



MADURACIÓN Y GERMINACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DE *Coffea arabica* CV. COLOMBIA

MATURATION AND GERMINATION OF SOMATIC EMBRYOS OF *Coffea arabica* CV. COLOMBIA

Enrique Riviello-Cogco¹, Alejandrina Robledo-Paz^{1*}, María A. Gutiérrez-Espinosa¹, Javier Suárez-Espinosa² y José Oscar Mascorro-Gallardo³

¹Colegio de Postgraduados (CP), Campus Montecillo, Posgrado en Recursos Genéticos y Productividad, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ²CP, Campus Montecillo, Posgrado en Socioeconomía, Estadística e Informática, Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. ³Universidad Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia, Chapingo, Texcoco, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia (arobledo@colpos.mx)

RESUMEN

La variedad de café Colombia (*Coffea arabica* L.) tiene alta resistencia a la roya y buenas características de producción y calidad de taza. Diversos protocolos para la propagación de café mediante embriogénesis somática han sido desarrollados; sin embargo, la tasa de maduración, germinación y conversión es baja. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de reguladores del crecimiento y agentes osmóticos en la maduración y germinación de embriones somáticos de café y evaluar, en condiciones *ex vitro*, las características fisiológicas de las plantas regeneradas. Para su maduración, embriones globulares y torpedo temprano se cultivaron en un medio Yasuda *et al.* (1985) con distintas concentraciones de ácido abscísico (ABA) (2-4 mg L⁻¹), ácido salicílico (ASA) (1.38 g L⁻¹), ácido giberélico (AG₃) (0.7-1.0 mg L⁻¹), ácido indolacético (AIA) (0.3-0.5 mg L⁻¹), polietilenglicol 8000 (PEG 8000) (50-75 g L⁻¹) o sacarosa (50-80 g L⁻¹). Para su germinación, los embriones maduros fueron transferidos a un medio con 0.25 mg L⁻¹ de AIA y 0.25 mg L⁻¹ de 6-bencilaminopurina (BAP). Las plantas se aclimataron y crecieron en perlita:turba:tezontle (1:1:1) o turba:tezontle (2:1) en condiciones de invernadero. El valor máximo de maduración y germinación de los embriones globulares se observó al adicionar 50 g L⁻¹ de sacarosa al medio (81.7 y 53.9 %, respectivamente). Para los embriones torpedo temprano el porcentaje de maduración más alto se registró con 80 g L⁻¹ de sacarosa (19.2 %) o una combinación de 1.0 mg L⁻¹ de AG₃ y 0.5 mg L⁻¹ de AIA (45.0 %); sin embargo, los porcentajes de germinación no fueron significativamente distintos del testigo. El potencial osmótico de los embriones no estuvo directamente relacionado con su grado de madurez. La totalidad de las plantas cultivadas en las mezclas de sustratos sobrevivieron y mostraron ser morfológica y fisiológicamente normales bajo condiciones *ex vitro*.

Palabras clave: *Coffea arabica*, embriogénesis somática, germinación, maduración, osmóticos, reguladores de crecimiento.

SUMMARY

The Colombia coffee variety (*Coffea arabica* L.) has high resistance to rust and good production characteristics and cup quality. Several protocols have been developed for the propagation of coffee by somatic embryogenesis; however, the rate of maturation, germination and conversion is low. The objective of this study was to determine the effect of growth regulators and osmotic agents on the maturation and germination of coffee somatic embryos and to evaluate, under *ex vitro* conditions, the physiological characteristics of the regenerated plants. For maturation, globular and early torpedo embryos were cultured on a Yasuda *et al.* (1985) medium with different

concentrations of abscisic acid (ABA) (2-4 mg L⁻¹), salicylic acid (SA) (1.38 g L⁻¹), gibberellic acid (GA₃) (0.7-1.0 mg L⁻¹), indoleacetic acid (IAA) (0.3-0.5 mg L⁻¹), polyethylene glycol 8000 (PEG 8000) (50-75 g L⁻¹) or sucrose (50-80 g L⁻¹). For germination, the mature embryos were transferred into a medium with 0.25 mg L⁻¹ of IAA and 0.25 mg L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (BAP). The plants were acclimatized and grown on perlite:peat:volcanic rock (1:1:1) or peat:volcanic rock (2:1) under greenhouse conditions. The maximum value of maturation and germination of globular embryos was observed when 50 g L⁻¹ of sucrose were added to the medium (81.7 and 53.9 %, respectively). For early torpedo embryos, the highest percentage of maturation was recorded with 80 g L⁻¹ of sucrose (19.2 %) or a combination of 1.0 mg L⁻¹ GA₃ and 0.5 mg L⁻¹ of IAA (45.0 %); however, the germination percentages were not significantly different from the control. The osmotic potential of the embryos was not directly related to their degree of maturity. All the plants grown on the substrate mixtures survived and were morphologically and physiologically normal under *ex vitro* conditions.

Index words: *Coffea arabica*, germination, growth regulators, maturation, osmotic, somatic embryogenesis.

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es un cultivo estratégico para México, ya que genera más de tres millones de empleos y representa 0.66 % del PIB agrícola nacional (SAGARPA, 2017). La superficie cultivada con este grano es de aproximadamente 680,120 hectáreas, siendo Chiapas (35.5 %), Veracruz (21.2 %), Oaxaca (17.8 %) y Puebla (10.2 %) los principales estados productores (SIAP, 2020). 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 las plantaciones, afectaciones climatológicas, 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, lo que no sólo tuvo un efecto negativo en el costo de producción sino también en el ambiente (Renard y Larroa, 2017), es por ello que el gobierno mexicano implementó programas para aumentar la productividad del sector cafetalero creando viveros certificados para suministrar a los productores plantas de calidad resistentes a dicha enfermedad. La meta es renovar 250 mil hectáreas, para lo cual se requerirán 750 millones de plantas (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 de plantas que se tiene para llevar a cabo dicha renovación (Kumar *et al.*, 2006).

El cultivo de tejidos mediante la embriogénesis somática ha permitido la propagación a gran escala de distintas especies vegetales (Campos *et al.*, 2017). Diversos protocolos para la propagación de café han sido desarrollados mediante embriogénesis somática (Aga y Khillare, 2017; Etienne *et al.* 2013; 2018; Georget *et al.*, 2017; Kahia *et al.*, 2016; Montes-Cruz *et al.*, 2017); no obstante, la baja tasa de maduración, germinación y conversión de los embriones en plantas son algunos de los factores que limitan su aplicación en los programas de producción y mejoramiento de café (Rezende *et al.*, 2011).

Si bien existen numerosos trabajos sobre embriogénesis somática en el género *Coffea*, pocos se han centrado en mejorar la maduración de los embriones. Reguladores de crecimiento y osmóticos han sido utilizados para promover la maduración de los embriones somáticos de café y otras especies. Al respecto, Pereira *et al.* (2007) reportaron incremento en el porcentaje de maduración de embriones somáticos de *C. arabica* var. Acaíá cuando adicionaron ácido giberélico (AG_3) al medio de cultivo, en tanto que en *C. canephora* var. Robusta, hubo mejora en la maduración de los embriones en presencia de ácido abscísico (ABA) o una combinación de bencilaminopurina (BAP) y sacarosa (Etienne, 2005; González *et al.*, 2000). Altas concentraciones de sacarosa en el medio (50 a 90 g L⁻¹) también incrementaron la tasa de maduración de embriones somáticos de *Juglans regia* y *Picea abies* (Businge *et al.*, 2013; Hazubska-Przybyl *et al.*, 2016; Vahdati *et al.*, 2008); asimismo, la adición de agentes osmóticos como polietilenglicol (PEG) al medio de cultivo mejoró la maduración de embriones somáticos de *Leucosium aestivum*, *P. abies* y *Carica papaya* (Businge *et*

al., 2013; Ptak *et al.*, 2013; Vale *et al.*, 2014). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de reguladores del crecimiento y agentes osmóticos en la maduración y germinación de embriones somáticos de café var. Colombia y evaluar en condiciones *ex vitro* las características fisiológicas de las plantas regeneradas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Inducción de la embriogénesis somática

La inducción y diferenciación de embriones somáticos se llevó a cabo siguiendo el protocolo reportado por Avila-Victor *et al.* (2018). Segmentos de 1 cm² de hojas previamente desinfectadas se cultivaron durante dos meses en un medio que contenía las sales del medio de Murashige y Skoog (1962) (MS), 0.5 mg L⁻¹ de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 1.1 mg L⁻¹ de BAP, 100 mg L⁻¹ de ácido cítrico, 200 mg L⁻¹ de ácido ascórbico, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 5.2 g L⁻¹ de Phytigel. Los callos generados se transfirieron a un medio elaborado con las sales del medio reportado por Yasuda *et al.* (1985) modificadas, 1.1 mg L⁻¹ de BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa. El pH de los medios se ajustó a 5.7 o 6.3 y fueron esterilizados durante 15 min en autoclave a 121 °C. Luego de cuatro meses, los embriones en etapa globular y torpedo temprano fueron colectados para su maduración (Figura 1 A).

Maduración de los embriones somáticos

Los embriones somáticos en etapa globular se cultivaron durante 40 días en cajas Petri de 60 × 15 mm que contenían 15 mL de medio formulado con las sales de Yasuda *et al.* (1985) modificadas, 0.2 mg L⁻¹ de BAP, 0.2 mg L⁻¹ de ácido indolacético (AIA), 30 g L⁻¹ de sacarosa, 2.3 g L⁻¹ de Phytigel, además de ácido abscísico (ABA) (2, 3 y 4 mg L⁻¹), polietilenglicol 8000 (PEG 8000) (50 y 75 g L⁻¹), 1.38 g L⁻¹ de ácido salicílico (ASA) o sacarosa (30, 50, 60 y 80 g L⁻¹) (Figura 1 B).

Para evaluar la maduración a partir de embriones en etapa torpedo temprano se realizaron dos experimentos; en el primero, los embriones se cultivaron durante 40 d en cajas Petri con 15 mL de los mismos medios utilizados para embriones globulares, con excepción de los que contenían 50 y 60 g L⁻¹ de sacarosa (Figura 1C). En el segundo experimento, los embriones torpedo fueron colocados en cajas Petri con medio Yasuda más 2.3 g L⁻¹ de Phytigel, 30 g L⁻¹ de sacarosa y dos combinaciones de reguladores de crecimiento: 1) 0.7 mg L⁻¹ de AG_3 y 0.3 mg L⁻¹ de AIA, y 2) 1.0 mg L⁻¹ de AG_3 y 0.5 mg L⁻¹ de AIA; ambos experimentos fueron comparados con un testigo que contenía un medio basal Yasuda con 0.2 mg L⁻¹ de BAP, 0.2 mg L⁻¹ de AIA y 30 g L⁻¹ 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 (intensidad lumínica de $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Después de 40 días se evaluó el número de embriones que alcanzaron la etapa torpedo tardío o cotiledonar (embriones maduros); además, se midió el potencial osmótico de los mismos debido a que reportes previos (Márquez-Martín *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2017) relacionaron la disminución del potencial osmótico de los

embriones con su maduración. Para evaluar esta variable, embriones maduros se depositaron en tubos Eppendorf y luego en nitrógeno líquido para extraer el contenido líquido intracelular, el cual fue colocado en un osmómetro Vapro (Wescor Vapor Pressure Osmometer 5520, Champaign, Illinois, EUA). La evaluación del potencial osmótico se basó en cuatro repeticiones por tratamiento, siendo una repetición un tubo con diferente número de embriones. No fue posible determinar el potencial osmótico de los embriones globulares correspondientes a los tratamientos

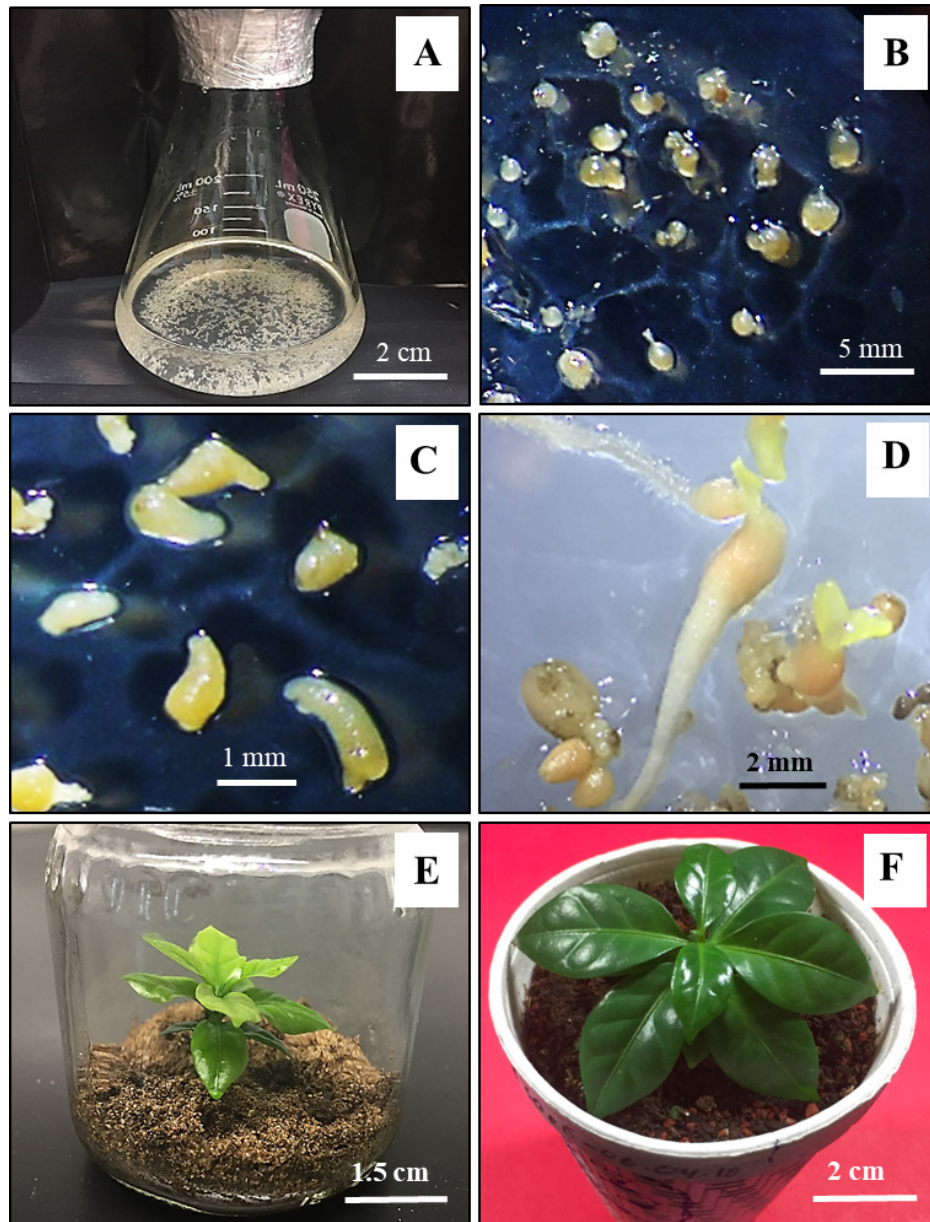


Figura 1. Embriogénesis somática indirecta en *C. arabica* var. Colombia. A) formación de embriones somáticos a partir de callos embriogénicos, B) embriones somáticos en etapa globular, C) embriones somáticos en etapa torpedo temprano, D) germinación de un embrión proveniente de un medio de maduración con 50 g L^{-1} de sacarosa, E) conversión *in vitro* de una plántula de café en sustrato vermiculita:perlita, F) planta de café después de 90 días de cultivo en invernadero.

con 50 y 60 g L⁻¹ de sacarosa, así como el de los embriones torpedo temprano del segundo experimento, debido a que no se disponía de un número suficiente de éstos.

Germinación de embriones somáticos

Sólo los embriones que lograron madurar en los tratamientos de maduración fueron cultivados en viales de cristal con 7 mL de medio de germinación líquido elaborado con las sales basales de Yasuda modificadas, y suplementado con 0.25 mg L⁻¹ de AIA, 0.25 mg L⁻¹ de BAP y 30 g L⁻¹ de sacarosa, ajustando el pH del medio 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 y 16 h de luz (intensidad lumínica de 80 µmol m⁻² s⁻¹). Después de 60 días se determinó el número de embriones somáticos germinados (embriones con protrusión de la radícula y cotiledones extendidos) con respecto al número de embriones que alcanzaron la madurez (Germinación M) y en relación con número inicial de embriones cultivados en los medios de maduración (Germinación I). Los embriones que germinaron se colocaron en frascos con 30 mL de una mezcla de vermiculita y perlita (3:1), con tamaño de partícula de 0.25 mm esterilizada durante 40 min a 121 °C para promover su conversión; a la mezcla se agregaron 15 mL de medio de cultivo MS líquido al 50 % y 20 g L⁻¹ de sacarosa, sin reguladores de crecimiento.

Aclimatación y crecimiento de plantas

Cuando las plantas alcanzaron 2 cm de longitud y al menos 3 pares de hojas fueron transferidas a vasos de poliestireno de 250 mL con dos mezclas de sustratos: 1) perlita-turba-tezontle (1:1:1) y 2) turba-tezontle (2:1). Los vasos se llevaron al invernadero y se cubrieron con bolsas de plástico, las cuales fueron retiradas después de 15 días. Las plantas se regaron cada tres días con solución Steiner (1984) al 25 %. Después de 90 días se evaluó la supervivencia, tamaño de plúmula y número de hojas. Para determinar el comportamiento de las plantas regeneradas en condiciones *ex vitro* después de 110 d de cultivo se evaluaron las siguientes variables fisiológicas: área foliar (Antunes *et al.*, 2008), tasa instantánea de fotosíntesis (A), conductancia estomática (gs), transpiración (E) y concentración interna de CO₂ (Ci) con ayuda de un analizador de gases en infrarrojo IRGA (LICOR-6400 XT Portable Photosynthesis System, Lincoln, Nebraska, EUA).

Diseño experimental y análisis estadístico

En los experimentos de maduración se utilizó un diseño experimental completamente al azar (DECA) con 10 medios de maduración (tratamientos) para los embriones globulares y 6 repeticiones (una caja con 30 embriones);

8 medios de maduración para embriones torpedo del primer experimento con 6 repeticiones (una caja con 20 embriones) y 3 medios de maduración para los torpedo del segundo experimento con 6 repeticiones (una caja con 10 embriones). Para la germinación se empleó un DECA desbalanceado con 9 medios de maduración para los embriones globulares, 2 medios de maduración para los embriones torpedo del primer experimento y 2 medios para los torpedo del segundo experimento. Todos los experimentos tuvieron diferente número de repeticiones por tratamiento, siendo una repetición un vial con diferente número de embriones maduros. En las fases de maduración y germinación el análisis de los datos se hizo con regresión logística y la comparación de medias mediante la prueba de LSMeans (0.05) mediante el paquete estadístico SAS versión 9.5 (SAS Institute, 2002). Para la variable potencial osmótico el análisis se llevó a cabo mediante ANOVA y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey (P ≤ 0.05), mientras que para la fase de aclimatación se usó un DECA con dos sustratos y cuatro repeticiones considerando una planta como una repetición. El análisis de los datos se hizo mediante la prueba *t* de Student.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de reguladores de crecimiento y osmóticos en la maduración de los embriones somáticos

Durante la maduración, los embriones somáticos sufren cambios morfológicos y bioquímicos, como el aumento en la talla y la deposición de sustancias de reserva, esenciales para su posterior desarrollo, germinación y conversión en plantas fotoautótrofas (Aslam *et al.*, 2011; Etienne, 2005; Márquez-Martín *et al.*, 2011).

Los resultados obtenidos en la presente investigación mostraron que el porcentaje de maduración de los embriones globulares cultivados en el medio con 2, 3 o 4 mg L⁻¹ de ABA estuvo por debajo (6.7-11.7 %) de lo observado en el testigo (19.4 %) (Cuadro 1); asimismo, los embriones globulares expuestos a PEG no mostraron porcentajes de maduración significativamente mejores (21.7-25.6 %) que el testigo (Cuadro 1). Cuando se incluyeron 1.38 g L⁻¹ de ASA en el medio de cultivo, sólo 1.7 % de los embriones lograron madurar; en contraste, 50, 60 u 80 g L⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo incrementaron significativamente (45.9-81.7 %) la maduración de los embriones globulares con respecto al testigo y a los otros tratamientos, siendo los embriones de los tratamientos con sacarosa los que registraron los niveles más altos de maduración (Cuadro 1).

Por otro lado, los embriones torpedo del primer experimento cultivados en las distintas dosis de ABA y

ASA mostraron porcentajes de maduración inferiores (0.8-2.5 %) al testigo (10.0 %), en tanto que el observado en los embriones cultivados en PEG no fue significativamente diferente del testigo. Asimismo, en los embriones torpedo cultivados con 80 g L⁻¹ de sacarosa (19.2 %) se registró un porcentaje de maduración significativamente mayor que en aquellos expuestos a las distintas concentraciones de ABA (2.5 %), ASA (0.8 %) y el testigo (Cuadro 1); en contraste, para los embriones torpedo del segundo experimento, el porcentaje de maduración más alto (45 %) se observó con la combinación de 1.0 mg L⁻¹ de AG₃ y 0.5 mg L⁻¹ de AIA (Cuadro 1).

González *et al.* (2000) encontraron que el adicionar 1 mg L⁻¹ de ABA al medio de cultivo logró generar el mayor porcentaje de maduración (56.1 %) de los embriones somáticos de *C. canephora* var. Robusta; por otro lado, en *C. papaya*, Kalam *et al.* (2012) observaron que el mayor porcentaje de maduración y acumulación de materia seca se registró cuando los embriones se cultivaron en presencia de 60 g L⁻¹ de PEG 3350; no obstante, algunos autores han reportado que altos niveles de este compuesto (47.0 a 75.0 g L⁻¹) pueden tener un efecto negativo en la maduración al restringir la acumulación de proteínas LEA (Late embryogenesis abundant), sacarosa y almidón (Businge *et al.*, 2013; Tikkinen *et al.*, 2018).

Etienne (2005) utilizó un medio líquido con 0.3 mg L⁻¹ de BAP y 40 g L⁻¹ de sacarosa para inducir la maduración de embriones somáticos de *C. canephora* var. Robusta

y observó que después de ocho semanas 86 % de éstos alcanzaron la madurez. En *Psidium guajava* y *P. dactylifera*, 50 o 90 g L⁻¹ de sacarosa en el medio de cultivo mejoró la maduración de los embriones (Rai *et al.*, 2007; Sghaier-Hammami *et al.*, 2010); asimismo, el incluir 50 o 60 g L⁻¹ de sacarosa en el medio promovió la maduración (60 a 100 %) de los embriones somáticos de *P. abies*, *Sapindus mukorossi*, *Agave angustifolia* y *Crocus vernus* (Kubeš *et al.*, 2014; Reyes-Díaz *et al.*, 2017; Singh *et al.*, 2015; Sivanesan *et al.*, 2012). Se sabe que cuando se incluyen concentraciones altas de sacarosa en los medios de cultivo, ésta entra en los tejidos de los embriones y es hidrolizada por la enzima invertasa-apoplástica, promoviendo la deposición de glucosa, fructosa y almidón en el embrión (Iraqi *et al.*, 2005). Lo anterior hace que la presión osmótica del embrión aumente induciendo la expresión de los genes que codifican a la glutamina-sintetasa y glutamato-sintasa, involucradas en el metabolismo del nitrógeno y la deposición de proteínas de almacenamiento como globulinas, prolaminas y glutelinas, requeridas para que el embrión madure y germine (Bartos *et al.*, 2018; Cangahuala-Inocente *et al.*, 2009; Iraqi y Tremblay, 2001; Kubeš *et al.*, 2014; Montalbán *et al.*, 2010; Shewry y Halford, 2002; Stasolla *et al.*, 2003).

Por otro lado, en *C. arabica* cv. Acaíá, Pereira *et al.* (2007) observaron un incremento en la maduración de los embriones (9-38 embriones maduros) directamente proporcional al aumento en la concentración de AG₃ (2.5-20 mg L⁻¹); asimismo, la maduración de los embriones

Cuadro 1. Porcentaje de embriones maduros globulares y torpedo temprano de *C. arabica* var. Colombia cultivados en distintos tratamientos de maduración durante 40 días.

| Medio de maduración | Embriones globulares | Embriones torpedo (Primer experimento) | Embriones torpedo (Segundo experimento) |
|---|----------------------|--|---|
| Testigo | 19.4 ± 16.0 d | 10.0 ± 12.0 b | 5.0 ± 9.0 b |
| ABA 2 mg L ⁻¹ | 11.7 ± 13.0 e | 2.5 ± 6.0 c | -- |
| ABA 3 mg L ⁻¹ | 6.7 ± 10.0 e | 2.5 ± 6.0 c | -- |
| ABA 4 mg L ⁻¹ | 8.9 ± 12.0 e | 2.5 ± 6.0 c | -- |
| PEG 8000 50 g L ⁻¹ | 25.6 ± 18.0 d | 11.7 ± 13.0 ab | -- |
| PEG 8000 75 g L ⁻¹ | 21.7 ± 17.0 d | 15.8 ± 15.0 ab | -- |
| ASA 1.38 g L ⁻¹ | 1.7 ± 5.0 f | 0.8 ± 4.0 c | -- |
| Sacarosa 50 g L ⁻¹ | 81.7 ± 16.0 a | -- | -- |
| Sacarosa 60 g L ⁻¹ | 67.8 ± 19.0 b | -- | -- |
| Sacarosa 80 g L ⁻¹ | 45.9 ± 20.0 c | 19.2 ± 16.0 a | -- |
| 0.7 mg L ⁻¹ AG ₃ + 0.3 mg L ⁻¹ AIA | -- | -- | 15.0 ± 15.0 b |
| 1.0 mg L ⁻¹ AG ₃ + 0.5 mg L ⁻¹ AIA | -- | -- | 45.0 ± 20.0 a |

Testigo: 30 g L⁻¹ de sacarosa, ABA: ácido absóscico, PEG 8000: polietilenglicol 8000, ASA: ácido salicílico, AIA: ácido indolacético, AG₃: ácido giberélico. Medias (± error estándar) con letras iguales dentro de una columna no son estadísticamente diferentes (LSMeans, P ≤ 0.05).

de *Citrus reticulata* Blanco aumentó (4-6 %) cuando se adicionaron al medio 4 mg L⁻¹ de AG₃ (Firdiana *et al.*, 2015). Por su parte, da Silva *et al.* (2018) registraron 50 % de embriones maduros de *Byrsonima intermedia* al exponerlos a 10 mg L⁻¹ de AG₃.

La diferencia en la respuesta de maduración entre las dos etapas embrionarias evaluadas en *C. arabica* var. Colombia (globular y torpedo) puede ser debida a los tipos de células presentes en los embriones. Quiroz-Figueroa *et al.* (2002) mencionaron que los embriones globulares presentan alta actividad mitótica que permite el crecimiento y desarrollo embrionario, mientras que en embriones torpedo y cotiledonares existen células con un grado de diferenciación mayor. De la misma manera, se ha observado que los niveles de proteínas, carbohidratos y de reguladores de crecimiento endógenos de los embriones en estado globular y torpedo cultivados bajo las mismas condiciones son diferentes, lo cual puede ocasionar una respuesta diferencial a las condiciones de cultivo (Bartos *et al.* 2018). El hecho de que en la presente investigación mayor número de embriones globulares que de embriones torpedo temprano haya alcanzado la madurez indica que es mejor inducir la maduración, desde la etapa globular, reduciendo con ello tiempo, insumos y mano de obra necesarios.

Efecto de reguladores de crecimiento y osmóticos en el potencial osmótico de embriones somáticos

Algunos autores afirman que una disminución del potencial osmótico de los embriones somáticos induce cambios morfológicos y bioquímicos que promueven la maduración (Márquez-Martín *et al.*, 2011; Martínez *et al.*, 2017). En la presente investigación no se encontraron diferencias significativas entre el potencial osmótico de los embriones globulares sometidos a los distintos tratamientos con ABA, PEG, ASA, sacarosa (-2.28 a -3.10 MPa) y el testigo (-2.13 MPa) (Cuadro 2). Para los embriones torpedo (primer experimento) se registró una variación en el potencial osmótico de -1.54 a -2.37 MPa para los distintos tratamientos, sin ser significativamente diferentes del testigo (-1.83 MPa) (Cuadro 2). Aun cuando no hubo diferencias significativas en los potenciales osmóticos de los embriones globulares y torpedo (primer experimento) expuestos a los distintos tratamientos, sí se observaron diferencias en los porcentajes de maduración, encontrándose el valor más alto en los embriones globulares cultivados en presencia de 50 a 80 g L⁻¹ de sacarosa (Cuadro 1). Al respecto, Reyes-Díaz *et al.* (2017) señalaron que en el medio de maduración la sacarosa en altas concentraciones funciona como fuente de energía y como regulador osmótico, pudiendo mejorar la maduración y el desarrollo de los embriones somáticos. En el mismo

tenor, Elmaghrabi *et al.* (2017) encontraron que exponer embriones somáticos de *Medicago truncatula* a 100 g L⁻¹ de PEG 6000 no causó cambios en el potencial osmótico celular, pero sí generó diferencias en su desarrollo. Otros autores señalan que los agentes osmóticos, como el PEG incluidos, en los medios de cultivo hacen más negativo el potencial osmótico de los embriones induciendo cambios en la división celular, morfología celular, adquisición de la tolerancia al estrés, así como en la expresión de genes relacionados con el desarrollo de los embriones como el *SERK1* (cinasa receptora en la embriogénesis somática) (Elmaghrabi *et al.*, 2013).

Efecto de reguladores de crecimiento y osmóticos en la germinación de embriones somáticos

En esta fase no se consideraron los tratamientos con bajo número de embriones que alcanzaron la madurez. La germinación de los embriones globulares que lograron madurar (Germinación M) provenientes de los medios con distintas dosis de ABA (14.3-25.0 %) fue inferior al testigo (60.0 %); la misma respuesta se observó con los embriones globulares que se expusieron a PEG (6.5-7.7 %) (Cuadro 3). Los bajos porcentajes de germinación de los embriones de la variedad Colombia expuestos a PEG 8000 concuerdan con los resultados de Rudiyanto *et al.* (2014), quienes observaron que al utilizar concentraciones de PEG superiores a 50 g L⁻¹ la maduración de los embriones somáticos de *Jatropha curcas* se inhibió; posiblemente, el PEG a las concentraciones probadas generó un estrés osmótico por arriba de lo que los embriones soportaban, lo cual evitó que éstos pudieran continuar con su desarrollo y acumularan sustancias de reserva necesarias para la germinación (Carlsson *et al.*, 2019).

La germinación de los embriones globulares que maduraron (Germinación M), los cuales permanecieron en presencia de 50 a 80 g L⁻¹ de sacarosa (38.3-66.0 %), no fue significativamente diferente de la observada en el testigo (60.0 %); no obstante, cuando se calculó la germinación considerando el número de embriones iniciales en el medio de maduración (Germinación I), tanto el tratamiento con 50 g L⁻¹ (53.9 %) como con 60 g L⁻¹ (29.4 %) de sacarosa fueron significativamente superiores al testigo (11.7 %) y a los demás tratamientos (Cuadro 3; Figura 1D).

Martínez *et al.* (2015) señalaron que la sacarosa (60 g L⁻¹) fue un factor importante en el desarrollo de los embriones de *Quercus rubra*, al promover el incremento en tamaño y la acumulación de almidón en sus cotiledones; asimismo, Montalbán *et al.* (2010) encontraron que 80 % de los embriones somáticos de *Pinus radiata* lograron germinar cuando se adicionaron 60 g L⁻¹ de sacarosa al medio de maduración; en contraste, Jalali *et al.* (2017) registraron

Cuadro 2. Potencial osmótico de embriones de *C. arabica* var. Colombia después de 40 días de cultivo en los medios de maduración.

| Medio de maduración | Embriones globulares | Embriones torpedo temprano (Primer experimento) |
|-------------------------------|--------------------------|---|
| | Potencial osmótico (MPa) | Potencial osmótico (MPa) |
| Testigo | -2.13 ± 0.63 a | -1.83 ± 0.39 a |
| ABA 2 mg L ⁻¹ | -2.78 ± 0.19 a | -2.37 ± 0.39 a |
| ABA 3 mg L ⁻¹ | -2.91 ± 0.33 a | -1.71 ± 0.27 a |
| ABA 4 mg L ⁻¹ | -2.28 ± 0.82 a | -1.54 ± 0.10 a |
| PEG 8000 50 g L ⁻¹ | -2.57 ± 0.61 a | -2.01 ± 0.76 a |
| PEG 8000 75 g L ⁻¹ | -2.93 ± 2.35 a | -2.01 ± 0.36 a |
| ASA 1.38 g L ⁻¹ | -3.10 ± 0.29 a | -2.27 ± 0.59 a |
| Sacarosa 50 g L ⁻¹ | -- | -- |
| Sacarosa 60 g L ⁻¹ | -- | -- |
| Sacarosa 80 g L ⁻¹ | -2.31 ± 0.52 a | -2.23 ± 0.56 a |

Testigo: 30 g L⁻¹ de sacarosa, ABA: ácido abscísico, PEG 8000: polietilenglicol 8000, ASA: ácido salicílico. Medias (± error estándar) con letras iguales dentro de una columna no son estadísticamente diferentes (LSMeans, P ≤ 0.05).

sólo 14.9 % de germinación en *Schisandra chinensis* cuando los embriones se expusieron a 60 g L⁻¹ de sacarosa, en tanto que en *Tagetes erecta* la germinación máxima (67.5 %) se observó en medios con 45 g L⁻¹ de sacarosa (Vanegas *et al.*, 2017).

La germinación de los embriones torpedo del primer experimento, que provenían del tratamiento con 80 g L⁻¹ de sacarosa y que alcanzaron la madurez (73.9 %), estuvo por debajo de la observada en el testigo (100.0 %) (Germinación M) (Cuadro 3), en tanto que la observada en los embriones torpedo del segundo experimento (1 mg L⁻¹ de AG₃ + 0.5 mg L⁻¹ de AIA) (44.4 %) no fue significativamente distinta del testigo (66.7 %) cuando sólo se consideraron los embriones maduros (Germinación M), ni cuando se calculó con respecto al número inicial de embriones (Germinación I) (Cuadro 3). Carlsson *et al.* (2019) afirmaron que sólo los embriones que hayan acumulado suficientes sustancias de reserva en la maduración tendrán la capacidad de germinar y convertirse en plantas. De lo anterior, se puede inferir que la capacidad de germinación de los embriones de café está en función de su grado de madurez.

Efecto de los sustratos en la aclimatación y crecimiento de las plantas

Supervivencia, tamaño de plúmula y número de hojas

Después de 90 días en condiciones de invernadero todas

las plantas sobrevivieron en ambos sustratos (Figura 1F). Los resultados encontrados en este estudio son similares a los de Kahia *et al.* (2016), quienes registraron 98 % de supervivencia en vitroplantas de *C. arabica* cultivadas en suelo y estiércol (3:1) durante 30 días. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en el tamaño de la plúmula de las plantas cultivadas en perlita:turba:tezontle (4.9 cm) con respecto a las que fueron cultivadas en turba:tezontle (4.5 cm). El tamaño alcanzado por las plantas de *C. arabica* var. Colombia fue similar al de las plantas de *C. arabica* var. Catuaí cultivadas en turba o en suelo (4.8 y 5.4 cm, respectivamente) (Gawad *et al.*, 2012; Isaac *et al.* 2014). Las diferencias observadas pueden deberse, por un lado, a que la variedad Colombia es de porte bajo y crecimiento lento (López-García *et al.*, 2016), y por otro, a las condiciones climáticas del sitio del experimento (Texcoco, Estado de México), las cuales no son óptimas para cultivar café. Asimismo, el número de hojas de las plantas cultivadas en perlita:turba:tezontle (15.5) no fue significativamente distinto del de aquellas crecidas en turba:tezontle (14.5), pero sí mayor al reportado por Gawad *et al.* (2012) (3.3-3.67) en plantas de la var. Catuaí.

Intercambio de gases y área foliar

Debido a que las condiciones heterotróficas durante el cultivo *in vitro* pueden causar alteraciones fisiológicas en las plantas y afectar su comportamiento en condiciones *ex vitro* (Chandra *et al.*, 2010; Kumar y Rao, 2012) y a que el tipo de sustrato también influye en dicho comportamiento (Afreen *et al.*, 2002; Aga y Khillare, 2017; Maciel *et al.*, 2016), se midió el intercambio de gases durante la fotosíntesis, así como el área foliar de las plantas regeneradas cultivadas en las dos mezclas de sustratos.

La tasa fotosintética de las plantas crecidas en perlita:turba:tezontle no fue significativamente mayor que la encontrada en las plantas cultivadas en turba:tezontle (Cuadro 4). Es importante mencionar que en el presente trabajo la radiación al momento de las mediciones fue muy baja (143.84 μmol m² s⁻¹) y pudo haber afectado la tasa fotosintética. Li *et al.* (2015) mencionaron que la actividad fotosintética depende de factores ambientales como la radiación interceptada por el dosel y que cuando ésta es baja, la tasa fotosintética se reduce. En cuanto a la conductancia estomática, ésta fue de 0.11 μmol H₂O m⁻² s⁻¹ en las plantas cultivadas en perlita:turba:tezontle, valor significativamente superior al encontrado en aquellas crecidas en turba:tezontle (Cuadro 4); lo anterior indica que en estas últimas hubo un menor intercambio gaseoso. Por su parte, la concentración interna de CO₂ de las plantas cultivadas en perlita:turba:tezontle fue significativamente superior (369.72 mmol CO₂ mol⁻¹) a la registrada en las plantas crecidas en turba:tezontle

Cuadro 3. Germinación de embriones somáticos de *C. arabica* var. Colombia después de 60 días de cultivo en el medio de germinación.

| Medio de maduración | Embriones globulares | | Embriones torpedo temprano (Primer experimento) | | Embriones torpedo temprano (Segundo experimento) | |
|---|--------------------------------|---------------------------------|---|-------------------|--|-------------------|
| | Germinación M [†] (%) | Germinación I ^{††} (%) | Germinación M (%) | Germinación I (%) | Germinación M (%) | Germinación I (%) |
| Testigo | 60.0 ± 22.0 ab | 11.7 ± 13.0 c | 100 ± 0.00 a | 10.0 ± 12.0 a | 66.7 ± 33.0 a | 3.3 ± 7.0 a |
| ABA 2 mg L ⁻¹ | 14.3 ± 16.0 d | 1.7 ± 5.0 d | -- | -- | -- | -- |
| ABA 3 mg L ⁻¹ | 25.0 ± 19.0 cd | 1.7 ± 5.0 d | -- | -- | -- | -- |
| ABA 4 mg L ⁻¹ | 18.3 ± 16.0 cd | 1.7 ± 5.0 d | -- | -- | -- | -- |
| PEG 8000 50 g L ⁻¹ | 6.5 ± 14.0 d | 1.7 ± 5.0 d | -- | -- | -- | -- |
| PEG 8000 75 g L ⁻¹ | 7.7 ± 15.0 d | 1.7 ± 5.0 d | -- | -- | -- | -- |
| Sacarosa 50 g L ⁻¹ | 66.0 ± 19.0 a | 53.9 ± 20.0 a | -- | -- | -- | -- |
| Sacarosa 60 g L ⁻¹ | 43.4 ± 20.0 bc | 29.4 ± 19.0 b | -- | -- | -- | -- |
| Sacarosa 80 g L ⁻¹ | 38.3 ± 20.0 bc | 17.2 ± 15.0 c | 73.9 ± 20.0 b | 14.2 ± 14.0 a | -- | -- |
| 1.0 mg L ⁻¹ AG ₃ + 0.5 mg L ⁻¹ AIA | -- | -- | -- | -- | 44.4 ± 20.0 a | 20.0 ± 28.0 a |

[†]Germinación M: con respecto a los embriones que maduraron, ^{††}Germinación I: con respecto al número inicial de embriones que se colocaron en los medios de maduración. Testigo: 30 g L⁻¹ de sacarosa, ABA: ácido abscísico, PEG 8000: polietilenglicol 8000, ASA: ácido salicílico, AIA: ácido indolacético, AG₃: ácido giberélico. Medias (± error estándar) con letras iguales dentro de una columna no son estadísticamente diferentes (LSMeans, P ≤ 0.05).

(Cuadro 4); lo anterior pudo deberse a que en estas últimas hubo menor conductancia estomática y menor entrada de CO₂, agotándose el CO₂ interno.

En café, se han realizado estudios para la estimación del área foliar en plantas adultas obtenidas por semilla; por ello, fue necesario estimar el cociente largo/ancho relacionado con el área foliar. En el Cuadro 4 se muestra que no hubo diferencias significativas en el valor del cociente entre el promedio del largo y el promedio del ancho de las hojas de ambos tratamientos; de igual manera, se observa que el área foliar de las plantas crecidas en turba:tezontle (24.99 cm²) no fue significativamente superior al de las plantas crecidas en perlita:turba:tezontle (24.07 cm²). Al respecto, el área foliar de plantas de *C. arabica* var. Castillo provenientes de semilla, cultivadas en campo, fue similar (26.7 cm) al observado en las plantas de la var. Colombia (24.99 cm) (Unigarro-Muñoz *et al.*, 2015). Lo anterior indica que las condiciones de cultivo probadas

en la presente investigación permitieron regenerar plantas fisiológicamente funcionales con características similares a las plantas obtenidas a partir de semilla, lo cual es deseable en un programa de propagación a escala comercial.

Diversos protocolos sobre embriogénesis somática de café han sido desarrollados (Aga y Khillare, 2017; Etienne *et al.* 2013; 2018; Gatica-Arias *et al.*, 2008; Georget *et al.*, 2017; Kahia *et al.*, 2016; Montes-Cruz *et al.*, 2017); no obstante, para la variedad Colombia sólo se conoce un reporte (Avila-Victor *et al.*, 2018), en el cual los aspectos relacionados con la maduración y germinación de los embriones somáticos se abordaron someramente; asimismo, existe evidencia de que la respuesta al cultivo *in vitro* depende del genotipo, por lo que las condiciones de cultivo deberán establecerse para cada variedad (López-Gómez *et al.*, 2010; Santana-Buzzy *et al.*, 2007).

Cuadro 4. Comparación de medias de componentes del intercambio gaseoso entre sustratos de aclimatación.

| Sustrato | A | gs | E | Ci | Cociente largo/ancho | Área foliar (cm ²) |
|----------|---------|-------|-------|---------|----------------------|--------------------------------|
| PTT | 1.51 ns | 0.11* | 2.45* | 369.72* | 2.0 ns | 24.07 |
| TT | 1.88 | 0.06 | 1.48 | 330.14 | 2.0 | 24.99 ns |

PTT: perlita-turba-tezontle, TT: turba-tezontle, A: tasa fotosintética (μmol CO₂ m⁻²s⁻¹), gs: conductancia estomática (μmol H₂O m⁻²s⁻¹), E: transpiración (mmol H₂O m⁻²s⁻¹), Ci: concentración interna de CO₂ (mmol CO₂ mol⁻¹). Datos tomados a los 110 días después de cultivo; ns: diferencias no significativas, *: diferencias significativas (t-Student, P ≤ 0.05).

La baja tasa de maduración, geminación y conversión limita la aplicación de los protocolos de embriogénesis en los programas de producción de plantas a escala comercial, tanto en la var. Colombia como en otras especies y cultivares de café, por lo que se requieren más estudios al respecto (Carlsson *et al.*, 2019). Los resultados obtenidos en el presente estudio proveen información para la optimización de protocolos de multiplicación de *C. arabica* var. Colombia mediante embriogénesis somática.

CONCLUSIONES

Altas concentraciones de sacarosa (50–80 g L⁻¹) en el medio de cultivo aumentan significativamente la tasa de maduración de embriones somáticos globulares y torpedo temprano de *C. arabica* var. Colombia. El inducir la maduración de los embriones desde la etapa globular puede reducir el tiempo, insumos y mano de obra requeridos. El potencial osmótico de los embriones no tiene relación directa con su maduración. El grado de madurez de los embriones somáticos influye en su capacidad para germinar y convertirse en plantas. Las plantas regeneradas son morfológica y fisiológicamente normales bajo condiciones *ex vitro* y tienen alta capacidad para adaptarse a dichas condiciones.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada a Enrique Riviello Cogco para realizar sus estudios de Maestría (813933).

BIBLIOGRAFÍA

- Afreen F., S. Zobayed and T. Kozai (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabica* somatic embryos: development of a bioreactor for largescale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Annals of Botany* 90:21–29, <https://doi.org/10.1093/aob/mcf151>
- Aga E. and Y. Khillare (2017) *In vitro* multiplication of *Coffea arabica* L. from leaf explants through indirect somatic embryogenesis. *International Journal of Botany Studies* 2:17–22.
- Antunes W. C., F. M. Pompelli, M. D. Carretero and M. F. DaMatta (2008) Allometric models for non-destructive leaf area estimation in coffee (*Coffea arabica* and *Coffea canephora*). *Annals of Applied Biology* 153:33–40, <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00235.x>
- Aslam J., K. S. Ahmad, C. A. Jaleel, A. Mujib, S. M. Pershad and S. P. Shanker (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, <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.06.002>
- Avila-Victor C. M., Á. Martínez-Infante, V. M. Ordaz-Chaparro, E. J. Arjona-Suárez, L. Iracheta-Donjuan, F. C. Gómez-Merino y A. Robledo-Paz (2018) Embriogénesis somática directa e indirecta en *Coffea arabica* var. Colombia. *Agroproductividad* 11:30–35.
- Bartos P. M. C., H. T. Gomes, L. I. V. do Amaral, J. B. Teixeira and J. E. Scherwinski-Pereira (2018) Biochemical events during somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. *3 Biotech* 8:209, <https://doi.org/10.1007/s13205-018-1238-7>
- Businge E., J. Bygdell, G. Wingsle, T. Moritz and U. Egertsdotter (2013) The effect of carbohydrates and osmoticum on storage reserve accumulation and germination of Norway spruce somatic embryos. *Physiologia Plantarum* 149:273–285, <https://doi.org/10.1111/pp1.12039>
- Campos N. A., B. Panis and S. C. Carpentier (2017) Somatic embryogenesis in coffee: the evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in Plant Science* 8:1460, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01460>
- Cangahuala-Inocente G. C., N. Steiner, S. B. Maldonado and M. P. Guerra (2009) Patterns of protein and carbohydrate accumulation during somatic embryogenesis of *Acca sellowiana*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 44:217–224, <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2009000300001>
- Carlsson J., U. Egertsdotter, U. Ganeteg and H. Svennerstam (2019) Nitrogen utilization during germination of somatic embryos of Norway spruce: revealing the importance of supplied glutamine for nitrogen metabolism. *Trees* 33:383–394, <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1784-y>
- Chandra S., R. Bandopadhyay, V. Kumar and R. Chandra (2010) Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnology Letters* 32:1199–1205, <https://doi.org/10.1007/s10529-010-0290-0>
- da Silva D. P. C., R. Paiva, R. C. Herrera, L. C. Silva, G. N. Ferreira and M. V. dos Reis (2018) Somatic embryogenesis of *Byrsonima intermedia* A. Juss.: induction and maturation via indirect approach. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 133:115–122, <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1366-5>
- Elmaghrabi A. M., S. Ochatt, H. J. Rogers and D. Francis (2013) Enhanced tolerance to salinity following cellular acclimation to increasing NaCl levels in *Medicago truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 114:61–70, <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0306-2>
- Elmaghrabi A. M., H. J. Rogers, D. Francis and S. J. Ochatt (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, <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01479>
- Etienne H (2005) Somatic embryogenesis protocol: coffee (*Coffea arabica* L. and *C. canephora* P.). In: Protocol for Somatic Embryogenesis in Woody Plants. Forestry Sciences Vol 77. S. M. Jain and P. K. Gupta (eds.). Springer. Dordrecht, The Netherlands. pp:167–179, https://doi.org/10.1007/1-4020-2985-3_14
- Etienne H., B. Bertrand, F. Georget, M. Lartaud, F. Montes, E. Dechamp, ... and D. Barry-Etienne (2013) Development of coffee somatic and zygotic embryos to plants differs in the morphological, histochemical and hydration aspects. *Tree Physiology* 33:640–653, <https://doi.org/10.1093/treephys/tp034>
- Etienne H., D. Breton, J. C. Breitler, B. Bertrand, E. Déchamp, R. Awada, ... and J. C. Ducos (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* 9:1630, <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01630>
- Firdiana E. R., S. Indriyani and W. Widoretno (2015) The Effect of gibberellin on somatic embryo growth and maturation and plantlet regeneration of tangerine (*Citrus reticulata* Blanco.) var. Batu 55. *Journal of Experimental Life Science* 5:19–23, <https://doi.org/10.21776/ub.jels.2015.005.01.04>
- Gatica-Arias A. M., G. Arrieta-Espinoza and A. M. Espinoza E. (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 <https://doi.org/10.2225/vol11-issue1-fulltext-9>
- Gawad E. A., M. A. Nehad, H. A. Mahdy and E. S. Boshra (2012) *In vitro* micropropagation protocol and acclimatization of coffee trees (*Coffea arabica* L.). *Journal of Plant Production* 3:109–116, <https://doi.org/10.21608/JPP.2012.84031>
- Georget F., P. Courtel, E. M. Garcia, M. Hidalgo, E. Alpizar, J. C. Breitler, ... and H. Etienne (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, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.12.017>
- González M. E., R. Ramos y N. Santana (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.
- Hazubska-Przybył T., E. M. Kalembe, E. Ratajczak and K. Bojarczuk (2016) Effects of abscisic acid and an osmoticum on the maturation, starch accumulation and germination of *Picea* spp. somatic embryos. *Acta Physiologiae Plantarum* 38:59, <http://doi.org/10.1007/s11738-016-2078-x>
- Iraqi D. and F. M. Tremblay (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, <https://doi.org/10.1093/jexbot/52.365.2301>
- Iraqi D., M. S. Lamhamedi and F. M. Tremblay (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, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2003.06.001>
- Isaac A. E., A. Mboghli, Y. F. Boix, J. González-Olmedo and A. Chalfun-Junior (2014) Effects of EMFs on some biological parameters in coffee plants (*Coffea arabica* L.) obtained by *in vitro* propagation. *Polish Journal of Environmental Studies* 23:95-101.
- Jalali M. A., H. B. Sirmadi and A. Hatamzadeh (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, <https://doi.org/10.1007/s12892-016-00089-1>
- Kahia J., M. Kirika, H. Lubabali and S. Mantell (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, <https://doi.org/10.21273/HORTSCI10771-16>
- Kalam A. M. A., G. Rabhani and L. Amin (2012) Plant regeneration and somatic embryogenesis from immature embryos derived through interspecific hybridization among different *Carica* species. *International Journal of Molecular Sciences* 13:17065-17076, <https://doi.org/10.3390/ijms131217065>
- Kubeš M., N. Dražná, H. Konrádová and H. Lipavská (2014) Robust carbohydrate dynamics based on sucrose resynthesis in developing Norway spruce somatic embryos at variable sugar supply. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 50:45-57, <https://doi.org/10.1007/s11627-013-9589-6>
- Kumar V., M. M. Naidu and G. Ravishankar (2006) Developments in coffee biotechnology *in vitro* plant propagation and crop improvement. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 87:49-65, <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9134-y>
- Kumar K. and I. Rao (2012) Morphophysiological problems in acclimatization of micropropagated plants in *ex vitro* conditions- a review. *Journal of Ornamental and Horticultural Plants* 2: 271-283.
- Li C., Y. Li, Y. Shi, Y. Song, D. Zhang, E. S. Buckler ... and Y. Li (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:e0121624, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121624>
- López-García F. J., E. Escamilla-Prado, A. Zamarripa-Colmenero y J. G. Cruz-Castillo (2016) Producción y calidad en variedades de café (*Coffea arabica* L.) en Veracruz, México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39:297-304, <https://doi.org/10.35196/rfm.2016.3.297-304>
- López-Gómez P., L. Iracheta-Donjuan, M. Castellanos-Juárez, I. Méndez-López, A. Sandoval-Esquivel, J. F. Aguirre-Medina, ... y A. Gutiérrez-Díez (2010) Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33:205-213, <https://doi.org/10.35196/rfm.2010.3.205>
- Maciel A. L. R., F. A. Rodrigues, M. Pascual and C. H. S. de Carvalho (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.
- Márquez-Martín B., R. Sesmero, M. A. Quesada, F. Pliego-Alfaro and C. Sánchez-Romero (2011) Water relations in culture media influence maturation of avocado somatic embryos. *Journal of Plant Physiology* 168:2028-2034, <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.06.008>
- Martínez M. T., A. M. Vieitez and E. Corredoira (2015) Improved secondary embryo production in *Quercus alba* and *Q. rubra* by activated charcoal, silver thiosulphate and sucrose: influence of embryogenic explant used for subculture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 121:531-546, <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0722-6>
- Martínez S. D. J., R. Gómez-Kosky, R. Barbón, R. Collado, M. Pérez, N. Veitia y M. Rodríguez (2017) Maduración y germinación de embriones somáticos de *Sorghum bicolor* (L.) Moench cultivar 'CIAP 132R-05'. *Bioteecnología Vegetal* 17:3339.
- Montalbán I., N. De Diego and P. Moncaleán (2010) Bottlenecks in *Pinus radiata* somatic embryogenesis: improving maturation and germination. *Trees* 24:1061-1071, <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0477-y>
- Montes-Cruz S., J. M. Lalama-Aguirre, J. Echeverría-Felix, L. Toromoren-Arevalo, S. Salazar-Torres, E. Benavides-Burgos y J. Atajia-Llamba (2017) Obtención de embriones somáticos de café a partir de explantes de hojas de las variedades Bourbon Cidra, Caturra Rojo y SL-28 de plantaciones establecidas en la provincia del Carchi, Zona 1, Ecuador. *Dominio de las Ciencias* 3:918-942.
- Murashige T. and F. Skoog (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497, <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Pereira A. R., S. P. Carvalho, M. Pasqual e F. C. Santos (2007) Embriogénesis somática directa em explantes foliares de *Coffea arabica* L. cv. Acaia Cerrado: efeito de cinetina e ácido giberélico. *Ciência e Agrotecnologia* 31:332-336, <https://doi.org/10.1590/S1413-70542007000200010>
- Ptak A., A. El Tahchy, E. Skrzypek, T. Wójciewicz and D. Laurain-Mattar (2013) Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucocjum aestivum* callus. *Central European Journal of Biology* 8:591-599, <https://doi.org/10.2478/s11535-013-0160-y>
- Quiroz-Figueroa F., C. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera and V. Loyola-Vargas (2002) Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports* 20:1141-1149, <https://doi.org/10.1007/s00299-002-0464-x>
- Rai M. K., N. Akhtar and V. Jaiswal (2007) Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Psidium guajava* L. cv. Banarasi local. *Scientia Horticulturae* 113:129-133, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2007.02.010>
- Renard H. M. C. y R. M. Larroa T. (2017) Política pública y sustentabilidad de los territorios cafetaleros en tiempos de roya: Chiapas y Veracruz. *Estudios Latinoamericanos* 40:95-113, <https://doi.org/10.22201/cel.24484946e.2017.40.61593>
- Reyes-Díaz J. I., A. M. Arzate-Fernández, J. L. Piña-Escutia and L. M. Vázquez-García (2017) Media culture factors affecting somatic embryogenesis in *Agave angustifolia* Haw. *Industrial Crops and Products* 108:81-85, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.021>
- Rezende J. C., C. H. S. Carvalho, M. Pascual, A. C. R. Santos e S. M. Carvalho (2011) Calli induction in leaf explants of coffee elite genotypes. *Ciência Rural* 41:384-389, <https://doi.org/10.1590/S0103-84782011000300004>
- Rudiyanto S. P., D. Efendi and T. M. Ermayanti (2014) Somatic embryo germination of *Jatropha curcas* L. in presence of sucrose and poly ethylene glycol (PEG). *Annales Bogorieneses* 18:35-43.
- SAGARPA, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (2017) Planeación Agrícola Nacional 2017-2030. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Ciudad de México. 33 p.
- Santana-Buzzy N., R. Rojas-Herrera, R. M. Galaz-Avalos, J. R. Ku-Cauich, J. Mijangos-Cortés, L. C. Gutiérrez-Pacheco, ... and V. M. Loyola-Vargas (2007). Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 43:507-520, <https://doi.org/10.1007/s11627-007-9074-1>
- SAS Institute (2002) SAS/STAT User's Guide. Version 8. Sixth edition. SAS Institute. Cary, North Carolina, USA. 112 p.
- Sghaier-Hammami B., J. V. Jorrín-Novo, R. Gargouri-Bouزيد and N. Drira (2010) Abscisic acid and sucrose increase the protein content in date palm somatic embryos, causing changes in 2-DE profile. *Phytochemistry* 71:1223-1236, <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2010.05.005>
- Shewry P. R. and N. G. Halford (2002) Cereal seed storage proteins: structures, properties and role in grain utilization. *Journal of Experimental Botany* 53:947-958, <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.370.947>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2020) Anuario estadístico de la producción agrícola. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Ciudad de México. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Mayo 2021).
- Singh R., M. K. Rai and N. Kumari (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, <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1758-0>
- Sivanesan I., M. S. Son, S. Jana and B. R. Jeong (2012) Secondary somatic embryogenesis in *Crocus vernus* (L.) Hill. *Propagation of Ornamental Plants* 2:163-170.
- Stasolla C., L. van Zyl, U. Egertsdotter, D. Craig, W. Liu and R. R. Sederoff (2003) The effects of polyethylene glycol on gene expression of developing white spruce somatic embryos. *Plant Physiology* 131:49-60, <https://doi.org/10.1104/pp.015214>
- Steiner A. A. (1984) The universal nutrient solution. *In*: Proceedings of the 6th International Congress on Soilless Culture. International Society for Soilless Culture. Wageningen, The Netherlands. pp:633-649.
- Tikinen M., S. Varis and T. Aronen (2018) Development of somatic embryo maturation and growing techniques of Norway spruce emblings towards large-scale field testing. *Forests* 9:325, <https://doi.org/10.3390/f9060325>
- Unigarro-Muñoz C. A., J. D. Hernández-Arredondo, E. C. Montoya-Restrepo, R. D. Medina-Rivera, L. N. Ibarra-Ruales, C. Y. Carmona-González and C. P. Flórez-Ramos (2015) Estimation of leaf area in coffee leaves (*Coffea arabica* L.) of the Castillo variety. *Bragantia* 74:412-416, <https://doi.org/10.1590/1678-4499.0026>
- USDA, United States Department of Agriculture (2018) Mexico. Coffee annual. Coffee plan on track to achieve goals. GAIN Report Number: MX8023. USDA Foreign Agriculture Service. Washington, D. C., USA. 10 p. https://apps.fas.usda.gov/newgainapi/api/report/downloadreportbyfilename?filename=Coffee%20Annual_Mexico%20City_Mexico_5-15-2018.pdf (Mayo 2021).
- Vahdati K., S. Bayat, H. Ebrahimzadeh, M. Jariteh and M. Mirasoumi (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, <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9355-3>
- Vale E. D. M., A. S. Heringer, T. Barroso, A. T. D. Ferreira, M. N. da Costa, J. E. A. Perales, ... and V. Silveira (2014) Comparative proteomic analysis of somatic embryo maturation in *Carica papaya* L. *Proteome Science* 12:37, <https://doi.org/10.1186/1477-5956-12-37>
- Vanegas E. P. E., I. Benítez-García, A. L. Leyva P., O. Paredes-López and A. A. Del Villar-Martínez (2017) Somatic embryogenesis from leaf explants of *Tagetes erecta* L. *Plant Biotechnology* 34:187-192, <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.17.1120a>
- Yasuda T., Y. Fujii and T. Yamaguchi (1985) Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiology* 26:595-597, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.pcp.a076946>

