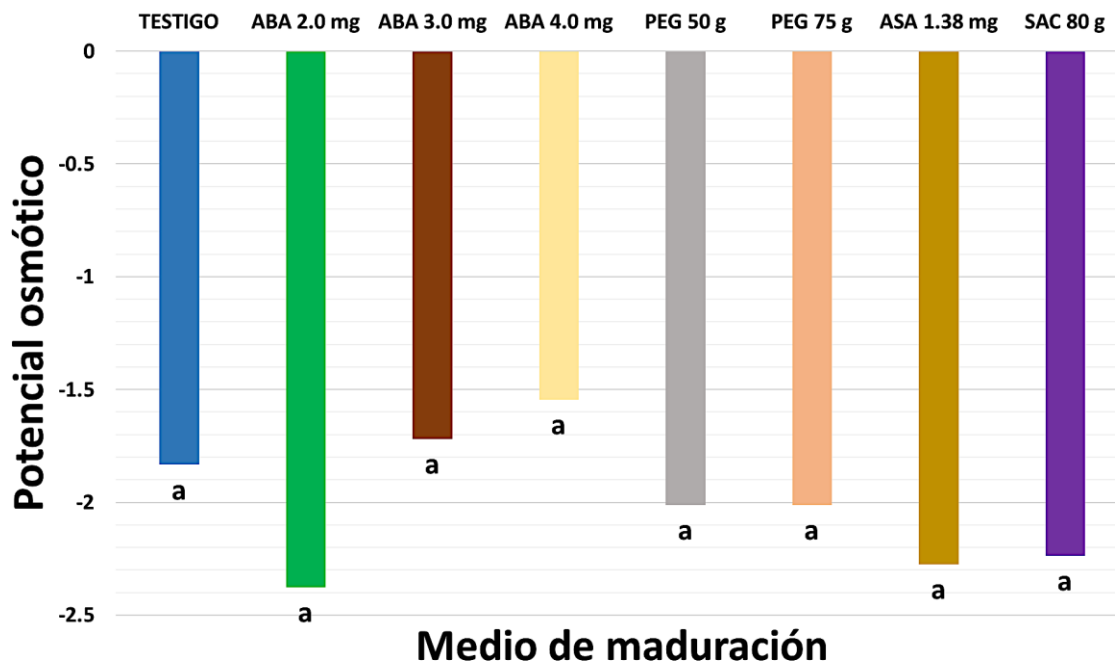
*et al.*, 2018). También se ha visto que uno de los efectos del estrés osmótico en embriones somáticos de *Pinus sylvestris* L., es la acumulación de las poliaminas como putrescina y espermina, que están relacionadas en la protección contra el estrés (Muilu-Mäkelä *et al.* 2015).



**Figura 14.** Potencial osmótico de embriones globulares que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración. Testigo: medio basal con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; ABA: Ácido abscísico; PEG: Polietilenglicol 8000; ASA: Ácido salicílico; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

Con el fin de aumentar la maduración de embriones somáticos se han generado protocolos que reducen el potencial osmótico del medio mediante el aumento de la concentración de sacarosa o complementándolo con osmóticos no plasmolizantes (Krajnková *et al.*, 2009; Troch *et al.*, 2009), sin embargo se han reportado pocos estudios sobre el potencial osmótico interno de los embriones.

El potencial osmótico de un medio de cultivo se ve directamente afectado por su concentración nutrimental y de carbono, al aumentar este potencial se ha visto un aumento en la formación y maduración de embriones somáticos de *Glycine max* (Komatsuda *et al.* 1992).



**Figura 15.** Potencial osmótico de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez después de 40 días de cultivo en los medios de maduración (primer experimento). Testigo: medio basal con 30 g L-1 de sacarosa; ABA: ácido abscísico; PEG: Polietilenglicol 8000; ASA: Ácido salicílico; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

Cárdenas y Villegas (2002) observaron que conforme el nivel de osmóticos como la sacarosa aumenta en el medio de cultivo, el potencial osmótico de los medios es más negativo, repercutiendo principalmente en las propiedades físicas y químicas del agua. Se sabe también que los agentes osmóticos incluidos en los medios de cultivo hacen más negativo en el potencial osmótico de los embriones; dichos cambios inducen la división celular, la adquisición de la tolerancia al estrés (acumulación de compuestos como prolina), variación morfológica celular, así como la expresión de genes relacionados con el desarrollo de los embriones como el SERK1 (cinasa receptora en la embriogénesis somática) (Elmaghrabi *et al.*, 2013).

Por otro lado, se ha observado que en *Pinus taeda* el potencial osmótico es dependiente de la etapa del desarrollo embrionario, volviéndose más negativo justo después del desarrollo de los cotiledones (Dumont- BéBoux *et al.*, 1996, Pullman y Johnson, 2009).

En el presente estudio los embriones que se cultivaron en PEG adquirieron una coloración verde y crecieron al madurar; en *Medicago truncatula* aplicar 100 g L<sup>-1</sup> de PEG 6000 a cultivos embriogénicos no causó cambios en el potencial osmótico celular pero si generó diferencias en el desarrollo celular y embrionario, en los cuales encontraron una mayor viabilidad celular, tamaño y número de células, elasticidad de las paredes celulares y actividad fotoquímica de las células de los tejidos del embrión, características relacionadas con la adquisición de tolerancia a la desecación (Elmaghrabi *et al.*, 2017).

Si bien el potencial osmótico de los embriones de ambos experimentos se vio reducido no se observaron diferencias significativas entre ellos; sin embargo, las diferencias en la maduración observadas en los distintos tratamientos podrían deberse a que el estrés generado por los tratamientos induce una respuesta adaptativa que conlleva a cambios morfológicos y químicos en las células de los embriones que promueven su maduración (Elmaghrabi *et al.*, 2013; Elmaghrabi *et al.*, 2017).

## 4.5 GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS MADUROS DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

### 4.5.1 Efecto del ABA y agentes osmóticos (polietilenglicol 8000 y sacarosa) en la germinación de embriones globulares

En esta fase de la investigación no se consideraron los embriones provenientes del tratamiento de maduración con ASA, ya que sólo un número pequeño de los mismos alcanzó la madurez. Se consideró como embriones germinados a aquellos que presentaron protrusión de la radícula después de 60 días.

De los embriones que lograron madurar en 3 mg L<sup>-1</sup> de ABA, 50 y 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, germinaron 20, 44.5 y 68.9 %, respectivamente, pero estos valores no fueron significativamente diferentes a lo encontrado en el tratamiento testigo (43.2 %); sin embargo, los porcentajes de germinación obtenidos en estos tratamientos fueron estadísticamente superiores a los obtenidos en los demás tratamientos probados (Figura 16).

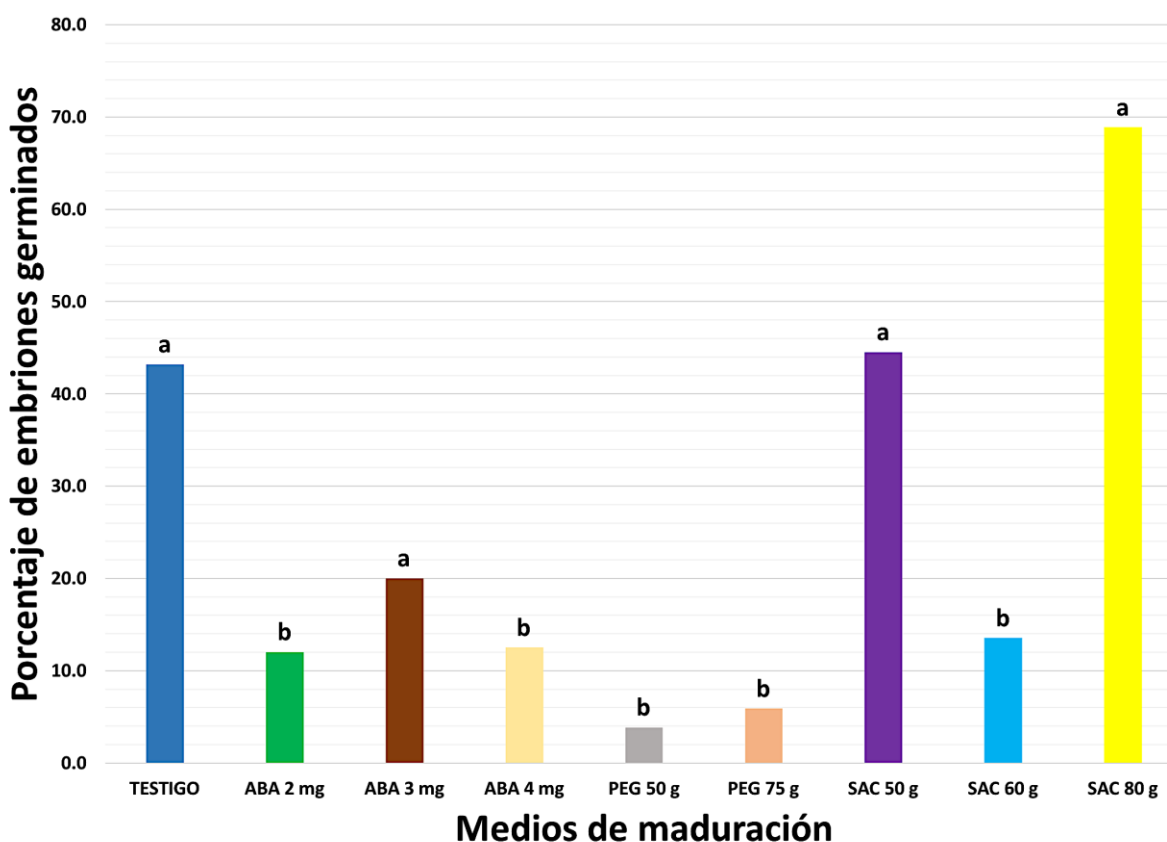
En *Phoenix dactylifera*, Sghaier-Hammami *et al.* (2010) encontraron que los embriones cultivados en presencia de 90 g L<sup>-1</sup> de sacarosa eran más grandes y produjeron mayor cantidad de proteínas de almacenamiento (leguminas). Montalbán *et al.* (2010) encontraron que cuando cultivaron embriones somáticos de *Pinus radiata* en un medio con 15.9 mg L<sup>-1</sup> de ABA y 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, 80 % de éstos lograron germinar.

En *Morus alba*, Agarwal *et al.* (2004) reportaron la mayor germinación (17%) en los embriones que maduraron en un medio con 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa. Vahdati *et al.* (2008) por su parte, mencionan que al madurar embriones somáticos globulares de *Juglans regia* en 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa 15.71% de estos germinaron. En *Schisandra chinensis* Chen *et al.* (2010) encontraron que al cultivar embriones en un medio con 40 g L<sup>-1</sup> de sacarosa 11.1 % de ellos germinaron; en esta misma especie 14.91 % de los embriones germinaron cuando se maduraron en presencia de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa (Jalali *et al.*, 2017).

Por otro lado, la baja germinación de los embriones tratados con PEG, pudo deberse a que las concentraciones utilizadas en esta investigación fueran muy altas (50 y 75 g L<sup>-1</sup>) y generaron un



estrés por arriba del óptimo. Al respecto, Rai *et al.* (2009) observaron que exponer los embriones somáticos de *Psidium guajava* a 10 y 20 g L<sup>-1</sup> de PEG permitió que 42 y 59 %, de éstos germinaran. En contraste, cuando los embriones de *Jatropha curcas* fueron cultivados en PEG a concentraciones superiores de 50 g L<sup>-1</sup> la germinación se inhibió o se obtuvieron plantas anormales (Rudiyanto *et al.*, 2014).



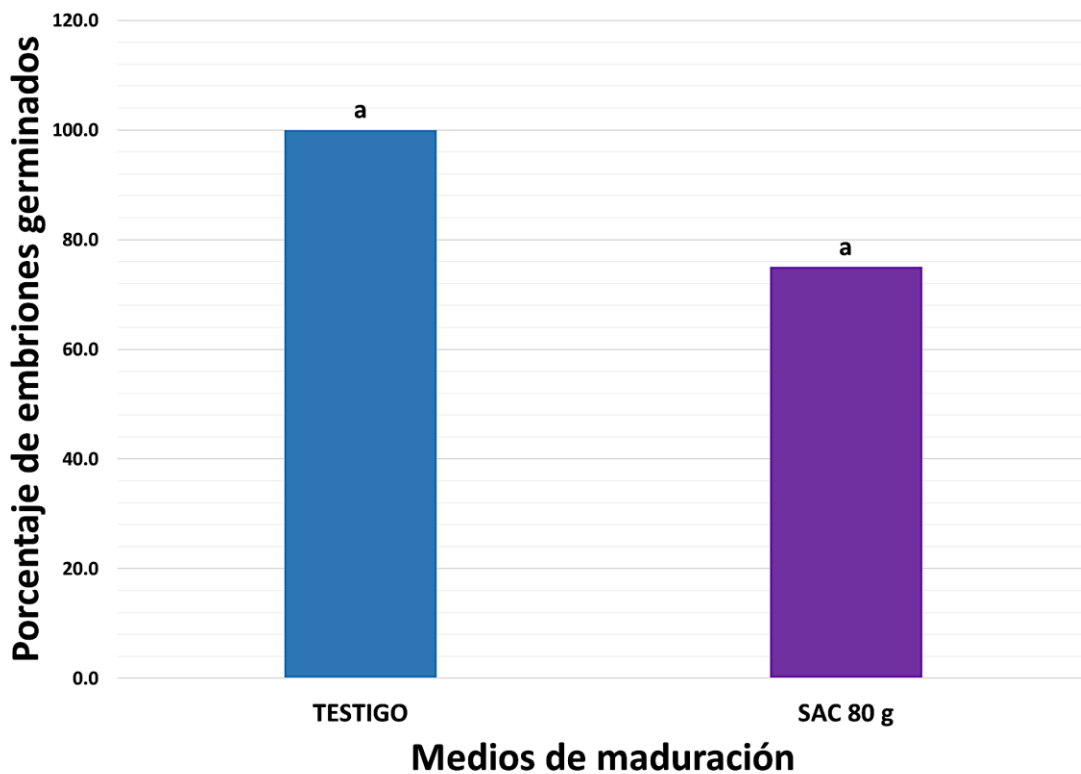
**Figura 16.** Porcentaje de germinación de embriones globulares que alcanzaron la madurez. Testigo: medio basal con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; ABA: ácido abscísico; PEG: Polietilenglicol 8000; ASA: Ácido salicílico; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

#### 4.5.2 Efecto de la sacarosa en la germinación de embriones torpedo temprano (primer experimento)

De los embriones somáticos en etapa torpedo temprano del primer experimento, que se cultivaron en los distintos tratamientos de maduración, sólo los del testigo (30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa) y sacarosa

a 80 g L<sup>-1</sup> fueron evaluados en esta fase, encontrando 100 y 75 % de germinación, respectivamente; sin embargo, no se encontró una diferencia significativa entre ambos tratamientos (Figura 17). Esto puede ser debido a que solo los embriones madurados en 30 (testigo) y 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa alcanzaron a acumular suficientes sustancias de reserva para sostener los requerimientos del embrión durante la germinación. Al respecto, Vahdati *et al.* (2008) afirman que solo los embriones que hayan acumulado suficientes materiales de almacenamiento al final de la maduración pueden germinar.

Al madurar embriones somáticos de *Pinus strobus* con 90 y 120 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, Garin *et al.* (2000) registraron 99 y 88.7% de embriones germinados respectivamente. En *Eleutherococcus senticosus*, la adición de 60 g L<sup>-1</sup> de sacarosa durante la maduración permitió un 10 % de germinación de los embriones (Choi y Jeong, 2002).



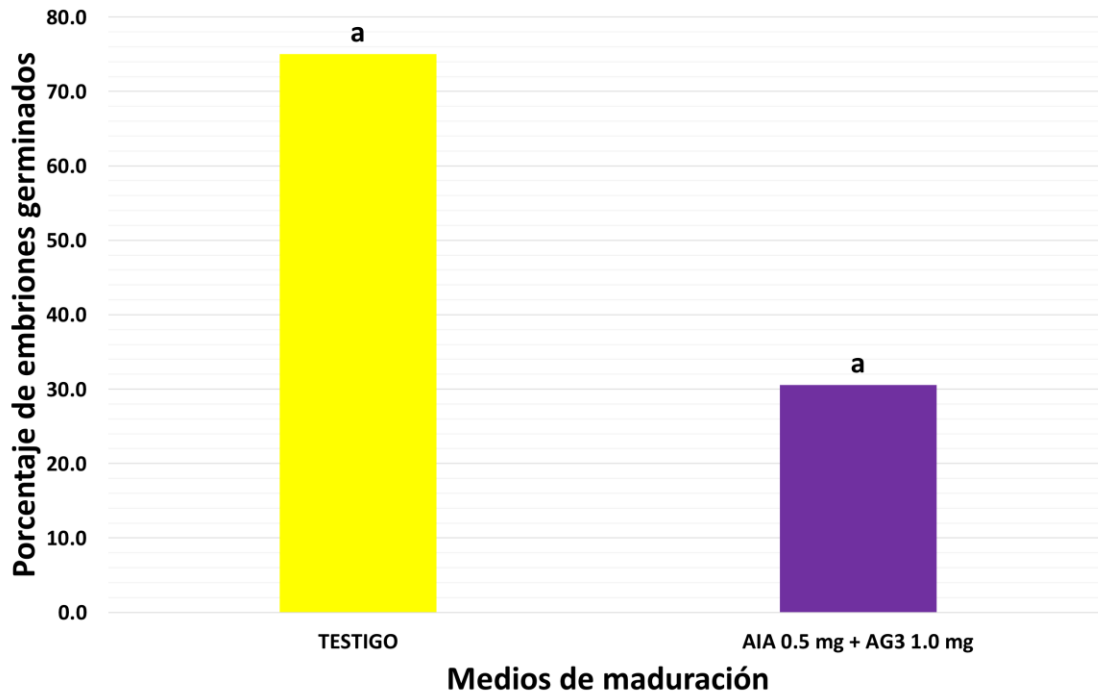
**Figura 17.** Porcentaje de germinación de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez (primer experimento). Testigo: medio basal con 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

#### **4.5.3 Efecto de reguladores de crecimiento (AIA y AG<sub>3</sub>) en la germinación de embriones torpedo temprano (segundo experimento)**

En cuanto a los embriones madurados en los medios de cultivo adicionados con AIA y AG<sub>3</sub>, se observó que solo lograron germinar los procedentes del tratamiento testigo (30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa) (75 %) y los cultivados con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> (30.6%), sin que hubiera diferencia significativa entre ellos (Figura 18). Cabe señalar que el número de embriones que lograron madurar con 0.3 mg de AIA y 0.7 mg de AG<sub>3</sub> fue muy bajo por lo que no se consideraron en esta fase de la investigación.

Diversos trabajos sobre germinación de embriones somáticos incluyen AG<sub>3</sub> en los medios de cultivo debido a que esta hormona reduce los niveles endógenos de ABA, contrarrestando su efecto inhibitor en la germinación (Kucera *et al.*, 2005, Liao y Juan, 2015).

Pamulaparthi *et al.* (2016) mencionan que la germinación de embriones somáticos de *Senna alata* se vio beneficiada con la adición de 3.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>; mientras que ausencia o remplazo por 3.0 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-D o ANA inhibió su germinación. Asimismo, la adición de BAP (0.004 mg L<sup>-1</sup>) y ácido giberélico (1.0 mg L<sup>-1</sup>) al medio de germinación de los embriones somáticos de *Carica papaya* var. Maradol roja permitió que 100% de éstos germinaran (Posada-Pérez *et al.*, 2017). De la misma manera, 40 % de los embriones somáticos de *Cocus nucifera* germinó cuando se incorporó 0.2 mg L<sup>-1</sup> de GA<sub>3</sub> al medio y solo 13 % de éstos lo hizo en un medio libre de esta hormona (Montero-Cortés *et al.*, 2010).



**Figura 18.** Porcentaje de germinación de embriones torpedo temprano que alcanzaron la madurez (segundo experimento). Testigo: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; AIA: ácido indolacético; GA3: ácido giberélico. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

Dado que el porcentaje de germinación se calculó a partir del número de embriones que alcanzaron la madurez, los resultados mostraron que los embriones que se cultivaron en los medios de maduración en la etapa globular lograron germinar en mayor proporción que aquellos que fueron cultivados desde la etapa torpedo temprana.

Los datos obtenidos en nuestro experimento indican que la germinación está estrechamente correlacionada con el grado de maduración de los embriones; por ello el nivel de maduración es decisivo para que estos puedan germinar.

Las bajas tasas de germinación y conversión de embriones somáticos son las principales limitantes para la producción a gran escala de especies vegetales a través de embriogénesis somática; por ello el aumento en las tasas de germinación es un factor deseable para su aplicación a nivel comercial. Actualmente la información relacionada con los eventos que ocurren durante la germinación y conversión es escasa para café, por lo cual son necesarios más estudios que proporcionen la

información necesaria para mejorar dichos procesos (Corredoira *et al.*, 2008; Carlsson *et al.*, 2019).

Firdiana *et al.* (2015) y Pamulaparathi *et al.* (2016) afirman que solo germinarán y se convertirán en plantas aquellos embriones que durante la fase de maduración hayan acumulado suficientes carbohidratos y proteínas de almacenamiento, logrando una correcta polarización, buen desarrollo del eje embrionario, hipocótilo y cotiledones; de no ocurrir lo anterior, los embriones no germinarán, o darán lugar a plántulas anormales (von Arnold *et al.*, 2002; Rai *et al.* 2009). Al respecto, diversos autores señalan que la baja tasa de maduración de los embriones somáticos de *Citrus reticulata*, *Pinus strobus* y *Picea abies* se debió a baja acumulación de reservas (Firdiana *et al.*, 2015; Klimaszewska *et al.*, 2004b; Carlsson *et al.*, 2019).

Si bien los carbohidratos y lípidos almacenados durante la fase de maduración son de vital importancia como fuente de energía necesaria para la germinación, se ha demostrado que el nitrógeno almacenado en forma de proteínas puede no ser suficiente para soportar el crecimiento de los embriones somáticos durante su germinación, requiriendo la inclusión de moléculas como glutamina (Gln) y  $\text{NH}_4^+$  en los medios de maduración (Carlsson *et al.* 2019). Al respecto, Rai *et al.* (2009) observaron que la adición de glutamina en los medios de cultivo aumentó el porcentaje de germinación de los embriones de *Psidium guajava*. Asimismo Corredoira *et al.* (2008), reportan que agregar de 200-438 mg  $\text{L}^{-1}$  de glutamina al medio de germinación de embriones de *Castanea sativa* mejoró la calidad de plántulas (mayor crecimiento de raíz y brote). Por su parte Carlsson *et al.* (2019) encontraron que la glutamina suministrada en el medio fue crucial para mantener el metabolismo de los aminoácidos primarios y el crecimiento de los embriones de *Picea abies*.

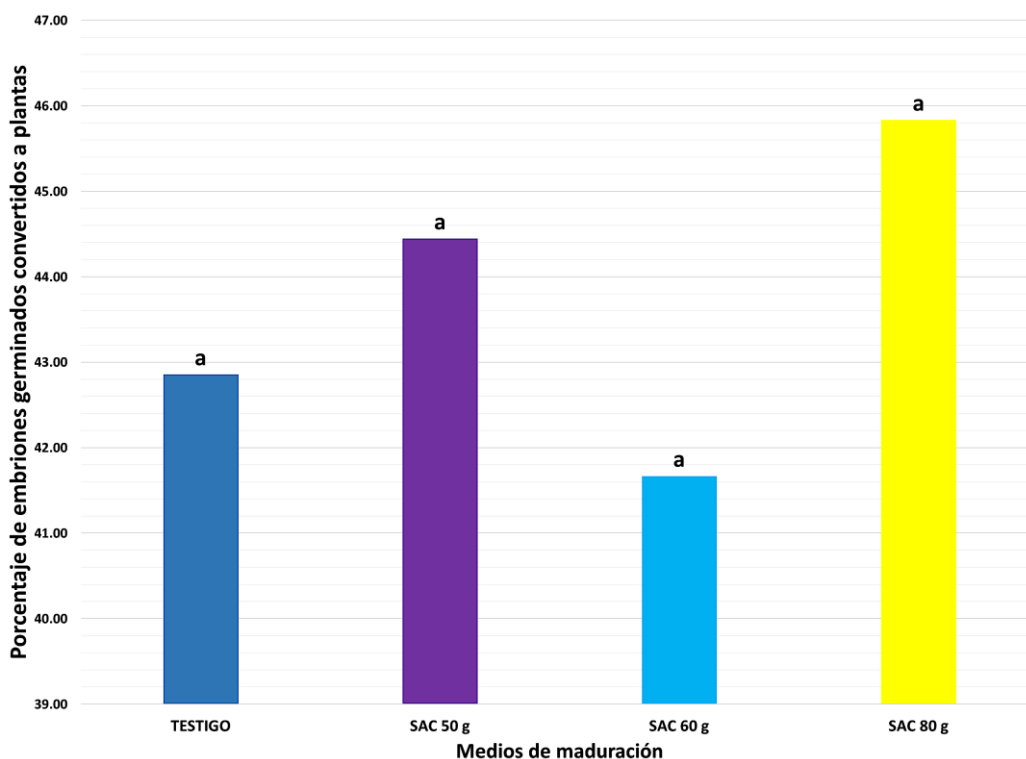
Principalmente los compuestos como las proteínas de reserva almacenadas durante la maduración son degradadas durante el proceso de germinación y conversión, liberándose grandes cantidades de compuestos como aminoácidos ricos en nitrógeno necesarios para su crecimiento inicial, para la construcción de biomoléculas involucradas en la fotosíntesis, como la clorofila y las enzimas del ciclo de Calvin, así como para la transición de un estado heterótrofo a un estado autótrofo (Pratelli y Pilot 2014; Carlsson *et al.* 2019; Wise y Tunnacliffe, 2004; Bartos *et al.*, 2018b).

## 4.6 CONVERSIÓN *in vitro* DE EMBRIONES EN PLANTAS

### 4.6.1 Efecto de la sacarosa en la conversión de embriones globulares

En esta fase de la investigación solo se tomaron en cuenta aquellos embriones provenientes de los tratamientos de maduración testigo y sacarosa 50, 60 y 80 g L<sup>-1</sup> ya que en los tratamientos con ABA, ASA y PEG sólo un bajo número de embriones logró germinar. Al final de esta etapa las plantas convertidas presentaron al menos 5 pares de hojas.

No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de embriones germinados (plántulas) que se convirtieron en plantas provenientes de los tratamientos de maduración con 50, 60 y 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa con respecto al testigo; el porcentaje de conversión osciló entre 41.6 y 45.8 (Figura 19). Las plantas obtenidas al final de esta etapa presentaron vástago y raíz sin malformaciones visibles (Figura 20).



**Figura 19.** Porcentaje de conversión de embriones madurados desde el estado globular. Testigo 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).



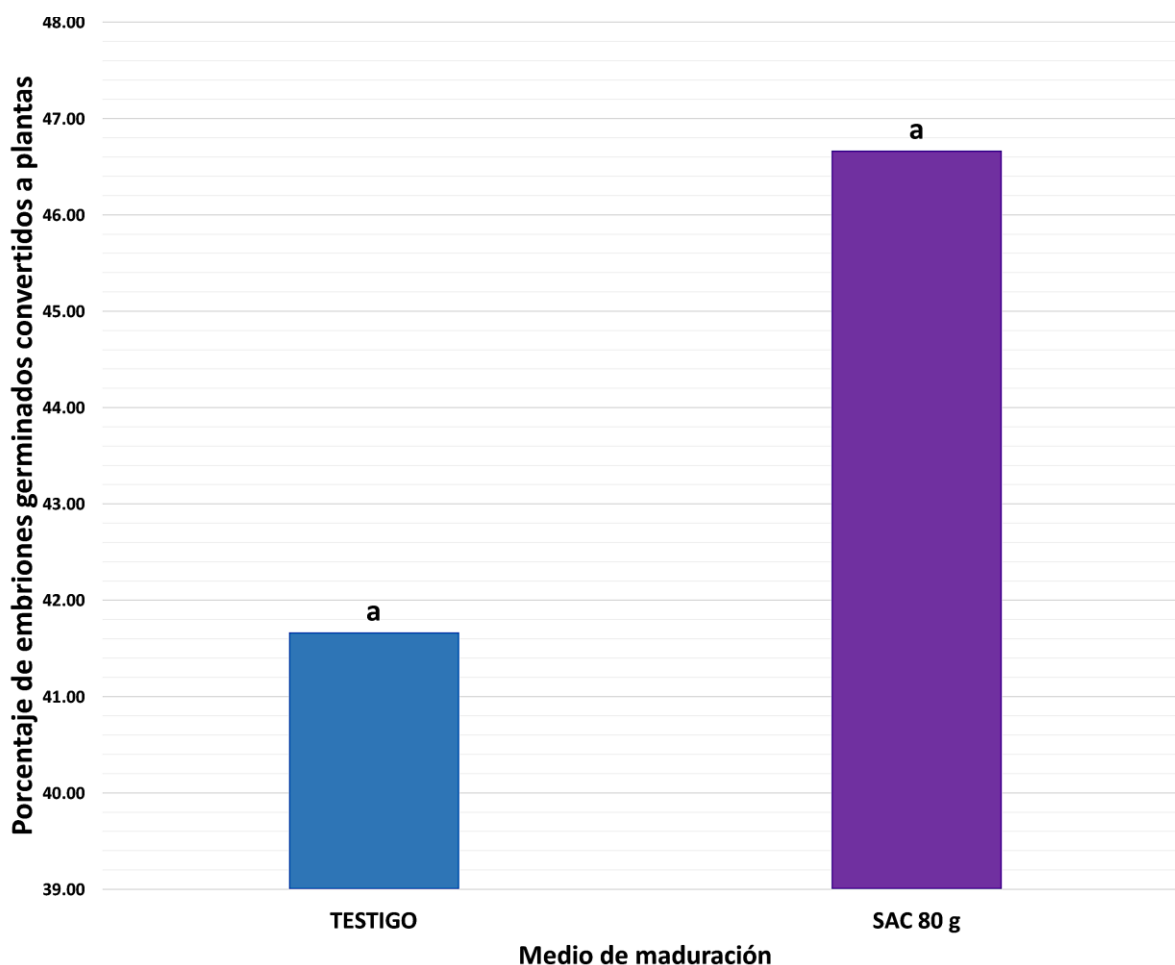
**Figura 20.** Planta procedente del medio de maduración con  $80 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa obtenida después de 24 semanas de cultivo en un sustrato *in vitro* a base de vermiculita y perlita (3:1), con al menos 5 pares de hojas. Barra=1 cm.

El proceso de conversión de plántulas a plantas implica el desarrollo de folíolos expandidos y raíces ramificadas en un embrión germinado (plántula) (Walker y Parrott, 2001). Desde el punto de vista fisiológico, la fase de conversión implica la transición del embrión heterótrofo a una planta autótrofa (Afreen *et al.*, 2002). En la mayoría de los protocolos de embriogénesis somática de café, la fase de conversión ha sido la principal limitante para la aplicación de esta biotecnología a escala comercial, ya que la capacidad de los embriones en convertirse en plantas es bajo (37-50 %) (Campos *et al.*, 2017; Etienne *et al.*, 2012; Etienne *et al.*, 2018; Etienne *et al.*, 2006; Georget *et al.*, 2017).

#### **4.6.2 Efecto de la sacarosa en la conversión de embriones torpedo temprano (primer experimento)**

Para este experimento, solo se consideraron los embriones provenientes del tratamiento de maduración con  $80 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa y el testigo ( $30 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa), debido a que en los demás tratamientos sólo se disponía de un muy bajo número de embriones germinados. La Figura 21 muestra que 46.6 % de los embriones que provenían del tratamiento de maduración con  $80 \text{ g L}^{-1}$

de sacarosa lograron convertirse en plantas, pero este valor no fue significativamente diferente del obtenido en el tratamiento testigo.



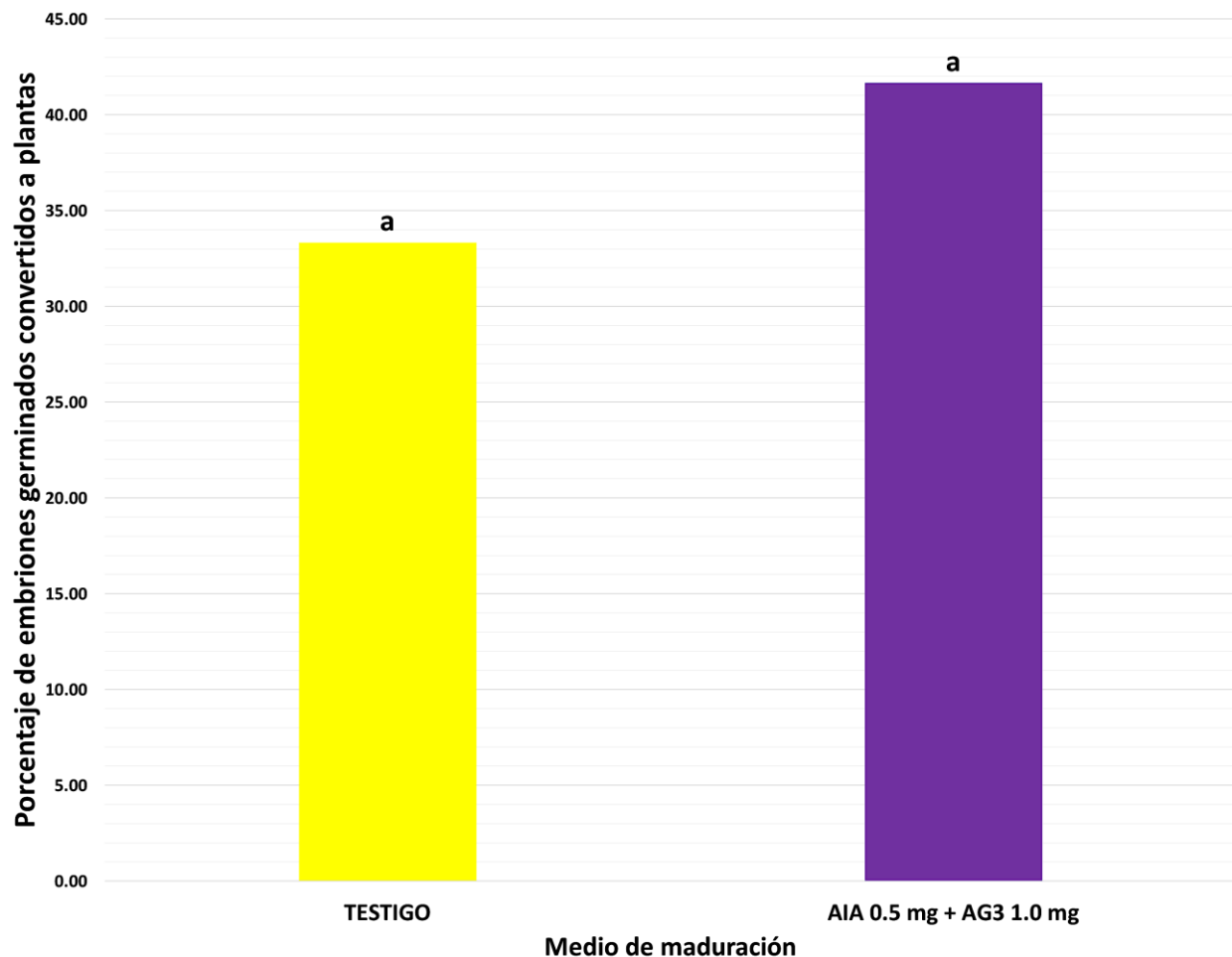
**Figura 21.** Porcentaje de conversión de embriones madurados desde el estado torpedo temprano (primer experimento). Testigo: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; SAC: Sacarosa. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMeans  $p \leq 0.05$ ).

#### **4.6.3 Efecto del AIA y AG3 en la conversión de embriones torpedo temprano (segundo experimento)**

De las plántulas resultantes del tratamiento de maduración con 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA y 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>, 41.67 % se convirtió en plantas (Figura 22), en tanto que sólo 33.3 % de las derivadas del testigo lograron su conversión; sin embargo no se observaron diferencias significativas entre ambos tratamientos



Mallón *et al.* (2013) encontraron que durante la germinación de embriones somáticos de *Quercus bicolor* la adición de 0.06–0.1 mg L<sup>-1</sup> de BAP permitió que 60 % de éstos se convirtieran en plantas, mientras que la adición de AG<sub>3</sub> y BAP no promovió dicha respuesta. Asimismo, en *Actaea racemosa* suplementar el medio de germinación con 0.2 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub> indujo a que 63 % de embriones se convirtieran en plantas; estos autores sugieren que el BAP estimula la maduración y germinación de embriones somáticos aumentando el proceso de conversión (Pinker y Wernicke, 2017).



**Figura 22.** Porcentaje de conversión de embriones madurados desde el estado torpedo temprano (segundo experimento). Testigo: 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; AIA: ácido indolacético; AG3: ácido giberélico. Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (LSMean  $p \leq 0.05$ ).

En *Coffea arabica* var. Caturra (Etienne *et al.* 2013), *Theobroma cacao* (Pila *et al.*, 2018) y coníferas como *Quercus bicolor* (Stasolla y Yeung 2003), se ha encontrado una correlación directa

entre el potencial de conversión y la cantidad de carbohidratos y proteínas de reserva acumuladas durante su maduración. Los hallazgos de Iraquí y Tremblay (2001) y de Iraquí *et al.* (2005) parecen indicar que la alta actividad de la enzima sacarosa sintasa (SuS) durante la maduración de los embriones en presencia de  $60 \text{ g L}^{-1}$  de sacarosa, resulta en la adecuada acumulación de compuestos de reserva en las células de embrionarias que proporcionan la energía necesaria para la germinación del embrión; durante el proceso conversión, las proteínas son degradadas liberándose aminoácidos ricos en nitrógeno necesarios para el crecimiento inicial y para la transición a un estado autótrofo (Stasolla y Yeung 2003; Wise y Tunnacliffe, 2004; Bartos *et al.*, 2018a).

Moon *et al.* (2013), indican que en *Oplopanax elatus* la mayor tasa de conversión a plantas (64%) se obtuvo al incluir 5% de sacarosa en el medio de maduración (64%).

En nuestro estudio la conversión de embriones a plantas tomó 24 semanas, lo cual concuerda con lo encontrado por otros autores quienes en café indican un tiempo de conversión entre 15 y 30 semanas; en tanto que las plántulas obtenidas por semilla tardan de 14 a 15 semanas para convertirse en plantas (Menéndez-Yuffá *et al.* 2010; Etienne *et al.* 2013; Etienne *et al.* 2018; Etienne *et al.* 2012).

En café distintos autores sugieren que la etapa de conversión se lleve a cabo en condiciones *ex vitro*, es decir, en condiciones de vivero utilizando suelo o sustratos como arena, pulpa de café o turba, esterilizados por tratamientos químicos o físicos, con el fin de reducir los costos de producción y de mejorar las características morfológicas de las plantas regeneradas (Albarran *et al.*, 2005, Etienne *et al.*, 2018, Menéndez-Yuffá *et al.*, 2010).

Aunque *in vitro* la mortandad de las plantas es menor, la conversión *ex vitro* usando sustratos promueve el crecimiento del sistema aéreo y radical, y mejora las condiciones hídricas y minerales del entorno, lo que influye positivamente en la etapa de aclimatación (Barry-Etienne *et al.*, 2002; Etienne *et al.*, 2018). Al respecto, Landey *et al.* (2013) utilizaron una mezcla de tierra, arena y pulpa de café (2:1:1) en la conversión de embriones somáticos de los híbridos HI y H3 de *C. arabica* lográndose dicha respuesta a las 12 semanas.

## 4.7 ACLIMATACIÓN Y CRECIMIENTO DE PLANTAS DE *Coffea arabica* L. var. Colombia

### 4.7.1 Efecto de los sustratos en la supervivencia de las plantas y las variables morfológicas

#### Supervivencia

Después de 90 días de que las plantas se colocaron en sustratos dentro de un invernadero, 100% de éstas sobrevivió en los dos tipos de sustratos utilizados. Dichas plantas no mostraron síntomas visibles de deficiencias nutrimentales ni de enfermedades (Figura 23).



**Figura 23.** Plantas aclimatadas en invernadero 90 días después de siembra (dds). a) planta crecida en perlita-turba-tezontle (1:1:1), b) planta cultivada en turba-tezontle (2:1).

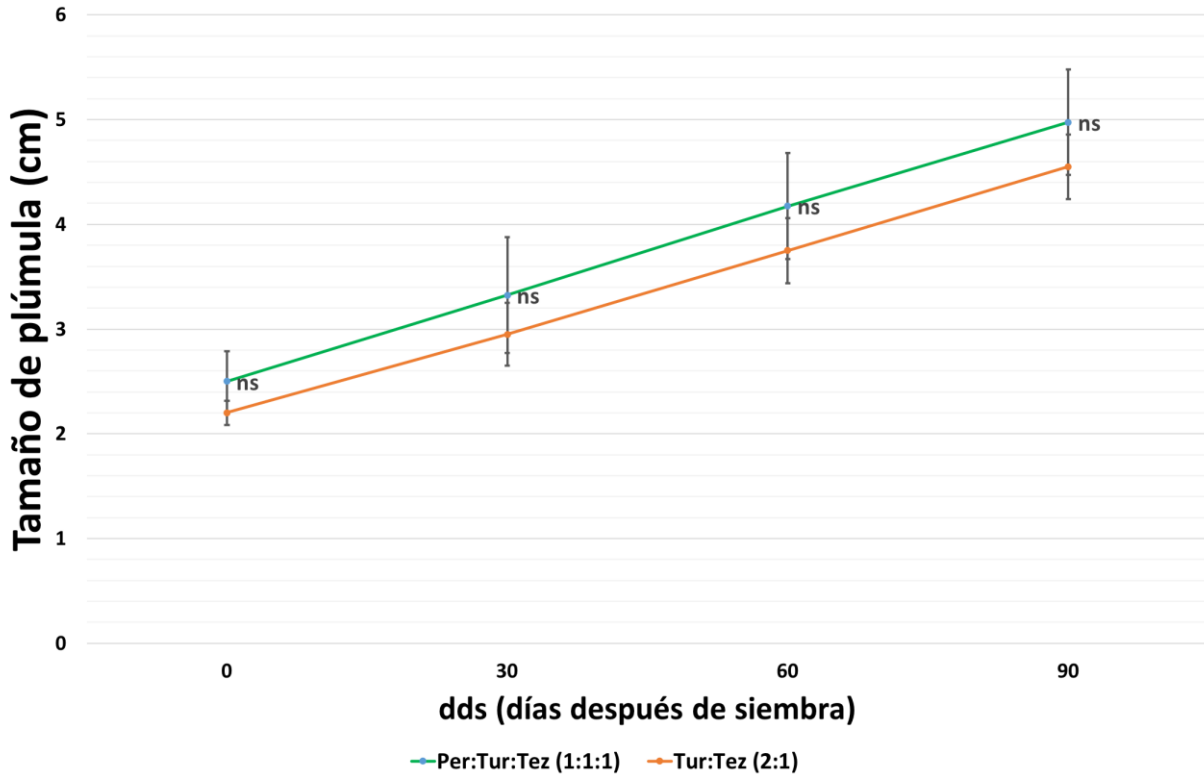
El correcto desarrollo y supervivencia durante la aclimatación de plantas obtenidas mediante embriogénesis somática depende en gran parte del control del entorno donde se lleve a cabo dicho proceso lo cual implica el uso de sustratos adecuados, el suministro de nutrientes o reguladores del crecimiento, así como de la calidad de las plantas (de Rezende *et al.*, 2016; Afreen *et al.*, 2001; Esayas y Yashwant, 2017). Durante la aclimatación ocurren cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que permiten que las plantas sobrevivan a las condiciones *ex vitro* y se desarrollen vigorosamente (Sama *et al.*, 2015).

En café diversos materiales como vermiculita, aserrín composteado, bagazo, corteza de pino, humus de lombriz, pulpa de café y turba han sido utilizados para la producción de plantas (Dias y Melo, 2009; de Rezende *et al.*, 2016). El crecimiento y la arquitectura de las raíces dependen principalmente de la composición del sustrato y en particular, de la disponibilidad de agua y nutrientes minerales, por ello la elección del sustrato a utilizar es muy importante (Llebrés *et al.*, 2018).

En la mayoría de los trabajos sobre embriogénesis somática en café se evalúa la tasa de supervivencia de las plantas después de 30-45 días. En el presente trabajo se dio seguimiento a las plantas por 90 días después de que se colocaran en condiciones de invernadero. La supervivencia de las plantas después de 3 meses de cultivo fue superior a la reportada por Afreen *et al.* (2002) en *C. arabusta* quienes obtuvieron 67% de supervivencia. Asimismo, Menéndez-Yuffá *et al.* (2010) cultivaron plantas de café de las variedades Caturra y Costa Rica 95 obtenidas por embriogénesis, en una mezcla de sustratos a base de turba y pulpa de café (3:1), obteniendo 90 % de supervivencia después de 21 semanas. Plantas de un híbrido de *C. arabica* tuvieron 96.9 % de supervivencia cuando se colocaron durante de 3 semanas sobre una mezcla de tierra estéril, pulpa de café y arena (4:2:1) (Ahmed *et al.*, 2013). En un híbrido de *C. arabica* Kahia *et al.* (2016), reportan un 98 % de supervivencia después de un mes de aclimatación en un sustrato compuesto por suelo y estiércol en una proporción de 3:1. Asimismo, Esayas y Yashwant (2017), transfirieron plantas de *C. arabica* obtenidas por embriogénesis somática a un sustrato hecho a base de arena y turba en una proporción 1:1 regándolas con medio MS al 25 % cada dos días en condiciones de vivero; estos autores registraron 86% de supervivencia después de 10 semanas.

#### Longitud de la parte aérea (tamaño de plúmula)

La longitud de la parte aérea de las plantas crecidas en las dos mezclas de sustratos probados no fue significativamente diferente después de 90 días de cultivo. Las plantas cultivadas en perlita:turba:tezontle (1:1:1) alcanzaron 4.9 cm de longitud, en tanto que las que crecieron en turba:tezontle (2:1) tuvieron una longitud de 4.5 cm (Figura 24).



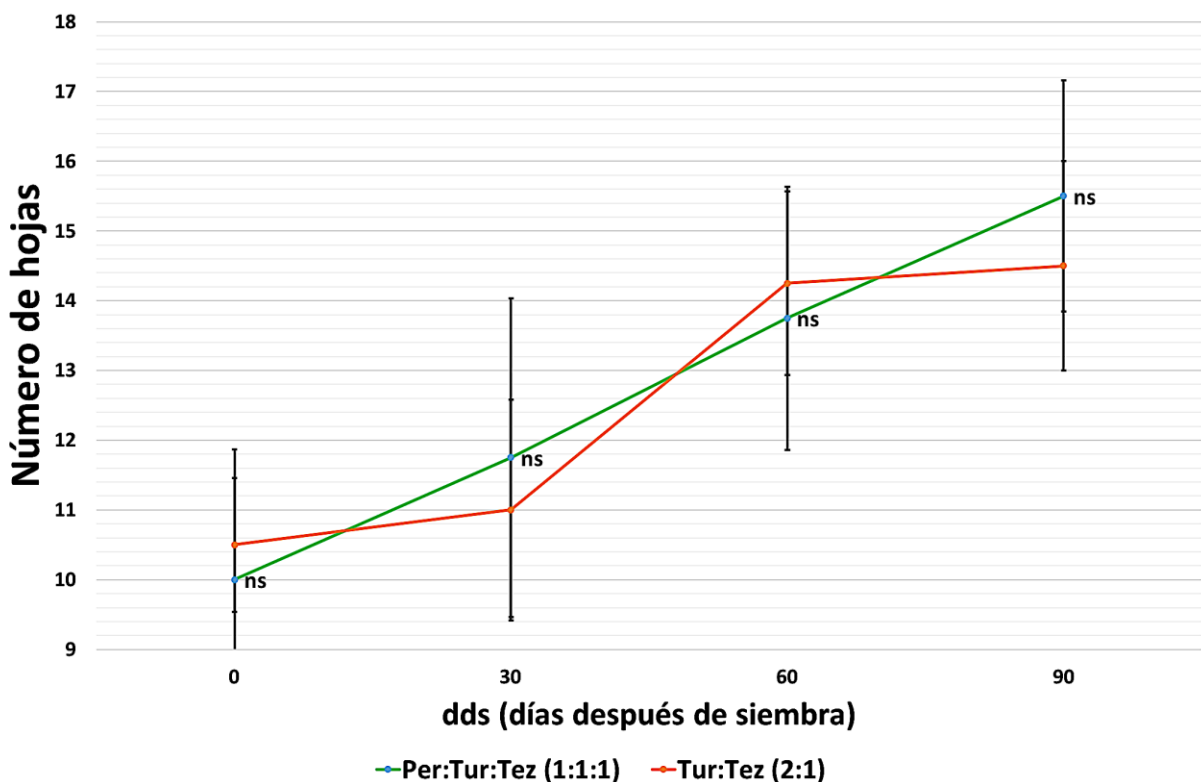
**Figura 24.** Tamaño de plúmula (cm) de plantas de *C. arabica* var. Colombia durante su crecimiento en invernadero por 90 días. Per: perlita; Tur: turba; Tez: tezontle; ns indica diferencias no significativas, \*indica diferencias significativas (T-Student  $p \leq 0.05$ ).

La longitud de las plantas regeneradas en la presente investigación fue menor (5 cm) a la observada en plantas de *C. arabica* obtenidas por embriogénesis somática y crecidas en arena y turba (1:1) las cuales alcanzaron 8 cm después de tres meses (Esayas y Yashwant, 2017). Dicha diferencia pudo deberse a las condiciones de cultivo utilizadas en ambos trabajos, ya que las plantas de la variedad Colombia se crecieron en la región de Texcoco, Estado de México, cuyo clima no es el óptimo para cultivar café. Asimismo, la variedad Colombia utilizada en este estudio es de porte bajo, sus entrenudos son más cortos y su crecimiento más lento (López-García *et al.*, 2016). Además, en plantas de café regeneradas *in vitro* se genera un acortamiento de los entrenudos en las primeras etapas de desarrollo (Menéndez-Yuffá *et al.* 2010). El crecimiento lento también puede deberse al bajo vigor y morfología de las plántulas durante la germinación y conversión.

Etienne *et al.* (2002) mencionan que el crecimiento de plantas producidas por embriogénesis somática en café es lento y que el tiempo necesario para alcanzar la longitud (30 cm) requerida para su transplante a campo es de 40 a 55 semanas. De la misma manera, para que las plantas abandonen el estado de miniaturización necesitan alcanzar un tamaño mínimo de 15 cm para iniciar un crecimiento similar al de una planta producida por semilla.

### Número de hojas

No se encontraron diferencias significativas en el número de hojas de las plantas cultivadas en los dos sustratos probados después de 90 dds (Figura 25); sin embargo, el número de hojas incrementó paulatinamente durante los primeros días. Una disminución significativa en el número de hojas de las plantas crecidas en la mezcla de turba:tezontle (2:1) se observó a los 30 y 90 dds, debida principalmente a la manipulación de las mismas.



**Figura 25.** Número de hojas en plantas de *C. arabica* var. Colombia durante su crecimiento en invernadero por 90 días. Per: perlita; Tur: turba; Tez: tezontle; ns indica diferencias no significativas, \*indica diferencias significativas (T-Student  $p \leq 0.05$ ).

El número de hojas presentes en las plantas de café regeneradas en la presente investigación (15) fue similar al encontrado por Menéndez-Yuffá *et al.* (2010), en plantas de *C. arabica* var. Caturra y Costa Rica 95, obtenidas a partir de embriogénesis somática, las cuales formaron de 13-16 hojas.

Aunque no se observaron diferencias significativas entre los sustratos utilizados, el número de hojas de las plantas de la variedad Colombia fue mayor al de las plantas del híbrido de *Coffea racemosa* x *Coffea arabica* después de 180 días de cultivo en una mezcla de turba y vermiculita (2:1), adicionado con 10.9 g L<sup>-1</sup> del fertilizante de liberación lenta Osmocote® (15-10-10 + micronutrientes) (de Rezende *et al.* 2016).

#### 4.7.2 Efecto de los sustratos en las variables fisiológicas

##### Intercambio de gases

En el Cuadro 4 se observa que las plantas aclimatadas en la mezcla de perlita:turba:tezontle (1:1:1) alcanzaron una tasa fotosintética de 1.51  $\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , la cual no fue significativamente diferente a la encontrada en las plantas crecidas en turba:tezontle (2:1) (1.88  $\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

**Cuadro 4.** Componentes del intercambio gaseoso en plantas de *C. arabica* var. Colombia cultivadas durante 110 días en condiciones de invernadero.

Sustrato	A	gs	E	Ci
Perlita:turba:tezontle (1:1:1)	1.51	0.11*	2.45*	369.72*
Turba:tezontle (2:1)	1.88 ns	0.06	1.48	330.14

A = tasa fotosintética ( $\mu\text{mol (CO}_2\text{) m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); gs = conductancia estomática ( $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); E = transpiración ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ); Ci = concentración interna de CO<sub>2</sub> ( $\text{mmol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$ ). Datos tomados a los 110 días después de cultivo; ns: diferencias no significativas, \* diferencias significativas (T-Student  $p \leq 0.05$ ).

Por otro lado, la conductancia estomática fue significativamente superior en las plantas crecidas en perlita:turba:tezontle (1:1:1) ( $0.11 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), que en las cultivadas sobre turba:tezontle (2:1) ( $0.06 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Cuadro 4). Lo anterior indica que en las plantas del sustrato con turba:tezontle (2:1) la apertura de los estomas fue menor, por lo que el intercambio gaseoso fue menor afectando el nivel interno de  $\text{CO}_2$  (Taiz y Zeiger, 2010). Asimismo, la menor apertura de los estomas también afectó la transpiración, lo cual se vio reflejado en los valores significativamente más bajos para esta variable en las plantas crecidas en turba:tezontle (2:1) ( $1.48 \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Estos resultados son similares a los encontrados por Aragón *et al.* (2014), quienes registraron una conductancia estomática de  $0.17 \mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y una transpiración de  $2.17 \text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$  en vitroplantas de *Musa* AAB cv. Cemsa.

*C. arabica* es una planta C3 cuya temperatura óptima para su desarrollo está entre 18-23 °C, (Ramalho *et al.* 2014); en estas especies las temperaturas supraóptimas (altas) afectan su fotosíntesis debido al aumento de demanda de evaporación en el aire (DaMatta *et al.*, 2010, Rodrigues *et al.*, 2018). Rodrigues *et al.* (2018) y Zapata *et al.* (2017) encontraron que la temperatura supraóptima así como la sombra generaron limitaciones estomáticas en *C. arabica* cv. Catuaí Amarelo, DaMatta *et al.* (2010), menciona que estas afectaciones reducen la conductancia estomática, la transpiración y la tasa fotosintética debido a una menor afluencia de  $\text{CO}_2$  a las hojas.

Por otra parte, la concentración interna de  $\text{CO}_2$  fue significativamente superior ( $369.72 \text{mmol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ ) en las plantas del sustrato con perlita:turba:tezontle (1:1:1) que en las plantas del sustrato con turba:tezontle (2:1) ( $330.14 \text{mmol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ ) (Cuadro 4). Lo anterior se debió a que hubo menor conductancia estomática y por ello la entrada de  $\text{CO}_2$  se vio disminuida en las plantas del sustrato con turba:tezontle (2:1), agotándose el  $\text{CO}_2$  interno. No obstante, la concentración de  $\text{CO}_2$  registrada en las plantas regeneradas en la presente investigación fue más alta que la encontrada en plantas de 1 año de *Coffea arabica* var. Catuaí Vermelho y *C. arabica* var. Catuaí IPR 102 ( $276$  y  $250 \text{mmol CO}_2 \text{mol}^{-1}$ , respectivamente) (Martins *et al.*, 2014; Partelli *et al.*, 2009).

Aunque la conductancia, transpiración y  $\text{CO}_2$  interno presentaron diferencias entre ambos tratamientos, estos no se vieron relacionadas con una diferencia en la capacidad fotosintética de las plantas de ambos tratamientos. Nuestros resultados son similares a los encontrados en



vitroplantas de *Musa* AAB cv. Cemsa cuya tasa fotosintética fue de  $1.92 \mu\text{mol} (\text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Aragón *et al.*, 2014).

En plantas de café var. Colombia de 6 meses de edad obtenidas por semilla se ha registrado una actividad fotosintética de  $8 \mu\text{mol} (\text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  (Mosquera-Sánchez *et al.*, 1999). De la misma manera, Frois de Andrade *et al.* (2015), reportaron una tasa fotosintética de  $3.43 \mu\text{mol} (\text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$  para plantas de *C. arabica* var. Catuaí de seis meses de edad. En la presente investigación la actividad fotosintética de las plantas (en promedio fue menor ( $1.69 \mu\text{mol} \text{CO}_2) \text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) que en los trabajos antes mencionados. La actividad fotosintética depende de factores como la radiación interceptada por el dosel, cuando esta es baja, la tasa fotosintética se ve disminuida (Taiz y Zeiger, 2010; Li *et al.*, 2015). Ziv y Chen (2008) mencionan que en las plantas regeneradas *in vitro* recién aclimatadas el aparato estomático no está completo ni es fisiológicamente funcional debido a que las células oclusivas de sus estomas presentan hipolignificación, desorientación de las microfibrillas así como la deposición de callosa en lugar de celulosa en las paredes celulares. Además, estas últimas son paredes celulares delgadas, lo que las hace morfológicamente diferentes a las de plantas procedentes de semilla (Kumar y Rao, 2012). Es importante mencionar que en el presente trabajo la radiación al momento de las mediciones fue muy baja ( $143.84 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ ) y pudo haber afectado la tasa fotosintética.

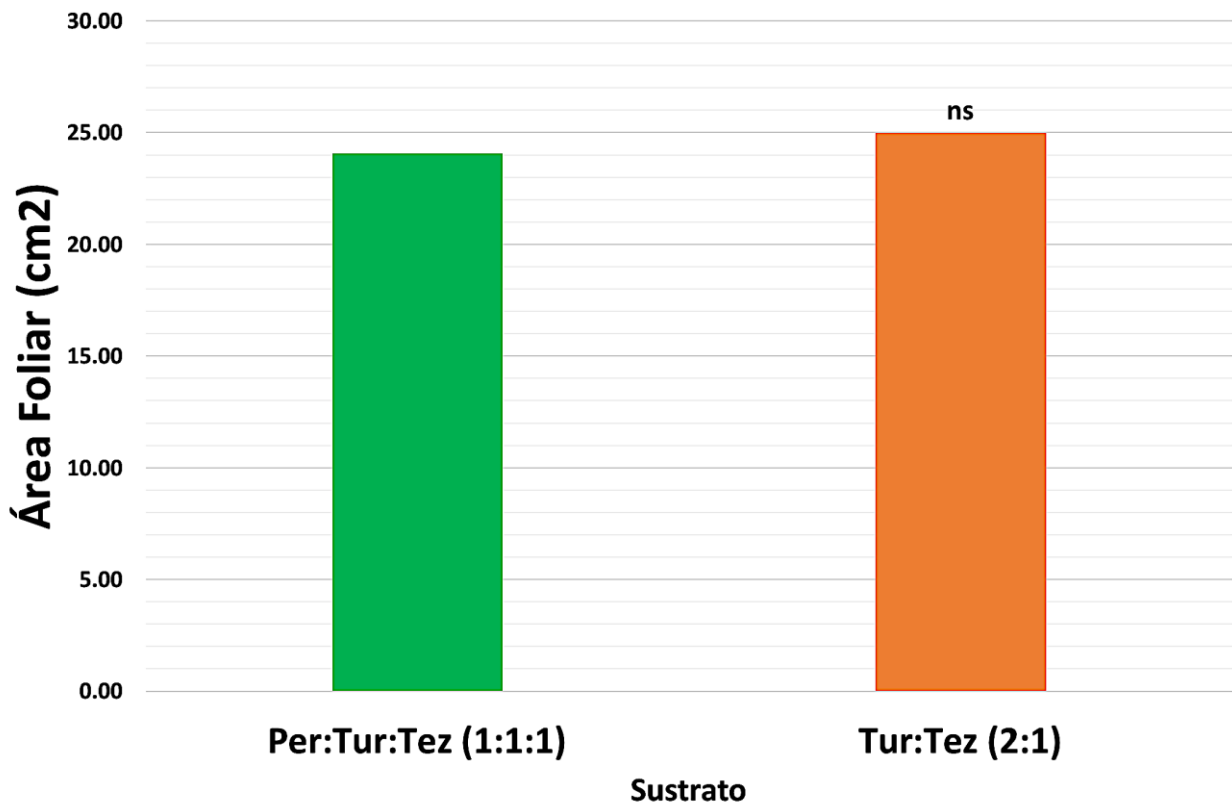
Además, las condiciones heterotróficas durante el cultivo *in vitro* pueden causar afectaciones fisiológicas de las plantas en condiciones *ex vitro* (Chandra *et al.*, 2010; Kumar y Rao, 2012). Es decir, el alto contenido de sacarosa y sales, además del bajo nivel de luz y la baja concentración de dióxido de carbono en el recipiente de cultivo son factores que influyen en la capacidad fotosintética de plantas que serán aclimatadas en condiciones de invernadero o campo (Hazarika, 2003).

La fotosíntesis produce asimilados que son necesarios para el crecimiento, almacenamiento y la energía en las plantas, su nivel es afectado por factores ambientales como la radiación y la temperatura, influyendo en el desarrollo de la planta y por ende en su rendimiento (Pinheiro y Chaves, 2010; Taiz y Zeiger, 2010; DaMatta *et al.*, 2010; Wahid *et al.*, 2007).

## Área foliar

El área foliar desempeña un papel importante en la intercepción de luz, así como en el crecimiento vegetativo y la eficiencia fotosintética, además es un parámetro que ayuda a estudiar la respuesta a tratamientos nutrimentales y de agua (Blanco y Folegatti, 2005).

En la Figura 26 se pueden observar que el área foliar de las plantas crecidas en los dos sustratos probados no fue significativamente diferente, siendo en promedio de 24.5 cm<sup>2</sup>.



**Figura 26.** Área foliar de plantas de *C. arabica* var. Colombia después de 110 de crecimiento en invernadero. Per: perlita; Tur: turba; Tez: tezontle; ns: diferencias no significativas, \* diferencias significativas (T-Student  $p \leq 0.05$ ).

Un modelo de relaciones lineales entre el largo y el ancho de la hoja es una alternativa económica, rápida, confiable y no destructiva que permite medir con precisión el área foliar (Williams y Martinson, 2003; Lu *et al.*, 2004). Sin embargo, en café los estudios para la estimación del área

foliar solo se han realizado en plantas adultas con dimensiones mucho mayores a las del presente trabajo. Al respecto, distintos autores encontraron que área foliar de plantas adultas de *C. arabica* variedad Caturra establecidas en campo generalmente osciló entre 2.4 y 4.4 m<sup>2</sup> (Taugourdeau *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2004; Williams y Martinson, 2003).

Debido a que como se mencionó, los estudios para la estimación del área foliar en café son realizados en plantas adultas, decidimos realizar una relación tomando en cuenta el cociente entre el promedio del largo y el promedio del ancho de las hojas y correlacionarlo con el promedio del área foliar de ambos sustratos de aclimatación (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Relación del cociente entre el largo/ancho de las hojas y el área foliar observada en plantas de *C. arabica* var. Colombia cultivadas durante 110 días en condiciones de invernadero.

	Media del cociente largo/ancho	Área foliar observada (cm <sup>2</sup> )
Perlita:turba:tezontle (1:1:1)	2.0 ns	24.07
Turba:tezontle (2:1)	2.0	24.99 ns

Per: perlita; Tur: turba; Tez: tezontle; ns: diferencias no significativas, \*diferencias significativas (T-Student  $p \leq 0.05$ ).

En la presente investigación no se encontraron diferencias significativas en la relación del cociente entre el largo/ancho de las hojas y el área foliar de las plantas del sustrato formulado con Turba:tezontle (2:1) (2.0 y 24.99 cm respectivamente) en comparación con las plantas del sustrato formulado con Turba:tezontle (2:1) (Cuadro 5). Estos resultados fueron similares a los registrados en plantas de tres años de edad de *C. arabica* var. Castillo crecidas en campo en las que el área foliar fue de 26.7 y la relación largo/ancho de 1.7 (Unigarro-Muñoz *et al.*, 2015).

Con base a los resultados obtenidos, con ligeras diferencias aunque no significativas en cuanto al área foliar y tasa fotosintética podemos decir que los mejores resultados fueron obtenidos en el sustrato formulado con turba:tezontle (2:1). Sin embargo, se sugiere establecer nuevas investigaciones que evalúen el uso de otros sustratos como lo son las compostas o pulpa de café.

Para aumentar el tamaño y masa de las plantas durante la etapa de crecimiento en invernadero se han propuestos diferentes tratamientos que logren estimular la brotación ortotrópica subapical, entre estos tratamientos se tienen el uso de hormonas como la BAP e inhibidores de las auxinas como el ácido 2,3,5-triiodobenzoico (TIBA) (Angelo *et al.* 2018), así como la aplicación de fertilizantes utilizados en plantas obtenidas por semilla (de Rezende *et al.* 2016; Llebrés *et al.* (2018). La aplicación de fertilizantes fosforados como el DAP (difosfato de amonio con 46% de  $P_2O_5$  a los 2 y 4 meses luego del trasplante aumentan el tamaño de plantas de café procedentes de semilla (Sadeghian, 2008; Sadeghian y González, 2014). Por último, para aumentar el crecimiento de las plantas obtenidas, estas podrían ser transferidas después de su aclimatación a una región con un clima óptimo para su correcto desarrollo; una posible alternativa sería transferirlas a la región de Huatusco Veracruz, cuyas condiciones de clima semicálido húmedo y con temperaturas entre 16-26 ° C resultan óptimas para el crecimiento de esta especie.

Diversos protocolos sobre embriogénesis somática de café han sido desarrollados (Etienne *et al.*, 2013; Montes-Cruz *et al.*, 2017); sin embargo, en algunos cultivares de *C. arabica* el bajo porcentaje de maduración, germinación y conversión limitan esta técnica a escala comercial (Carlsson *et al.* 2019; Campos *et al.*, 2017; Georget *et al.* 2017; Etienne *et al.* 2018). En el presente trabajo se logró incrementar el porcentaje de maduración (81.7, 67.7 y 45.0 %) de los embriones somáticos de *C. arabica* var. Colombia al incluir concentraciones altas de sacarosa, lo cual también incrementó significativamente su germinación y conversión en plantas. Los resultados obtenidos proveen información para la optimización de protocolos de embriogénesis somática en *C. arabica*, y su aplicación en la multiplicación a gran escala de café de la variedad Colombia.

## V. CONCLUSIONES

- La mejor etapa del desarrollo para cultivar embriones en medios de maduración es la globular.
- Cultivar embriones somáticos globulares en un medio de cultivo con 30 a 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa, incrementó significativamente su maduración y germinación.
- La maduración de los embriones en etapa torpedo temprana fue mejor en un medio suplementado con 80 g L<sup>-1</sup> de sacarosa o 0.5 mg L<sup>-1</sup> de AIA más 1.0 mg L<sup>-1</sup> de AG<sub>3</sub>.
- El potencial osmótico de los embriones no tiene una relación directa con su grado de maduración.
- El grado de maduración de los embriones somáticos influye en su capacidad para germinar y convertirse en plantas.
- Cultivar plantas obtenidas por embriogénesis somática en sustratos con perlita:turba:tezontle (1:1:1) o turba:tezontle (2:1) no afectó sus características morfológicas ni su tasa fotosintética.

## VI. LITERATURA CITADA

- Afreen F., Zobayed M. A. S., and Kozai, T. 2001. Mass-propagation of coffee from photoautotrophic somatic embryos. In: Morohoshi N. and Komamine A. (eds). *Molecular Breeding of Woody Plants*. First ed. Elsevier Science B.V. Amsterdam, Holanda. pp:355-364.
- Afreen, F., Zobayed, S. and Kozai, T. 2002. Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of a bioreactor for large- scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Annals of Botany*, 90: 21-29.
- Agarwal, S., Kanwar, K. and Sharma, D. 2004. Factors affecting secondary somatic embryogenesis and embryo maturation in *Morus alba* L. *Scientia Horticulturae*, 102: 359-368.
- Ahmed, W., Feyissa, T. and Disasa, T. 2013. Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88: 469-475.
- Al-Kaaby, H. K., Abdul-Qadir, L. H. and Karem, M. E. 2013. Effect of sorbitol on callus induction and somatic embryos regeneration in two local wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Journal of Basrah Researches (Sciences)*, 39: 107-113.
- Albarran, J., Bertrand, B., Lartaud, M. and Etienne, H. 2005. Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 27-36.
- Ali, H., and Anjum, M. A. 2004. Aerial growth and dry matter production of potatoe (*Solanum tuberosum* L.) cv. Desiree in relation to phosphorus application. *International Journal of Agriculture and Biology*, 6: 458-461.
- Altamura, M. M., Della Rovere, F., Fattorini, L., D'Angeli, S. and Falasca, G. 2016. Recent advances on genetic and physiological bases of *in vitro* somatic embryo formation. In: Germana M. A. and Lambardi M. (eds). *In vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Springer, New York, USA. pp: 47-85.

- Angelo, P. C. D. S., Ferreira, I. B., Reis, A. M., Bartelega, L., Carvalho, C. H. S. D., Paiva, A. C. R. S., and Matiello, J. B. 2018. Sprouting induction for micro-cutting on *in vitro* cloned arabica coffee plants. *Coffee Science, Lavras*, 13: 489-497.
- Anthony, F., Combes, M., Astorga, C., Bertrand, B., Graziosi, G. and Lashermes, P. 2002. The origin of cultivated *Coffea arabica* L. varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 894-900.
- Antunes, W. C., Pompelli, F. M., Carretero, M. D., and DaMatta M. F. 2008. Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). *Annals of Applied Biology*, 153: 33-40.
- Anzueto, F. 2013. Variedades de café resistentes a la roya. Hay diferencias de calidad de taza entre grupos y líneas resistentes; el grupo de Sarchimores presenta, en general, mejores perfiles de taza. *Rev. El cafetal la revista del caficultor, Anacafé*, 35:3-7.
- Aragón, C., Sánchez, C., Gonzalez-Olmedo, J., Escalona, M., Carvalho, L. and Amâncio, S. 2014. Comparison of plantain plantlets propagated in temporary immersion bioreactors and gelled medium during *in vitro* growth and acclimatization. *Biologia Plantarum*, 58: 29-38.
- Arizaleta, M., Montilla, J. y Pares, J. 2005. Efecto del almacenamiento de las semillas de cafeto (*Coffea arabica* L. var. Catuai amarillo) sobre la emergencia. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 22: 205-213.
- Aslam, J., Ahmad, K. S., Jaleel, C. A., Mujib, A., Pershad, S. M. and Shanker S. P. 2011. Somatic embryogenesis, scanning electron microscopy, histology and biochemical analysis at different developing stages of embryogenesis in six date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18: 369-380.
- Attree, S. and Fowke, L. 1993. Embryogeny of gymnosperms: advances in synthetic seed technology of conifers. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35: 1-35.
- Attree, S., Moore, D., Sawhney, V. and Fowke, L. 1991. Enhanced maturation and desiccation tolerance of white spruce [*Picea glauca* (Moench) Voss] somatic embryos: effects of a non-plasmolysing water stress and abscisic acid. *Annals of Botany*, 68: 519-525.

- Ayil-Gutiérrez, B., Galaz-Ávalos, R. M., Peña-Cabrera, E. and Loyola-Vargas, V. M. 2013. Dynamics of the concentration of IAA and some of its conjugates during the induction of somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Signaling & Behavior*, 8: e26998.
- Barboza, R. y Herrera, J. 1990. El vigor en la semilla de café y su relación con la temperatura de secado, el contenido de humedad y las condiciones de almacenamiento. *Agronomía Costarricense*, 14: 1-8.
- Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Schlönvoigt, A. and Etienne, H. 2002. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nursery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68: 153-162.
- Bartos, P. M. C., Gomes, H. T., Do Amaral, L. I. V., Teixeira, J. B. and Scherwinski-Pereira, J. E. 2018a. Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *3 Biotech*, 8: 209.
- Bartos, P. M. C., Gomes, H. T., Gomes, S. M., Vasconcelos Filho, S. C., Teixeira, J. B. and Scherwinski-Pereira, J. E. 2018b. Histology of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *Biologia*, 73: 1255-1265.
- Berthouly, M. and Michaux-Ferriere, N. 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 169-176.
- Blanc, G., Lardet, L., Martin, A., Jacob, J.-L. and Carron, M. P. 2002. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Mull. Arg.). *Journal of Experimental Botany*, 53: 1453-1462.
- Blanco, F. F., and Folegatti, M. V. 2005. Estimation of leaf area for greenhouse cucumber by linear measurements under salinity and grafting. *Scientia Agricola*, 62: 305-309.
- Businge, E., Bygdell, J., Wingsle, G., Moritz, T. and Egertsdotter, U. 2013. The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum*, 149: 273-285.



- Bytof, G., Knopp, S.-E., Kramer, D., Breitenstein, B., Bergervoet, J. H., Groot, S. P. and Selmar, D. 2007. Transient occurrence of seed germination processes during coffee post-harvest treatment. *Annals of Botany*, 100: 61-66.
- Cabrera-Ponce, J. L., López, L., León-Ramírez, C. G., Jofre-Garfias, A. E. and Verver-y-Vargas, A. 2015. Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma*, 252: 559-570.
- Campos, N. A., Panis, B. and 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: 1-12.
- Cangahuala-Inocente, G. C., Silveira, V., Caprestano, A. C., Floh I. E. and Guerra, P. M. 2013. Dynamics of physiological and biochemical changes during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50: 166-175.
- Cangahuala-Inocente, G. C., Steiner, N., Maldonado, S. B. and Guerra, M. P. 2009. Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 217-224.
- Cantliffe, D. J., Shaw, N., Jovicich, E., Rodriguez, J. C., Secker, I. and Karchi, Z. 2001. Passive ventilated high-roof greenhouse production of vegetables in a humid, mild winter climate. *Acta Horticulturae*, 1: 195-202.
- Cárdenas, L. M. A., y Villegas M. A. 2002. Potencial osmótico del medio de cultivo con diferentes componentes para la propagación *in vitro*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 25: 213-217.
- Carlsson, J., Egertsdotter, U., Ganeteg, U. and Svennerstam, H. 2019. Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees*, 33: 383-394.
- Carvalho, A., Medina Filho, H., Fazuoli, L., Guerreiro Filho, O. e Lima, M. 1991. Aspectos genéticos do cafeeiro. *Revista Brasileira de Genética*, 14: 135-183.
- Chagas, K., Cipriano, J. L. D., Lopes, J. C., Schmildt, E. R., Otoni, W. C., and Alexandre, R. S. 2018. The effects of an osmoregulator, carbohydrates and polyol on maturation and

- germination of 'Golden THB' papaya somatic embryos. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 90: 3433-3447.
- Chakrabortee, S., Boschetti, C., Walton, L. J., Sarkar, S., Rubinsztein, D. C. and Tunnacliffe, A. 2007. Hydrophilic protein associated with desiccation tolerance exhibits broad protein stabilization function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104: 18073-18078.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. and Chandra, R. 2010. Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters*, 32: 1199-1205.
- Chen, A. H., Yang, J. L., Da Niu, Y., Yang, C. P., Liu, G. F., Yu, C. Y. and Li, C. H. 2010. High-frequency somatic embryogenesis from germinated zygotic embryos of *Schisandra chinensis* and evaluation of the effects of medium strength, sucrose, GA 3, and BA on somatic embryo development. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 357-364.
- Choi, Y. and Jeong, J. 2002. Dormancy induction of somatic embryos of Siberian ginseng by high sucrose concentrations enhances the conservation of hydrated artificial seeds and dehydration resistance. *Plant Cell Reports*, 20: 1112-1116.
- Colova, V., Bordallo, P., Phills, B. and Bausher, M. 2015. Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of grapevine *Muscadinia rotundifolia* (Michx.) Small. *Vitis-Journal of Grapevine Research*, 46: 15-18.
- Corredoira, E., Valladares, S., Vieitez, A. M. and Ballester, A. 2008. Improved germination of somatic embryos and plant recovery of European chestnut. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44: 1-9.
- Cortina, G. H. 2013. Variedades de Café Presente y Futuro. *Cenicafé*, Colombia 33 p.
- Cortina, H., Moncada, M. y Herrera, J. 2013. Variedad Castillo®: Preguntas frecuentes. *Cenicafé*, 426: 1-12.
- Costa, D. R., J. , Siqueira De Carvalho, C. H., Moacir, P., Ramia Santos, A. C. and Malfitano de Carvalho, S. 2011. Calli induction in leaf explants of coffee elite genotypes. *Ciência Rural*, 41: 384-389.

- Cueva Agila, A., Guachizaca, I. and Cella, R. 2015. Combination of 2, 4-D and stress improves indirect somatic embryogenesis in *Cattleya maxima* Lindl. *Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 149: 235-241.
- Da Rosa, S., McDonald, M., Veiga, A., Vilela, F. D. L. and Ferreira, I. 2010. Staging coffee seedling growth: a rationale for shortening the coffee seed germination test. *Seed Science and Technology*, 38: 421-431.
- Damatta, F. M., Grandis, A., Arenque, B. C. and Buckeridge, M. S. 2010. Impacts of climate changes on crop physiology and food quality. *Food Research International*, 43: 1814-1823.
- De Paiva, N. V. B. and Otoni, C. W. 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Scientia Horticulturae*, 97: 193-202.
- de Rezende M., A. L., Rodrigues, F. A., PasquaL, M. and De Carvalho, C. H. S. 2016. Acclimatization of coffee ('*Coffea racemosa*'x'*Coffea arabica*') somaclones obtained from temporary immersion bioreactor system (RITA). *Australian Journal of Crop Science*, 10: 169-175.
- Deo, P. C., Tyagi, A. P., Taylor, M., Harding, R. and Becker, D. 2010. Factors affecting somatic embryogenesis and transformation in modern plant breeding. *The South Pacific Journal of Natural and Applied Sciences*, 28: 27-40.
- Dias, R. e Melo, B. D. 2009. Proporção de material orgânico no substrato artificial para a produção de mudas de cafeeiro em tubetes, *Ciência e Agrotecnologia, Lavras*, 33: 144-152.
- Dumont- Béboux, N., Mazari, A., Livingston, N. J., Von Aderkas, P., Becwar, M. R., Percy, R. E. and Pond, S. E. 1996. Water relations parameters and tissue development in somatic and zygotic embryos of three pinaceous conifers. *American Journal of Botany*, 83: 992-996.
- Dussert, S., Davey, M. W., Laffargue, A., Doulebeau, S., Swennen, R. and Etienne, H. 2006. Oxidative stress, phospholipid loss and lipid hydrolysis during drying and storage of intermediate seeds. *Physiologia Plantarum*, 127: 192-204.

- Egertsdotter, U. and Clapham, D. 2015. Method for maturing and synchronizing conifer somatic embryos. U.S. Patent No US 9,125,352 B2. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
- Eira, M. T., Silva, E., De Castro, R. D., Dussert, S., Walters, C., Bewley, J. D. and Hilhorst, H. W. 2006. Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 149-163.
- Elmaghrabi, A. M., Ochatt, S., Rogers, H. J. and Francis, D. 2013. Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114: 61-70.
- Elmaghrabi, A. M., Rogers, H. J., Francis, D. and Ochatt, S. J. 2017. PEG induces high expression of the cell cycle checkpoint gene WEE1 in embryogenic callus of *Medicago truncatula*: Potential link between cell cycle checkpoint regulation and osmotic stress. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1479.
- Esayas, A. and Yashwant, K. 2017. *In vitro* multiplication of *Coffea arabica* L. from leaf explants through indirect somatic embryogenesis. *International Journal of Botany Studies*, 2: 17-22.
- Escamilla, P. E., Castillo, P. G., y Díaz, C. S. 2014. Veracruz, Agricultura e Historia. Aspectos agroecológicos del café en Veracruz. México. 172 p.
- Escamilla, P. E., Ruiz, R., Díaz, P., Landeros, S., Platas, R., Zamarripa, C. y González, H. 2005. El agroecosistema café orgánico en México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 76: 5-16.
- Etienne, H. 2005. Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: Jain S. M., and Gupta P. K. (eds). *Protocol for somatic embryogenesis in woody plants*. Springer, Dordrecht Holanda, pp: 167-179.
- Etienne H., Bertrand B., Ribas A., Lashermes P., Malo E., Montagnon C., Alpizar E., Bobadilla R., Simpson J., Dechamp E., Jourdan I., and Georget F. 2010. Current Applications of Coffee (*Coffea arabica*) Somatic Embryogenesis for Industrial Propagation of Elite Heterozygous Materials in Central America and Mexico. In: Park, Y.S., Bonga, J.M, Park, S.Y., and Moon, H.K. (eds.). Proceedings of the IUFRO Working Party 2.09.02: "Somatic

- Embryogenesis of Trees” conference on “Advances in Somatic Embryogenesis of Trees and Its Application for the Future Forests and Plantations”, Suwon, Republic of Korea.
- Etienne, D., Bertrand, B., Vasquez, N., y Etienne, H. 2002. Comparison of Somatic Embryogenesis-derived Coffee (*Coffea arabica* L.) Plantlets Regenerated *in vitro* or *ex vitro*: Morphological, Mineral and Water Characteristics, *Annals of Botany*, 90: 77-85.
- Etienne, H., Bertrand, B., Georget, F., Lartaud, M., Montes, F., Dechamp, E., Verdeil, J.-L. and Barry-Etienne, D. 2013. Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology*, 33: 640-653.
- Etienne, H., Bertrand, B., Montagnon, C., Bodadilla Landey, R., Dechamp, E., Jourdan, I., Alpizar, E., Malo, E. et 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*, 21: 115-124.
- Etienne, H., Breton, D., Breitler, J.-C., Bertrand, B., Déchamp, E., Awada, R., Marraccini, P., Lérant, S., Alpizar, E. and Campa, C. 2018. Coffee somatic embryogenesis: How did research, experience gained and innovations promote the commercial propagation of elite clones from the two cultivated species? *Frontiers in Plant Science*, 9: 1-21.
- Etienne, H., Dechamp, E., Barry-Etienne, D. and Bertrand, B. 2006. Bioreactors in coffee micropropagation. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18: 45-54.
- Fehér A. 2005. Why Somatic Plant Cells Start to form Embryos? In: Mujib, A., and Samaj, J. (eds). Plant Cell Monogr (2) Somatic Embryogenesis. Springer-Verlag Berlin Alemania. pp: 85-101.
- Fehér, A. 2015. Somatic embryogenesis-stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 1849: 385-402.
- Fehér, A. 2019. Callus, Dedifferentiation, Totipotency, Somatic Embryogenesis: What These Terms Mean in the Era of Molecular Plant Biology? *Frontiers in Plant Science*, 10: 1-11.

- Filonova, L. H., Bozhkov, P. V. and Arnold, S. V. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany*, 51: 249-264.
- FIRA. 2016. Panorama agroalimentario, Café 2016. FIRA. 36 p. En línea: “[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200636/Panorama\\_Agroalimentario\\_Caf\\_2016.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/200636/Panorama_Agroalimentario_Caf_2016.pdf)” Consultado el 20 de septiembre de 2018.
- Firdiana, E. R., Indriyani, S. and Widoretno, W. 2015. The Effect of Gibberellin on Somatic Embryo Growth and Maturation and Plantlet Regeneration of Tangerine (*Citrus reticulata* Blanco.) var. Batu 55. *The Journal of Experimental Life Science*. 5: 19-23.
- Frois de Andrade, M. A., Ramos-Cairo, P. A. and Santos, J. L. 2015. Water relations and photosynthesis of young coffee plants under two water regimes and different N and K doses. *Agrociencia*, 49: 153-161.
- Gaj, M. D. 2004. Factors influencing somatic embryogenesis induction and plant regeneration with particular reference to *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 43: 27-47.
- Garin, E., Bernier-Cardou, M., Isabel, N., Klimaszewska, K. and Plourde, A. 2000. Effect of sugars, amino acids, and culture technique on maturation of somatic embryos of *Pinus strobus* on medium with two gellan gum concentrations. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62: 27-37.
- Gatica-Arias, A. M., Arrieta-Espinoza, G. and Espinoza Esquivel, A. M. 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: 101-112.
- Geng, P., La, H., Wang, H. and Stevens, E. J. 2008. Effect of sorbitol concentration on regeneration of embryogenic calli in upland rice varieties (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92: 303-313.
- George, E. F. and Debergh, P. C. 2008. Micropropagation: uses and methods. in: George, E. F., Hall, M. A. and De Klerk G-J. (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture* 3rd Edition. Springer. Holanda. pp: 29-64.

- Georget, F., Courtel, P., Garcia, E. M., Hidalgo, M., Alpizar, E., Breitler, J.-C., Bertrand, B. and Etienne, H. 2017. Somatic embryogenesis-derived coffee plantlets can be efficiently propagated by horticultural rooted mini-cuttings: a boost for somatic embryogenesis. *Scientia Horticulturae*, 216: 177-185.
- Germana M. A. and Lambardi M. 2016. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Springer, New York, USA. pp: 558.
- González, M. E., Ramos, R. and Santana, N. 2000. Efecto del ácido abscísico (ABA) en la regulación del desarrollo de embriones somáticos de *Coffea canephora* P. var. Robusta. *Cultivos Tropicales*, 21: 33-37.
- Hazarika, B. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science*, 85: 1704-1712.
- Hazubska-Przybył, T., Kalemba, E. M., Ratajczak, E. and Bojarczuk, K. 2016. Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 1-14
- Herman, E. and Haas, G. 1975. Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *Hortscience*, 10: 588-590.
- Herrera, J., Alizaga, R. y Alizaga, G. 1993. Efecto de la madurez del fruto de café (*Coffea arabica*) cv. Caturra sobre la germinación y el vigor de las semillas. *Agronomía Costarricense*, 17: 25-32.
- ICO. 2017. International Coffee Organization. Statistics. En línea: “<http://www.ico.org/es/Market-Report-17-18-c.asp>” Consultado el 17 de septiembre de 2018.
- Ikeda-Iwai M., Umehara, M., Satoh, S., and Kamad, H. 2003. Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 34: 107-114.
- Iraqi, D. and Tremblay, F. M. 2001. Analysis of carbohydrate metabolism enzymes and cellular contents of sugars and proteins during spruce somatic embryogenesis suggests a regulatory role of exogenous sucrose in embryo development. *Journal of Experimental Botany*, 52: 2301-2311.

- Iraqi, D., Lamhamedi, M. S. and Tremblay, F. M. 2005. Sucrose utilization during somatic embryo development in black spruce: involvement of apoplastic invertase in the tissue and of extracellular invertase in the medium. *Journal of Plant Physiology*, 162: 115-124.
- Jafarnia, S., Hatamzadeh, A. and Tehranifar, A. 2010. Effect of different substrates and varieties on yield and quality of strawberry in soilless culture. *Advances in Environmental Biology*, 4: 325-329.
- Jain, R., Davey, M., Cocking, E. and Wu, R. 1997. Carbohydrate and osmotic requirements for high-frequency plant regeneration from protoplast-derived colonies of indica and japonica rice varieties. *Journal of Experimental Botany*, 48: 751-758.
- Jalali, M. A., Sirmandi, H. B. and Hatamzadeh, A. 2017. Effects of carbohydrate source and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos in walnut (*Juglans regia* L.). *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 20: 29-35.
- Jariteh, M., Ebrahimzadeh, H., Niknam, V., Mirmasoumi, M. and Vahdati, K. 2015. Developmental changes of protein, proline and some antioxidant enzymes activities in somatic and zygotic embryos of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122: 101-115.
- Jia, Y., Wong, D. C., Sweetman, C., Bruning, J. B. and Ford, C. M. 2015. New insights into the evolutionary history of plant sorbitol dehydrogenase. *BMC Plant Biology*, 15: 1-23.
- Jiménez, V. M. 2005. Involvement of plant hormones and plant growth regulators on *in vitro* somatic embryogenesis. *Plant Growth Regulation*, 47: 91-110.
- Jiménez, V. M. and Thomas, C. 2006. Participation of plant hormones in determination and progression of somatic embryogenesis. *Somatic embryogenesis. Plant Cell Monographs*, 2: 103-118.
- Kahia J., Kirika, M., Lubabali, H., and Mantell, S. 2016. High-frequency direct somatic embryogenesis and plantlet regeneration from leaves derived from *in vitro*-germinated seedlings of a *Coffea arabica* Hybrid Cultivar. *Hortscience* 51: 1148-1152.
- Karami, O. and Saidi, A. 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports*, 37: 2493-2507.



- Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M. and Ostad-Ahmadi, P. 2006. Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 110: 340-344.
- Kermode A. R. 2005. Role of abscisic acid in seed dormancy. *Journal of Plant Growth Regulators*, 24: 319-344.
- Kim, H. S., Zhang, G., Juvik, J. A. and Widholm, J. M. 2010. *Miscanthus* × *giganteus* plant regeneration: effect of callus types, ages and culture methods on regeneration competence. *GCB Bioenergy*, 2: 192-200.
- Klimaszewska, K., Morency, F., Jones-Overton, C., and Cooke, J. 2004a. Accumulation pattern and identification of seed storage proteins in zygotic embryos of *Pinus strobus* and in somatic embryos from different maturation treatments. *Physiologia Plantarum* 121: 682-690.
- Klimaszewska, K., Rutledge, R. G. and Séguin, A. 2004b. Genetic transformation of conifers utilizing somatic embryogenesis. In: Peña L. (ed). *Transgenic Plants: Methods and Protocols*. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey. pp: 151-163.
- Koehler, A. D., Carvalho, C. R., Abreu, I. S. and Clarindo, W. R. 2013. Somatic embryogenesis from leaf explants of hermaphrodite *Carica papaya*: a new approach for clonal propagation. *African Journal of Biotechnology*, 12: 2386-2391.
- Komatsuda, T., Lee, W., and Oka, S. 1992. Maturation and germination of somatic embryos as affected by sucrose and plant growth regulators in soybeans *Glycine gracilis* Skvortz and *Glycine max* (L.) Merr. *Plant Cell Tissues and Organ Culture* 28:103-113.
- Krajňáková, J., Bertolini, A., Gömöry, D., Vianello, A. and Häggman, H. 2013. Initiation, long-term cryopreservation, and recovery of *Abies alba* Mill. embryogenic cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 49: 560-571.
- Krajňáková, J., Haggman, H., and Gomory, D. 2009. Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of *Abies cephalonica* somatic embryos. *Plant Cell Tiss and Organ Culture*. 96:251-262.

- Kramut, P. and Te-chato, S. 2010. Effect of culture media, plant growth regulators and carbon sources on establishment of somatic embryo in suspension culture of oil palm. *Journal of Agricultural Technology*, 6: 159-170.
- Krasavina, M. S., Burmistrova, N. A. and Raldugina, G. N. 2014. The role of carbohydrates in plant resistance to abiotic stresses. In: Ahmad P. (Ed). *Emerging Technologies and Management of Crop Stress Tolerance*. Volume 1. Elsevier Inc. San Diego, CA USA. pp: 229-270.
- Kubeš, M., Drážná, N., Konrádová, H. and Lipavská, H. 2014. Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing Norway spruce somatic embryos at variable sugar supply. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 50: 45-57.
- Kucera, B., Cohn, M. A. and Leubner-Metzger, G. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Science Research*, 15: 281-307.
- Kuit, M., Jansen, D. and Nguyen, V. 2004. Manual for Arabica cultivation. *Tan Lam Agricultural Product Joint Stock Company, Quang Tri*. Vietnam. pp: 17-28.
- Kumar, K. and Rao, I. 2012. Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in-ex vitro conditions-A Reviews. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants*, 2: 271-283.
- Kumar, V., Naidu, M. M. and Ravishankar, G. 2006. Developments in coffee biotechnology-in vitro plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 87: 49-65.
- Landey, R. B., Cenci, A., Georget, F., Bertrand, B., Camayo, G., Dechamp, E., Herrera, J. C., Santoni, S., Lashermes, P. and Simpson, J. 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: e56372.
- Landey, R. B., Cenci, A., Guyot, R., Bertrand, B., Georget, F., Dechamp, E., Herrera, J.-C., Aribi, J., Lashermes, P. and 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*, 122: 517-531.
- Lema-Rumińska, J., Goncerzewicz, K. and Gabriel, M. 2013. Influence of abscisic acid and sucrose on somatic embryogenesis in cactus *Copiapoa tenuissima* Ritt. forma monstruosa. *The Scientific World Journal*, 2: 1-7.
- Li C., Li, Y., Shi, Y., Song, Y., Zhang, D., Buckler, E. S., Zhang, Z., Wang, T., and Li, Y. 2015. Genetic control of the leaf angle and leaf orientation value as revealed by ultra-high density maps in three connected maize populations. *Plos One* 10: 1-13.
- Liao, Y. K. and Juan, I.-P. 2015. Improving the germination of somatic embryos of *Picea morrisonicola* Hayata: effects of cold storage and partial drying. *Journal of Forest Research*, 20: 114-124.
- Liao, Y. K., Liao, C.-K. and Ho, Y. L. 2008. Maturation of somatic embryos in two embryogenic cultures of *Picea morrisonicola* Hayata as affected by alternation of endogenous IAA content. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 257-268.
- Lipavská, H., Svobodová, H., Albrechtová, J., Kumstýřová, L., Vágner, M. and Vondráková, Z. 2000. Carbohydrate status during somatic embryo maturation in Norway spruce. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36: 260-267.
- Llebrés, M., Avila, C., Cánovas, F. and Klimaszewska, K. 2018. Root growth of somatic plants of hybrid *Pinus strobus* (L.) and *P. wallichiana* (AB Jacks.) is affected by the nitrogen composition of the somatic embryo germination medium. *Trees*, 32:371-381.
- López-García, F. J., Escamilla-Prado, E., Zamarripa-Colmenero, A. y Cruz-Castillo, J. G. 2016. Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica* L.) en Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 39: 297-304.
- López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivez, A., Aguirre-Medina, J. F., Ojeda-Zacarías, M. C. y Gutiérrez-Díez, A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33: 205-213.

- López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Ojeda-Zacarías, M., Carmen, D. y Ducos, J. P. 2016. Medio de cultivo e inhibidores de etileno en la embriogénesis somática de café. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7: 1749-1757.
- Loyola-Vargas, V. 1999. Coffee tissue culture as a new model for the study of somaclonal variation. In: 18th Colloque scientifique international sur le cafe., ASIC, Helsinki, pp. 302-307.
- Loyola-Vargas, V. M. and Ochoa-Alejo, N. 2016. Somatic embryogenesis. An overview. In: Loyola-Vargas V. M., and Ochoa-Alejo N. (eds) *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer. New York. pp: 159-184.
- Lu, H.-Y., Lu, C.-T., Wei, M.-L. and Chan, L.-F. 2004. Comparison of different models for nondestructive leaf area estimation in taro. *Agronomy Journal*, 96: 448-453.
- Mallón, R., Martínez, T., Corredoira, E. and Vieitez, A. M. 2013. The positive effect of arabinogalactan on induction of somatic embryogenesis in *Quercus bicolor* followed by embryo maturation and plant regeneration. *Trees*, 27: 1285-1296.
- Márquez-López, R. E., Pérez-Hernández, C., Ku-González, Á., Galaz-Ávalos, R. M. and Loyola-Vargas, V. M. 2018. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma*, 255: 695-708.
- Márquez-Martín, B., Sesmero, R., Quesada, M. A., Pliego-Alfaro, F. and Sánchez-Romero, C. 2011. Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, 168: 2028-2034.
- Martínez, S. D. J., Gómez-Kosky, R., Barbón Rodríguez, R., Collado, R., Pérez, M., veitia, N. y Rodríguez, M. 2017. Maduración y germinación de embriones somáticos de *Sorghum bicolor* (L.) Moench cultivar 'CIAP 132R-05'. *Biotecnología Vegetal*, 17: 33-39.
- Martins, S. C., Araújo, W. L., Tohge, T., Fernie, A. R. and Damatta, F. M. 2014. In high-light-acclimated coffee plants the metabolic machinery is adjusted to avoid oxidative stress rather than to benefit from extra light enhancement in photosynthetic yield. *PLoS one*, 9: e94862.

- Maślanka, M. and Bach, A. 2005. Effect of abscisic acid on the morphology of tulip (*Tulipa* L.) somatic embryos. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica, Supplement*, 47: 73-73.
- Maślanka, M., Bach, A. and Janowiak, F. 2016. Endogenous ABA content in relation to maturation of somatic embryos in *Tulipa* (L.) 'Apeldoorn' cultures. *Acta Physiologiae Plantarum*, 38: 1-9.
- Méndez-Hernández, H. A., Ledezma-Rodríguez, M., Avilez-Montalvo, R. N., Juárez-Gómez, Y. L., Skeete, A., Avilez-Montalvo, J., De-La-Peña, C. and Loyola-Vargas, V. M. 2019. Signaling Overview of Plant Somatic Embryogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1-15.
- Méndez, L. I., Rodriguez, B. M. and Sanchez, H. A. 2015. Metodología para la producción de plantas de café Robusta por "estacas enraizadas". INIFAP. 2 p.
- Menéndez-Yuffá, A., Barry-Etienne, D., Bertrand, B., Georget, F. and Etienne, H. 2010. A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (*Coffea arabica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102: 297-307.
- Merkle, S., Parrott, W. and Flinn, B. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. In: Thorpe T. A. (ed). *In vitro embryogenesis in plants*. Academic Publishers, Dordrecht, pp. 155-203.
- Mishra, M., Shukla, N. and Chandra, R. 2010. Role of polyethylene glycol in maturation and germination of transformed somatic embryos of papaya (*Carica papaya* L.). *Acta Horticulturae*, 851: 227-230.
- Misra, S., Attree, S., Leal, I. and Fowke, L. 1993. Effect of abscisic acid, osmoticum, and desiccation on synthesis of storage proteins during the development of white spruce somatic embryos. *Annals of Botany*, 71: 11-22.
- Moncada E., Vielma, M., y Mora, A. 2004. Inducción *in vitro* de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arabica* L. Variedad Catuaí Amarillo. *Academia*, 3: 23-28.
- Montalbán, I., De Diego, N. and Moncaleán, P. 2010. Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees*, 24: 1061-1071.

- Montero-Cortés, M., Sáenz, L., Córdova, I., Quiroz, A., Verdeil, J.-L. and Oropeza, C. 2010. GA<sub>3</sub> stimulates the formation and germination of somatic embryos and the expression of a KNOTTED-like homeobox gene of *Cocos nucifera* (L.). *Plant Cell Reports*, 29: 1049-1059.
- Montes-Cruz, S., Lalama-Aguirre, J. M., EcheverriA-Felix, J., Toromoreno-Arevalo, L., Salazar-Torres, S., Benavides-Burgos, E. y Atiaja-Llamba, J. 2017. Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbón Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la Provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador. *Dominio de las Ciencias*, 3: 918-942.
- Moon, H-K., Kim, Y-W, Hong, Y-P and Park, S-Y. 2013. Improvement of somatic embryogenesis and plantlet conversion in *Oplopanax elatus*, an endangered medicinal woody plant. *SpringerPlus*, 2: 1-8.
- Moreira, M. A., Carvalho, J. G. D., Pasqual, M., Fráguas, C. B. e Silva, A. B. D. 2006. Efeito de substratos na aclimatização de mudas micropropagadas de abacaxizeiro cv. Pérola. *Ciência e Agrotecnologia*, 30: 875-879.
- Mosquera-Sánchez, L. P., Riaño-Herrera, N. M., Arcila-Pulgarín, J. y Ponce-Dávila, C. A. 1999. Fotosíntesis, respiración y fotorrespiración en hojas de café *Coffea* sp. *Cenicafé*, 50: 215-221.
- Muilu-Mäkelä, R., Vuosku, J., Hamberg, L., Latva-MÄenpää, H., Häggman, H. and Sarjala, T. 2015. Osmotic stress affects polyamine homeostasis and phenolic content in proembryogenic liquid cell cultures of Scots pine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 122: 709-726.
- Murashige T. and Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- NCBI. 2018. National Center for Biotechnology Information. En línea: “<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>” Consultado el 25 de diciembre de 2018.

- Nic-Can, G. I., Galaz-Ávalos, R. M., De-La-Peña, C., Alcazar-Magaña, A., Wrobel, K. and Loyola-Vargas, V. M. 2015. Somatic embryogenesis: Identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. *PLoS One*, 1: e0126414.
- Nunes-Nesi, A., Fernie, A. R. and Stitt, M. 2010. Metabolic and signaling aspects underpinning the regulation of plant carbon nitrogen interactions. *Molecular Plant*, 3: 973-996.
- Pádua, M. S., Paiva, L. V., Silva, L. C. D., Livramento, K. G. D., Alves, E. and Castro, A. H. F. 2014. Morphological characteristics and cell viability of coffee plants calli. *Ciência Rural*, 44: 660-665.
- Pais, M. S. 2019. Somatic embryogenesis induction in woody species. The future after omics data assessment. *Frontiers in Plant Science*, 10: 240.
- Pamulaparthi, A., Banala, M. and Nanna, R. S. 2016. Plant regeneration via somatic embryogenesis in an ethnomedicinal plant *Senna alata* (L.) Roxb. *Biotechnology Journal International*, 15: 1-8.
- Parry, M. A., Reynolds, M., Salvucci, M. E., Raines, C., Andralojc, P. J., Zhu, X.-G., Price, G. D., Condon, A. G., and Furbank, R. T. 2010. Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *Journal of Experimental Botany* 62: 453-467.
- Partelli, F. L., Vieira, H. D., Viana, A. P., Batista-Santos, P., Rodrigues, A. P., Leitão, A. E. and Ramalho, J. C. 2009. Low temperature impact on photosynthetic parameters of coffee genotypes. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 44: 1404-1415.
- Pasternak, T. P., Prinsen, E., Ayaydin, F., Miskolczi, P., Potters, G., Asard, H., Van Onckelen, H. A., Dudits, D. and Fehér, A. 2002. The role of auxin, pH, and stress in the activation of embryogenic cell division in leaf protoplast-derived cells of alfalfa. *Plant Physiology*, 129: 1807-1819.
- Pérez-Jiménez, M., Canero-Navarro, E., Pérez-Alfocea, F., Le-Disquet, I., Guivarch, A. and Coster, J. 2014. Relationship between endogenous hormonal content and somatic organogenesis in callus of peach (*Prunus persica* L. Batsch) cultivars and *Prunus persica* × *Prunus dulcis* rootstocks. *Journal of Plant Physiology*, 171: 619-624.

- Pescador, R., Kerbauy, G. B., Kraus, J. E., De Melo Ferreira, W., Guerra, M. P. and Rita de Cássia, L. 2008. Changes in soluble carbohydrates and starch amounts during somatic and zygotic embryogenesis of *Acca sellowiana* (Myrtaceae). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 44: 289-299.
- Pila, Q., Liliana Alexandra, Schuabb Heringer, A., Pacheco De Freitas Fraga, H., Do Nascimento Vieira, L., Silveira, V., Steinmacher, D. A. and Guerra, M. P. 2018. Insights into the conversion potential of *Theobroma cacao* L. somatic embryos using quantitative proteomic analysis. *Scientia Horticulturae*, 229: 65-76.
- Pinheiro, C. and Chaves, M. 2010. Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data? *Journal of Experimental Botany*, 62: 869-882.
- Pinker, I. and Wernicke M. 2017. Development, maturation and conversion of somatic embryos of *Actaea racemosa* L. *Acta Horticulturae*, 1155: 135-140.
- Posada-Pérez, L., Montesinos, Y. P., Guerra, D. G., Daniels, D. and Gómez-Kosky, R. 2017. Complete germination of papaya (*Carica papaya* L. cv. Maradol Roja) somatic embryos using temporary immersion system type RITA® and phloroglucinol in semi-solid culture medium. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 53: 505-513.
- Pratelli R., and Pilot G. 2014. Regulation of amino acid metabolic enzymes and transporters in plants. *Journal of Experimental Botany*, 1: 1-22.
- Puerta, G. 2013. La humedad controlada del grano preserva la calidad del café. *Cenicafé*, 352: 1-8.
- Pullman, G. S. and Johnson, S. 2009. Somatic embryogenesis in loblolly pine (*Pinus taeda* L.): improving culture initiation rates. *Annals of Forest Science*, 59: 663-668.
- Quiroz-Figueroa, F., Fuentes-Cerda, C., Rojas-Herrera, R. and Loyola-Vargas, V. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20: 1141-1149.
- Radice S. 2010. Morfogénesis. In: Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Hopp E. y Mroginski, L. (eds). "Biotecnología y Mejoramiento vegetal II". Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina, pp: 26-34.



- Rai, M. K., Akhtar, N. and Jaiswal, V. 2007. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Scientia Horticulturae*, 113: 129-133.
- Rai, M. K., Jaiswal, V. and Jaiswal, U. 2009. Effect of selected amino acids and polyethylene glycol on maturation and germination of somatic embryos of guava (*Psidium guajava* L.). *Scientia Horticulturae*, 121: 233-236.
- Rai, M. K., Kalia, R. K., Singh, R., Gangola, M. P. and Dhawan, A. 2011. Developing stress tolerant plants through *in vitro* selection an overview of the recent progress. *Environmental and Experimental Botany*, 71: 89-98.
- Ramalho, J. C., DaMatta, F. M., Rodrigues, A. P., Scotti-Campos, P., Pais, I., Batista-Santos, P., Partelli, F. L., Ribeiro, A., Lidon, F. C., Leitão, A. E. 2014. Cold impact and acclimation response of *Coffea* spp. plants. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 26: 5–18.
- Renard, H. M-C. y Larroa, T. R. M. 2017. Política pública y sustentabilidad de los territorios cafetaleros en tiempos de roya: Chiapas y Veracruz. *Estudios Latinoamericanos, Nueva Época*, 40: 95-113.
- Renard, H., M-C., y Larroa, T. R. M., 2017. Política pública y sustentabilidad de los territorios cafetaleros en tiempos de roya: Chiapas y Veracruz. *Estudios Latinoamericanos, Nueva Época*, 40: 95-113.
- Ribas, A. F., Dechamp, E., Champion, A., Bertrand, B., Combes, M.-C., Verdeil, J.-L., Lapeyre, F., Lashermes, P. and Etienne, H. 2011. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biology*, 11: 1-15.
- Robichaud, R. L., Lessard, V. C. and Merkle, S. A. 2004. Treatments affecting maturation and germination of American chestnut somatic embryos. *Journal of Plant Physiology*, 161: 957-969.
- Rode, C., Lindhorst, K. Braun, H., and Winkelmann, T. 2012. From callus to embryo: a proteomic view on the development and maturation of somatic embryos in *Cyclamen persicum*. *Planta*: 235: 995–1011.

- Rodrigues, W. P., Silva, J. R., Ferreira, L. S., Machado Filho, J. A., Figueiredo, F. A., Ferraz, T. M., Bernado, W. P., Bezerra, L. B., De Abreu, D. P. and Cespom, L. 2018. Stomatal and photochemical limitations of photosynthesis in coffee (*Coffea* spp.) plants subjected to elevated temperatures. *Crop and Pasture Science*, 69: 317-325.
- Rolland, F., Moore, B., and Sheen, J. 2002. Sugar Sensing and Signaling in Plants. *Plant Cell*, 14: 185-205.
- Rose, R. J. 2004. Somatic embryogenesis in plants. In: Goodman R. M. (ed) Encyclopedia of plant and crop science. Marcel Dekker, New York, pp: 1165–1168.
- Rose, R. J. 2019. Somatic embryogenesis in the *Medicago truncatula* model: cellular and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 10: 1-14.
- Rudiyanto, R., Efendi, D. and Ermayanti, T. M. Somatic embryo germination of *Jatropha curcas* L in presence of sucrose and poly ethylene glycol (PEG). *Annales Bogorienses*, 18: 35-43.
- Ruduś, I., Weiler, E. W. and Kępczyńska, E. 2009. Do stress-related phytohormones, abscisic acid and jasmonic acid play a role in the regulation of *Medicago sativa* L. somatic embryogenesis? *Plant Growth Regulation*, 59: 159-169.
- Sadeghian K. 2008. Fertilidad del suelo y nutrición del café en Colombia. *Cenicafé*, Colombia, 44 p.
- Sadeghian S., y O. González. 2014. Respuesta de almácigos de café a diferentes fuentes y dosis de nitrógeno. *Cenicafé*, Colombia, 447: 1-4.
- SAGARPA. 2015. Convención internacional del Café. México, 22 p. En línea: “<https://www.gob.mx/siap/convencion-internacional-del-cafe-mexico-2015/>” Consultado el 15 de abril de 2017.
- SAGARPA. 2017a. Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. México, 15 p. En línea: “[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B\\_sico-Caf\\_.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/256426/B_sico-Caf_.pdf)” Consultado el 1 de diciembre de 2017.
- SAGARPA. 2017b. Sanidad vegetal. Estrategia operativa contra la broca del café, México, 8 p. En línea: “[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/176916/Estrategia\\_Operativa\\_Broca\\_2017.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/176916/Estrategia_Operativa_Broca_2017.pdf)” Consultado el 15 de enero de 2018.

- Sama, A. E., Shahba, M. A., Hughes, H. G. and Abbas, M. S. 2015. Comparative growth analysis and acclimatization of tissue culture derived cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium* L. Schott) plantlets. *American Journal of Experimental Agriculture*, 5: 94-108.
- Samson, N. P., Campa, C., Le Gal, L., Noirot, M., Thomas, G., Lokeswari, T. and De Kochko, A. 2006. Effect of primary culture medium composition on high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 37-45.
- Sánchez, M. C., Martínez, M. T., Valladares, S., Ferro, E. and Viéitez, A. M. 2003. Maturation and germination of oak somatic embryos originated from leaf and stem explants: RAPD markers for genetic analysis of regenerants. *Journal of Plant Physiology*, 160: 699-707.
- Sghaier-Hammami, B., Jorrín-Novo, J. V., GargourI-Bouzid, R. and Drira, N. 2010. Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. *Phytochemistry*, 71: 1223-1236.
- Shahsavari, E. 2011. Contribution of sorbitol on regeneration of embryogenic calli in upland rice. *International Journal of Agriculture and Biology*, 13: 838-840.
- Sharp, W. R., Caldas, L. S., Crocomo, O. J. 1973. Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. *Phyto*, 31: 67-74.
- Shewry, P. R. and Halford, N. G. 2002. Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany*, 53: 947-958.
- Shi, X., Dai, X., Liu, G. and Bao, M. 2009. Enhancement of somatic embryogenesis in camphor tree (*Cinnamomum camphora* L.): osmotic stress and other factors affecting somatic embryo formation on hormone-free medium. *Trees*, 23: 1033-1042.
- SIAP. 2019. Avance de siembras y Cosechas Resumen nacional por cultivo, Perenes. México. En línea: "[http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do)" Consultado el 26 de julio de 2019.
- Silva, A. T., Barduche, D., Do Livramento, K. G., Ligterink, W. and Paiva, L. V. 2014. Characterization of a putative serk-like ortholog in embryogenic cell suspension cultures of *Coffea arabica* L. *Plant Molecular Biology Reporter*, 32: 176-184.

- Singh, R., Kumar, M. R., and Kumari, N. 2015. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Sapindus mukorossi* Gaertn. from leaf-derived callus induced with 6-benzylaminopurine. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 177: 498-510.
- Souza, J. M. M., Tomaz, M. L., Arruda, S. C. C., Demétrio, C. G. B., Venables, W. N., and Martinelli, A. P. 2011. Callus sieving is effective in improving synchronization and frequency of somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*. *Biologia Plantarum* 55: 703-707.
- Srinivas, L., Ganapathi, T., Suprasanna, P. and Bapat, V. 2006. Desiccation and ABA treatment improves conversion of somatic embryos to plantlets in banana (*Musa* spp.) cv. Rasthali (AAB). *Indian Journal of Biotechnology* 5: 521-526.
- Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus cultures of coffee. *Acta Botanica Neerlandica* 19: 509-514.
- Stasolla, C. and Yeung, E. C. 2003. Recent advances in conifer somatic embryogenesis: improving somatic embryo quality. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 74: 15-35.
- Stasolla, C., Kong, L., Yeung, E. C. and Thorpe, T. A. 2002. Maturation of somatic embryos in conifers: Morphogenesis, physiology, biochemistry, and molecular biology. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38: 93-105.
- Stasolla, C., Van Zyl, L., Egertsdotter, U., Craig, D., Liu, W. and Sederoff, R. R. 2003. The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology*, 131: 49-60.
- Steiger, D., Nagai, C., Moore, P., Morden, C., Osgood, R. and Ming, R. 2002. AFLP analysis of genetic diversity within and among *Coffea arabica* cultivars. *Theoretical and Applied Genetics*, 105: 209-215.
- Stuart, D. A. and Strickland, S. G. 1984. Somatic embryogenesis from cell cultures of *Medicago sativa* L. the role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Science Letters*, 34: 165-174.
- Su, Y. H., Zhao, X. Y., Liu, Y. B., Zhang, C. L., O'Neill, S. D. and Zhang, X. S. 2009. Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 59: 448-460.

- Taiz, L. and Zeiger, E. 2010. Plant physiology 5th Ed. *Sinauer Associates. Sunderland, MA*, 782 p.
- Taji, A., Kumar, P. P. and Lakshmanan, P. 2002. *In vitro* plant breeding. Haworth Press, Inc., USA. 167 p.
- Taugourdeau, S., Le Maire, G., Avelino, J., Jones, J. R., Ramirez, L. G., Quesada, M. J., Charbonnier, F., Gómez-Delgado, F., Harmand, J.-M. and Rapidel, B. 2014. Leaf area index as an indicator of ecosystem services and management practices: An application for coffee agroforestry. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 192: 19-37.
- Teketay, D. 1999. History, botany and ecological requirements of coffee. *Walia*, 20: 28-50.
- Thomas, T. D. 2006. Effect of sugars, gibberellic acid and abscisic acid on somatic embryogenesis in *Tylophora indica* (Burm. f.) Merrill. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22: 465-471.
- Tonon, G., Berardi, G., Rossi, C., and Bagnaresi, U. 2001. Synchronized somatic embryo development in embryogenic suspensions of *Fraxinus angustifolia*. *In vitro Cellular & Developmental Biology- Plant* 37: 462-465.
- Traore, A. and Gultinan, M. J. 2006. Effects of carbon source and explant type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes. *HortScience*, 41: 753-758.
- Troch, V., Werbrouck, S, Geelen, D, and Van Labeke, M. C. 2009. Optimization of horse chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) somatic embryo conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 98: 115-123.
- Unigarro-Muñoz, C. A., Hernández-Arredondo, J. D., Montoya-Restrepo, E. C., Medina-Rivera, R. D., Ibarra-Ruales, L. N., Carmona-González, C. Y., and Flórez-Ramos, C. P. 2015. Estimation of leaf area in coffee leaves (*Coffea arabica* L.) of the Castillo variety. *Bragantia, Campinas*, 74: 412-416.
- USDA. 2018. Coffee Plan on Track to Achieve Goals. 10 p. En línea: [https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual\\_Mexico%20City\\_Mexico\\_5-15-2018.pdf](https://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-15-2018.pdf) Consultado el 18 de enero de 2019.

- Vahdati, K., Bayat, S., Ebrahimzadeh, H., Jariteh, M. and Mirmasoumi, M. 2008. Effect of exogenous ABA on somatic embryo maturation and germination in Persian walnut (*Juglans regia L.*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 93: 163-171.
- Vale, E. D. M., Heringer, A. S., Barroso, T., Ferreira, A. T. D. S., Da Costa, M. N., Perales, J. E. A., Santa-Catarina, C. and Silveira, V. 2014. Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya L.* *Proteome Science*, 12: 1-17.
- Van Boxtel, J. and Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44: 7-17.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. and Filonova, L. 2002. Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69: 233-249.
- Vondráková Z., J. Krajňáková, L. Fischerová, M. Vágner, K. Eliášová. 2016. Physiology and role of plant growth regulators in somatic embryogenesis. In: Park, Y., Bonga, J., and Moon H. (eds.). *Vegetative Propagation of Forest Trees*. National Institute of Forest Science (NIFoS). Seoul, Korea. pp: 123-169.
- Vondráková, Z., Eliášová, K., Fischerová, L. and Vágner, M. 2011. The role of auxins in somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Central European Journal of Biology*, 6: 587-596.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. and Foolad, M. R. 2007. Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany*, 61: 199-223.
- Walker, D. R. and Parrott, W. A. 2001. Effect of polyethylene glycol and sugar alcohols on soybean somatic embryo germination and conversion. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 64: 55-62.
- Wang, H.-L., Lee, P.-D., Liu, L.-F. and Su, J.-C. 1999. Effect of sorbitol induced osmotic stress on the changes of carbohydrate and free amino acid pools in sweet potato cell suspension cultures. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 40: 219-225.
- Widoretno, W., Indriyani, S., Martasari, C. and Hakin, R. 2016. Effects of sugar type and concentration on Batu 55 Mandarin (*Citrus reticulata* Blanco.) somatic embryo maturation. *Agrivita, Journal of Agricultural Science*, 39: 100-110.

- Williams, L. and Martinson, T. E. 2003. Nondestructive leaf area estimation of ‘Niagara’ and ‘DeChaunac’ grapevines. *Scientia Horticulturae*, 98: 493-498.
- Winkelmann, T. 2016. Somatic versus zygotic embryogenesis: learning from seeds. In: Germana M. A. and Lambardi M. (eds). *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Springer. pp: 25-46.
- Winkelmann, T. Heintz, D., Van Dorsselaer, A., Serek, M. and Braun, H. P., 2006. Proteomic analyses of somatic and zygotic embryos of *Cyclamen persicum* Mill. reveal new insights into seed and germination physiology, *Planta*. 224: 508–519.
- Winter, H. and Huber, S. C. 2000. Regulation of sucrose metabolism in higher plants: localization and regulation of activity of key enzymes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 19: 31-67.
- Wise, M. J. and Tunnacliffe, A. 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 9: 13-17.
- Wobus, U. and Weber, H. 1999. Sugars as signal molecules in plant seed development. *Biological Chemistry*, 380: 937-944.
- Xu, W., Liu, C., Wang, K., Xie, R., Ming, B., Wang, Y., Zhang, G., Liu, G., Zhao, R. and Fan, P. 2017. Adjusting maize plant density to different climatic conditions across a large longitudinal distance in China. *Field Crops Research*, 212: 126-134.
- Xu, Z., Zhang, C., Zhang, X., Liu, C., Wu, Z., Yang, Z., Zhou, K., Yang, X. and LI, F. 2013. Transcriptome profiling reveals auxin and cytokinin regulating somatic embryogenesis in different sister lines of cotton cultivar CCRI24. *Journal of integrative plant biology*, 55: 631-642.
- Yadollahi, A., Abdollahi, M., Moieni, A. and Danaee, M. 2011. Effects of carbon source, polyethylene glycol and abscisic acid on secondary embryo induction and maturation in rapeseed (*Brassica napus* L.) microspore-derived embryos. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33: 1905-1912.
- Yang, X., Zhang, X., Yuan, D., Jin, F., Zhang, Y. and Xu, J. 2012. Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in

- dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC Plant Biology*, 12: 1-19.
- Yasuda, T., Y. Fujii, and T. Yamaguchi. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine, *Plant Cell Physiol.* 26: 595-597.
- Zamarripa, A. 1993. Study and Development of Somatic Embryogenesis in Liquid Medium of Coffee. Tesis de Doctorado, Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Rennes, Francia 191.
- Zapata, A., P. C., Andrade C. H. J. and Nieto Abril, Z. K. 2017. Comportamiento ecofisiológico del cafeto (*Coffea arabica* L.) CV. Castillo en sistemas agroforestales de Tibacuy, Cundinamarca. *Revista UDCA Actualidad & Divulgación Científica*, 20: 61-70.
- Zavattieri, M. A., Frederico, A. M., Lima, M., Sabino, R. and Arnholdt-Schmitt, B. 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*, 13: 12-13.
- Ziv M. and J. Chen, J. The anatomy and morphology of tissue culture plants. 2008. In: George, E. F., M. A. Hall. And De Klerk G-J (eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition*. Springer. Dordrecht, Holanda. 501 pag.
- Zobayed, S., Afreen, F., Kubota, C. and Kozai, T. 2000. Water control and survival of *Ipomoea batatas* grown photoautotrophically under forced ventilation and photomixotrophically under natural ventilation. *Annals of Botany*, 86: 603-610.