

Control de la hiperhidricidad en callos embriogénicos inducidos en explantes foliares de café Robusta (*Coffea canephora* P.)

Cuauhtémoc Arteaga-Solano^{1,2}, Leobardo Iracheta-Donjuan^{1*}, Pablo López-Gómez¹, Simitrio Ortiz-Curiel¹, Ismael Méndez-López¹

¹Campo Experimental Rosario Izapa del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Tuxtla Chico, Chiapas, México.

²Universidad Tecnológica de la Selva. Ocosingo, Chiapas, México.

Resumen

Durante la inducción de callo embriogénico en *Coffea canephora* Pierre, son comunes los problemas de producción de callo hiperhidratado con poco potencial para la formación de embriones. Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la respuesta morfológica y relaciones hídricas de explantes de tres secciones de hojas tiernas y jóvenes de café Robusta (INIFAP 95-9), sometidas a diferentes concentraciones de sacarosa y gelificante, como agentes osmóticos. Para ello, se evaluaron dos tipos de hojas (hojas tiernas y jóvenes) y la sección del limbo foliar (basal, media y apical), cada tipo sometido a tres concentraciones de sacarosa: 30, 50 y 80 g L⁻¹ y tres concentraciones de phytigel: 5.2, 8 y 16 g L⁻¹. En las tres secciones de la hoja, la concentración de 8 g L⁻¹ de phytigel produjo callo de consistencia de calidad (arenosa compacta o de fácil dispersión); en hojas jóvenes, el tratamiento con 5.2 y 8 g L⁻¹ de phytigel fueron los mejores para producir este tipo de callo embriogénico. Los callos de las diferentes secciones tuvieron la capacidad de osmorregulación al mantener el potencial de turgencia (Ψ_p) con valores positivos por la acumulación activa de solutos. Con base a los resultados obtenidos fue posible identificar el tipo y sección foliar, a su vez el agente osmótico y la concentración más eficiente para reducir la hiperhidratación y generar callos con potencial embriogénico.

Palabras clave:

Agentes osmóticos
Café Robusta
Callogénesis
Hiperhidratación

Keywords:

Osmotic agents
Coffee Robusta
Callogenesis
Hyperhydration

Control of hyperhydricity in embryogenic callus induced in Robusta coffee leaf explants (*Coffea canephora* P.)

Abstract

During the induction of embryogenic callus in *Coffea canephora* Pierre, problems with the production of hyperhydrated callus with little potential for embryo formation are common. This work aimed to study the morphogenic response and water relations of explants from three sections of tender and young leaves of Robusta coffee (INIFAP 95-9), subjected to different concentrations of sucrose and gelling agent, as osmotic agents. For this, two types of leaves (tender and young leaves) and the section of the leaf blade (basal, middle, and apical) were evaluated, each type subjected to three concentrations of sucrose: 30, 50 and 80 g L⁻¹ and three concentrations of phytigel: 5.2, 8 and 16 g L⁻¹. For the three sections of the leaf, the concentration of 8 g L⁻¹ of phytigel produced callus of quality consistency (compact sandy or easily dispersed); in young leaves, the treatments with 5.2 and 8 g L⁻¹ of phytigel were the best to produce this type of embryogenic callus. The calluses of the different sections had the capacity for osmoregulation by maintaining the turgor potential (Ψ_p) with positive values due to the active accumulation of solutes. Based on the results obtained, it was possible to identify the type and leaf section, in turn the agent osmotic and the most efficient concentration to reduce hyperhydration and generate callus with embryogenic potential.

* Autor para correspondencia:

Campo Experimental
Rosario Izapa del Instituto
Nacional de Investigaciones
Forestales, Agrícolas y
Pecuarias, Carretera
Tapachula-Cacahoatán Km
18. Tuxtla Chico, Chiapas,
México. C.P. 30870.
Teléfono: + 52 9621059535.
Correo-electrónico:
iracheta.leobardo@inifap.gob.mx

1. Introducción

El café es uno de los principales productos que se comercializan en el mercado mundial, con una producción de 10.5 millones de toneladas (Avila-Victor et al., 2023). Su producción se realiza normalmente en las zonas tropicales. Actualmente más de 80 países lo cultivan, de los cuales poco más de 50 lo exportan. Existe un gran número de especies del género *Coffea*; pero desde el punto de vista comercial, el *Coffea arabica* L. y *Coffea canephora* Pierre., tienen un importante papel en el mercado internacional, esto se debe a sus características de productividad, calidad de bebida y adaptabilidad (Clifford y Willson, 1985). Sin embargo, este cultivo enfrenta una serie de complicaciones que parten desde incidencia de plagas y enfermedades más agresivas con mayor frecuencia (Henderson, 2019). Aunado a eso, los tiempos de obtención de plantas son largos, esto como consecuencia del uso de la semilla como método tradicional para la obtención de los cafetos que, además han dado lugar a la alta variabilidad genética y fenotípica que se observa en las plantaciones actuales (Wintgens y Zamarripa, 2004); lo cual se traduce en baja calidad y rendimientos. Por ello, la multiplicación vegetativa juega un papel importante en especies perennes como el café, la cual puede ser por medio de estacas o injerto (Berthouly, 1997; Solano, 2001).

El uso de técnicas biotecnológicas de reproducción asexual, tal como el cultivo de tejidos vegetales, permite multiplicar genotipos élite en forma masiva y en un tiempo relativamente corto (López-Gómez et al., 2010). En este sentido, el cultivo de tejidos permite obtener a bajo costo gran cantidad de plantas mejoradas con características sobresalientes de rendimiento y calidad. Con el cultivo de tejidos vegetales, la propagación se puede realizar mediante la embriogénesis somática (Berthouly, 1997), la cual puede ser una alternativa no sólo de la propagación masiva, sino también como una herramienta útil en los programas de mejoramiento mediante transformación genética. Esta técnica de reproducción asexual ofrece grandes ventajas ya que permite multiplicar genotipos de forma masiva y en tiempos de 6 a 10 meses, dependiendo del genotipo (Gálvez-López et al., 2016; López-Gómez et al., 2016; Solano, 2001).

Durante el proceso de inducción de la embriogénesis somática en café, son posibles algunas complicaciones en la fase de inducción de callo; específicamente en lo que se refiere a la condición fisiológica del callo generado a partir de explantes provenientes de hojas jóvenes o tiernas, los cuales manifiestan altos niveles de hiperhidricidad y una apariencia traslúcida de los tejidos. Esta condición corresponde a un desorden fisiológico que se presenta en los tejidos cultivados *in vitro*, especialmente en las hojas, que incide sobre la fotosíntesis, el intercambio gaseoso y la diferenciación morfogénica. En menor medida, los tallos y raíces resultan afectados por esta anomalía anatómica, que en ciertos casos van a impedir el establecimiento de plantas micropropagadas en condiciones *ex vitro* (Kevers et al., 2004; Saher et al., 2004; Ziv, 1991).

En el caso de callos hiperhidratados, estos reaccionan de dos formas distintas al ser sometidos a la multiplicación en medios líquidos; la primera de ellas es la desintegración de los agregados obtenidos en los medios semisólidos y la segunda es la incapacidad de diferenciación de las células en suspensión. Lo anterior trae como consecuencia retrasos en la obtención de líneas embriogénicas, así como pérdidas económicas.

Al respecto, en diferentes cultivos se ha planteado como alternativa de solución al problema de la hiperhidratación, el incremento de agentes osmóticos en el medio de cultivo, como es el caso de las fuentes de carbono (sacarosa) y los agentes gelificantes (Ivanova y Staden, 2011). El incremento de las concentraciones de las fuentes de carbono y los agentes gelificantes en el medio de cultivo semisólido, podría mejorar las relaciones hídricas de los tejidos, lo que permitiría disminuir la hiperhidricidad de los agregados celulares. Lo anterior se logra, ya que la sacarosa, el gelificante e incluso la concentración de sales minerales, retienen el agua y afectan el potencial matricial (Brand, 1993; Cárdenas, 1999) y osmótico del medio de cultivo (George, 1993; Yoshida et al., 1973). Estos componentes pueden promover estrés hídrico en los tejidos y ante este efecto el tejido o células inician la biosíntesis de ABA (ácido abscísico); lo que podría aumentar el contenido de este regulador y por ende propiciar la formación de callo de mayor calidad para embriogénesis somática. Por otro lado, la aplicación de agentes osmóticos en medios de cultivo provocaría competencia por el agua entre los agentes osmóticos del medio y las células hiperhidratadas, lo cual induciría la osmorregulación de los tejidos, mediante el mantenimiento del potencial de turgencia (Ψ_p) con valores positivos, mediante la acumulación activa de solutos, al disminuir el potencial osmótico (Ψ_π) e incluso el potencial hídrico (Ψ_w) del tejido (Quintana-Escobar et al., 2017). Lo anterior permitiría el control de los niveles de humedad de los tejidos e incluso mejorar la diferenciación de los callos. Es por ello que el objetivo de esta investigación fue estudiar la respuesta morfológica y relaciones hídricas de explantes de tres secciones de hojas tiernas y jóvenes de café Robusta (INIFAP 95-9), sometidas a diferentes concentraciones de sacarosa y gelificante, como agentes osmóticos.

2. Materiales y métodos

2.1. Material biológico

Se usaron hojas tiernas y jóvenes como explantes de plantas élite de *Coffea canephora*, genotipo INIFAP 95-9, provenientes del jardín clonal del INIFAP-CERI. Las hojas tiernas de un mes de edad presentaron coloración verde tierno y de textura suave, mientras que las hojas jóvenes, de tres meses, fueron de color verde oscuro y de textura áspera. Todas las hojas seleccionadas tuvieron un tamaño homogéneo, sin daños y sin presencia aparente de enfermedades.

2.2. Desinfección

Las plantas del genotipo a utilizar fueron asperjadas con una solución de Amistar® al 50% (Azoxyestrobilina 2 g L⁻¹) durante tres días antes del establecimiento *in vitro*. Las hojas utilizadas fueron lavadas con agua y detergente comercial; posteriormente fueron sumergidas en una solución previamente esterilizada de ácido ascórbico (0.1 g L⁻¹), ácido cítrico (0.15 g L⁻¹), sacarosa (30 g L⁻¹) y Azoxyestrobilina al 50% (2 g L⁻¹). En estas condiciones las hojas fueron sometidas a vacío con una boba Welch Dou Seal® 1400 por 3 min, con la finalidad de eliminar el aire del tejido que impidieran el contacto con la solución fungicida-antioxidante. En seguida se desinfectaron con hipoclorito de calcio [Ca(ClO)₂] al 7% por 20 min, bajo la campana de flujo laminar, finalmente fueron enjuagadas tres veces con agua destilada esterilizada y colocadas en una solución con los antioxidantes mencionados anteriormente.

2.3. Clasificación del tipo de hoja y sección

Una vez finalizado el proceso de desinfección, las hojas tiernas y jóvenes fueron separadas y seccionadas en tres partes (basal, media y apical). Posteriormente se obtuvieron explantes de 1 cm², los cuales fueron sembrados en cajas de Petri de 12x100 mm con 20 mL de medio de cultivo esterilizado previamente a 121 °C y 15 lb por 20 min.

2.4. Medio de cultivo

El medio utilizado en esta etapa estuvo compuesto por la formulación de las sales inorgánicas de Yasuda et al. (1985), con las vitaminas descritas por Gamborg (2002), adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 1.125 mg L⁻¹ de 6-benzilaminopurina (BAP), 5.2 g L⁻¹ de phytigel Sigma® y pH de 6.3, ajustado con hidróxido de potasio o ácido nítrico al 1N. Las cajas de Petri con el material vegetal establecido fueron selladas herméticamente. Después de dos semanas, los explantes fueron transferidos a cinco medios de cultivo diferentes, en los que se utilizó el mismo medio Yasuda et al. (1985) ya mencionado, pero usando dos concentraciones de sacarosa (50 y 80 g L⁻¹), dos de phytigel (8 y 16 g L⁻¹) y un testigo con 30 g L⁻¹ de sacarosa y 5.2 g L⁻¹ de phytigel.

2.5. Tratamientos e incubación

Se generó un total de 36 tratamientos, producto de la combinación de los dos tipos de hojas (tiernas y jóvenes), las tres secciones del limbo de la hoja (basal, medio y apical) y seis concentraciones diferentes de agentes osmóticos (tres de sacarosa y tres de phytigel). Para efectos prácticos, los tratamientos se presentan por separado, 18 para hojas tiernas y 18 para hojas jóvenes. Para todos los tratamientos se utilizaron cajas de Petri desechables de 60x15 mm con 10 mL de medio de cultivo. Todos los tratamientos fueron colocados en un cuarto oscuro a 26 ± 1 °C y 50% de humedad relativa.

2.6. Variables evaluadas

A los 30 días se evaluaron las variables respuesta a excepción de la formación de embriones que fue evaluada a los 51 días,

las cuales se mencionan a continuación: Oscurecimiento de hoja, esta fue evaluada dependiendo del grado del cambio de coloración del explante que comprendieron rangos de 0 a 100%. La contaminación, este valor fue asignado con relación a la presencia o ausencia de hongos o bacterias en las unidades experimentales sin considerar el tipo, tamaño o grado de infección en el tejido. La callogénesis se evaluó de acuerdo a la ausencia o presencia de al menos un callo de 0.6 mm de diámetro. Para la necrosis, se asignaron como tejidos necróticos todos aquellos que no mostraron ninguna respuesta morfológica y una coloración café oscuro o negra y sin capacidad de reactivar el crecimiento. Para la formación de embriones, se evaluó la formación de embriones en sus diversas etapas (globular, acorazonado, torpedo y cotiledonar), para ello se consideró que presentasen un color blanco, forma de cualquiera de sus etapas y textura compacta. El porcentaje de humedad se determinó de forma gravimétrica con base a la fórmula $H = \frac{(Pf - Ps)}{Pf} \times 100$; donde Pf es el peso fresco, Ps el peso seco. Peso fresco. Para esta variable, en condiciones asépticas se colectó todo el callo producido en los segmentos de hoja a los 30 días y se procedió a pesarlo en una balanza electrónica con precisión de mg. El peso seco se determinó en muestras sometidas a 70 °C por 48 h.

2.6.1. El potencial hídrico y sus componentes

La determinación del potencial hídrico se realizó colocando las muestras en cámaras psicométricas Wescor®, conectadas a un microvoltímetro wescor® HT-33T. Posteriormente, las muestras fueron congeladas durante 24 h con la finalidad de romper las membranas celulares y evaluar el potencial osmótico. Cada lectura contó con tres repeticiones, así mismo éstas eran de pesos homogéneos. Ambas lecturas fueron convertidas en bares mediante las ecuaciones de regresión lineal obtenidas en la calibración de las cámaras con diferentes soluciones de NaCl. El potencial de turgencia se calculó despejando y sustituyendo los valores de la ecuación algebraica del potencial hídrico ($\Psi_w = \Psi_\pi + \Psi_p$).

2.6.2. Consistencia del callo

Esta variable representa un indicador de lo granuloso y húmedo que puede estar un callo. Lo anterior está asociado con el grado de formación de agregados celulares y forma específica de las células. Para esta variable se consideró el siguiente criterio de evaluación; AC = consistencia arenosa compacta. El callo con esta consistencia fue de calidad, con células competentes para la multiplicación sin perder la capacidad de formar agregados celulares, conformado principalmente por células isodiamétricas. Al ser disgregado al tacto el callo se dispersa formando gránulos compactos, de consistencia arenosa. Este tipo de callo se considera como altamente reactivo para la formación de líneas embriogénicas en medios líquidos con alta capacidad de diferenciación de embriones. AFD = arenosa de fácil dispersión. Correspondió a callos con calidad intermedia/alta; también forman agregados celulares y está conformado por células isodiamétricas; en algunos casos es efectivo en la formación de líneas embriogénicas. Al ser disgregado al tacto el callo se

dispersa formando gránulos de menor tamaño que los del AC, pero con una consistencia arenosa parecida. P = consistencia pastosa. Son los callos de baja calidad; aunque forman agregados celulares idénticos a los de AC y AFD, al ser disgregado al tacto éste no se dispersa, queda unido formando una masa con características plásticas. Al ser colocados en medios líquidos para su multiplicación se oscurecen y mueren o en otros casos se multiplican, pero sin ninguna capacidad para diferenciar embriones somáticos. FD = de fácil dispersión. Son callos con apariencia embriogénica, es decir que forma agregados celulares, pero su coloración es más vítrea y al ser disgregado al tacto, se dispersa o desintegra por completo, sin dejar rastro aparente a simple vista. Este callo puede multiplicarse en medios líquidos, pero no responderá a la formación de embriones.

2.7 Diseño experimental y análisis de datos

La recopilación de los datos de cada una de las variables evaluadas en las distintas etapas del experimento fue realizada a los 3, 6, 10, 15 y 30 días después del establecimiento del cultivo. El diseño utilizado correspondió a un completamente al azar con arreglo factorial. Los análisis estadísticos se efectuaron por separado para cada tipo de hoja, 18 tratamientos para hoja tierna y 18 para hoja joven, aunque para el análisis factorial se consideraron los 36 tratamientos. Se utilizó la prueba de Tukey para la comparación de medias, con un nivel de significancia de 0.05, así como el cálculo del error estándar mediante el paquete estadístico SAS System para Windows 9.0.

3. Resultados y Discusión

A los 30 días después del establecimiento se observaron diferencias significativas ($P < 0.05$) entre los tratamientos de las variables de oscurecimiento y contaminación, tanto para las hojas tiernas como jóvenes; mientras que para las variables de callogénesis y formación de embriones sólo presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de la hoja tierna. En el caso de las necrosis solamente el tipo de hoja joven presentó diferencias significativas (Cuadro 1). Fue posible observar que los niveles de oscurecimiento fueron mayores para la hoja tierna con valores de 10 a 65%, comparado con las hojas jóvenes que presentaron de 0 a 42% de oscurecimiento (Cuadro 1). En el análisis factorial la hoja tierna presentó más del doble de oscurecimiento que la hoja joven (Cuadro 2). Así mismo, es importante señalar que la mayoría de los tratamientos constituidos por la sección media, en ambos tipos de hojas, fueron los que presentaron mayor porcentaje de explantes oscurecidos (Cuadro 1). Lo anterior es posible identificarlo en el Cuadro 2, donde no solo la sección media sino también la apical, presentaron un porcentaje promedio entre 34 y 35%. En la hoja tierna, el tratamiento 12 (Media/Phy16) fue el que indujo el menor cambio de coloración y el tratamiento 9 (Media/Sac80) fue el más reactivo para oscurecer los explantes (Cuadro 1). Para la hoja joven los porcentajes más bajos se registraron en los tratamientos 1 (Basal/Sac30), 4 (Basal/Phy5.2), 7

(Media/Sac30) y 10 (Media/Phy5.2), los cuales tuvieron en común el medio testigo con la concentración más baja de sacarosa y phytigel; mientras que el valor más alto se registró con el tratamiento 11 (Media/Phy8).

Los porcentajes de contaminación difirieron entre los tratamientos para cada tipo de hoja. Para la hoja tierna se encontró que el 88% de los tratamientos presentaron niveles bajos y favorables, los cuales fueron de 0 a 10%, así como un 20% como valor más alto (Cuadro 1). Por otro lado, en hojas jóvenes se observó un comportamiento contrario, donde los niveles de contaminación sobrepasaron a los consignados para las hojas tiernas, pues la gama de valores fue de 20 a 100%. Sin embargo, entre ambos tipos de hojas se detectó una similitud en la respuesta propiciada por los tratamientos 7 (Media/Sac30) y 10 (Media/Phy5.2); ambos indujeron los porcentajes más altos de contaminación, mientras que el valor más bajo para la hoja joven se presentó en el tratamiento 3 (Basal/Sac80).

En el caso del análisis factorial el tipo y sección de hoja, así como la concentración del agente osmótico, fueron los factores que influyeron en los niveles de contaminación; donde la hoja tierna, la sección basal y la segunda concentración del agente osmótico fueron los que en general contribuyeron a una menor manifestación de hongos (Cuadro 2). Los bajos niveles de contaminación en hojas tiernas se han relacionado directamente con la edad de la misma, ya que debido a que es un tejido nuevo su interacción con el ambiente, dígame incidencia y hospedaje de microorganismos, es menor comparado con un tejido joven (López-Gómez et al., 2010).

Para la variable de callogénesis se presentaron diferencias significativas sólo para la hoja tierna; aunque en este caso la mayoría de los tratamientos no difirió estadísticamente ($P < 0.05$), a excepción del tratamiento 18 (Apical/Phy16) que presentó el porcentaje más bajo (35%). Los tratamientos 5 (Basal/Phy8) y 17 (Apical/Phy8) presentaron los valores más altos (100%) de inducción de callo (Cuadro 1). En el Cuadro 1 fue posible identificar que ambos tipos de hojas, los tratamientos constituidos por la sección basal y apical indujeron los porcentajes más altos comparados con la sección media de la hoja. Estos resultados son similares con estudios realizados por Freire et al. (2004), en *Persea americana*, aunque en este caso se obtuvieron mayores porcentajes de formación de callos en las sección basal y media del limbo de la hoja, sobre todo cuando utilizaron como medio de cultivo las sales de Murashige y Skoog (1962) con 1 mg L^{-1} de picloram. Los autores en cuestión, relacionaron la mayor producción de callo al hecho de la cercanía del peciolo a la sección basal y al mayor desarrollo de la nervadura central de la sección media comparada con la sección apical. Si bien, en el caso del presente trabajo, ningún explante de café presentó nervadura central, la mayor producción de callo en la sección basal podría bien estar relacionada con una mayor cercanía al peciolo; así como a los mayores niveles de ácido indolacético que generalmente se reportan para la base de las hojas (Hartmann y Kester,

1989), mientras que la mayor producción de callo en la sección apical podría estar relacionada con una mayor distribución de carbohidratos, tal como señalan Hartmann y Kester (1989). Aunque no se registraron diferencias significativas para la hoja tierna, la sección basal y apical indujeron porcentajes promedio de 86 y 79%, respectivamente, mientras que la sección media sólo presentó el 73%. La misma relación fue observada en la hoja joven, aunque con porcentajes menores con respecto a la hoja tierna;

en este caso la sección basal y apical indujeron valores de 18 y 23%, respectivamente, y de 16% para la sección media. La capacidad morfogénica de las hojas tiernas con respecto a la mayor generación de callo en menos tiempo, comparado con el generado en hojas jóvenes, se debe principalmente a que los tejidos más tiernos tienen mayor capacidad de adaptación al establecimiento *in vitro* que los materiales adultos, es decir, entre menos diferenciado sea el tejido mejor será la capacidad de respuesta (López-Gómez et al., 2010).

Cuadro 1. Efecto de la combinación de tipos de explantes foliares con diferentes concentraciones de sacarosa y phytigel para el control de la hiperhidratación en *Coffea canephora* P. INIFAP 95-9. Datos promedio de 10 a 20 repeticiones a los 30 días después.

Tratamiento	Oscurecimiento (%)	Contaminación (%)	Callogénesis (%)	Necrosis (%)	Formación de embriones (%)
Hoja tierna					
1. Basal/Sac30	17.5 ab†	5.0 b	95.0 a	0.0 a	25.0 abc
2. Basal/Sac50	45.0 ab	0.0 b	85.0 a	10.0 a	30.0 abc
3. Basal/Sac80	20.0 ab	0.0 b	85.0 a	10.0 a	25.0 abc
4. Basal/Phy5.2	17.5 ab	5.0 b	95.0 a	0.0 a	25.0 abc
5. Basal/Phy8	22.5 ab	0.0 b	100.0 a	0.0 a	55.0 a
6. Basal/Phy16	45.0 ab	10.0 ab	60.0 ab	30.0 a	10.0 bc
7. Media/Sac30	50.0 ab	20.0 a	70.0 ab	10.0 a	0.0 c
8. Media/Sac50	35.0 ab	0.0 b	65.0 ab	10.0 a	20.0 abc
9. Media/Sac80	65.0 a	5.0 b	65.0 ab	15.0 a	20.0 abc
10. Media/Phy5.2	50.0 ab	20.0 a	70.0 ab	10.0 a	0.0 c
11. Media/Phy8	45.0 ab	0.0 b	90.0 a	10.0 a	10.0 bc
12. Media/Phy16	10.0 b	0.0 b	80.0 a	0.0 a	10.0 bc
13. Apical/Sac30	50.0 ab	10.0 ab	85.0 a	10.0 a	5.0 c
14. Apical/Sac50	45.0 ab	0.0 b	85.0 a	10.0 a	10.0 bc
15. Apical/Sac80	53.7 ab	0.0 b	85.0 a	10.0 a	30.0 abc
16. Apical/Phy5.2	50.0 ab	10.0 ab	85.0 a	10.0 a	5.0 c
17. Apical/Phy8	26.2 ab	0.0 b	100.0 a	0.0 a	50.0 ab
18. Apical/Phy16	45.0 ab	10.0 ab	35.0 b	10.0 a	20.0 abc
Hoja joven					
1. Basal/Sac30	0.0d	100.0 a	0.0 a	0.0 b	0.0
2. Basal /Sac 5 0	25.0 abcd	60.0 ab	40.0 a	0.0 b	0.0
3. Basal/Sac80	5.0 d	20.0 b	20.0 a	0.0 b	0.0
4. Basal/Phy5.2	0.0 d	100.0 a	0.0 a	0.0 b	0.0
5. Basal/Phy8	37.5 ab	30.0 ab	30.0 a	0.0 b	0.0
6. Basal/Phy16	40.0 abc	30.0 ab	20.0 a	0.0 b	0.0
7. Media/Sac30	0.0 d	100.0 a	0.0 a	0.0 b	0.0
8. Media/Sac50	15.0 abcd	70.0 ab	30.0 a	0.0 b	0.0
9. Media/Sac80	40.0 abc	60.0 ab	10.0 a	0.0 b	0.0
10. Media/Phy5.2	0.0 d	100.0 a	0.0 a	0.0 b	0.0
11. Media/Phy8	42.5 a	50.0 ab	20.0 a	0.0 b	0.0
12. Media/Phy16	20.0 abcd	60.0 ab	40.0 a	0.0 b	0.0
13. Apical/Sac30	10.0 cd	50.0 ab	20.0 a	20.0 a	0.0
14. Apical/Sac50	10.0 bcd	70.0 ab	30.0 a	0.0 b	0.0
15. Apical/Sac80	40.0 abc	60.0 ab	40.0 a	0.0 b	0.0
16. Apical/Phy5.2	10.0 cd	50.0 ab	20.0 a	20.0 a	0.0
17. Apical/Phy8	7.5 abcd	70.0 ab	30.0 a	0.0 b	0.0
18. Apical/Phy16	20.0 abcd	60.0 ab	0.0 a	10.0 a	0.0

† Medias con letras distintas por columna y tipo de hoja son estadísticamente diferentes (Tukey \leq 0.05). Para el ANOVA, los datos de cada variable fueron transformados con la fórmula raíz x+1. Basal, Media y Apical: secciones de la hoja; Sac 30, 50 y 80 g L⁻¹: Diferentes concentraciones de sacarosa; Phy 5.2, 8 y 16 g L⁻¹ diferentes concentraciones de phytigel.

Con respecto al análisis factorial (Cuadro 2), se observó que el tipo de hoja y la concentración del agente osmótico, fueron

las que afectaron la callogénesis al presentar diferencias significativas entre ambos niveles; de tal forma que la hoja

tierna superó en un 60% a la hoja joven; mientras que la concentración dos de sacarosa o phytigel superó con 10 a 15% a la concentración 1 (Testigo) y 3, respectivamente. Para la necrosis sólo se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos de la hoja joven, en los cuales el 13 (Apical/Sac30), 16 (Apical/Phy5.2) y 18 (Apical/Phy16) tuvieron valores altos (10 y 20 %). Estos formaron parte de la sección apical de la hoja (Cuadro 1) y los tratamiento 13 y 16 corresponden al testigo. Por otro lado, se apreció una diferencia en el grado de sensibilidad de los explantes de hojas tierna y joven, ya que la hoja tierna reaccionó con mayor intensidad al medio de cultivo al producir un mayor porcentaje de necrosis (Cuadro

2). Sin embargo, para efectos de este trabajo los valores consignados de necrosis se consideran bajos. Por otro lado, se apreciaron diferencias significativas para la formación de embriones globulares en hojas tiernas (Cuadro 1). En este caso los tratamientos 5 (Basal/Phy8) y 17 (Apical/Phy8) generaron los mayores porcentajes de embriones, un 55 y 50% respectivamente; el resto de los tratamientos presentaron porcentajes de 0 a 30 %. No obstante, es importante mencionar que tanto la hoja tierna como la sección basal y la segunda concentración de sacarosa y phytigel propiciaron una mayor formación de embriones (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis factorial de la interacción del tipo de explante y concentraciones de sacarosa y phytigel, como agentes osmóticos, en hojas tiernas y jóvenes de *Coffea canephora*. Datos a los 30 días después de la siembra.

Factor	Oscurecimiento (%)	Contaminación (%)	Callogénesis (%)	Necrosis (%)	Formación de embriones (%)
Tipo de hoja					
Hoja tierna	38.4 a†	5.2 b	79.7 a	8.6 a	19.4 a
Hoja joven	17.9 b	63.3 a	19.4 b	2.7 b	0.0 b
Sección de hoja					
Basal	24.5 b	21.1 b	63.8 a	5.5 a	18.8 a
Media	34.8 ab	29.4 a	54.4 a	6.1 a	6.6 b
Apical	35.4 a	23.3 ab	60.5 a	8.3 a	13.3 ab
Agente osmótico					
Sacarosa	33.6 a	24.8 a	60.3 a	7.0 a	12.2 a
Phytigel	29.6 a	24.4 a	58.8 a	6.2 a	13.7 a
Concentración del agente osmótico					
1. Testigo	27.2 a	35.5 a	57.7 b	6.6 a	6.6 b
2. 50 g L ⁻¹ Sac o 8 g L ⁻¹ Phy	31.9 a	19.4 b	68.3 a	4.4 a	19.4 a
3. 80 g L ⁻¹ Sac o 16 g L ⁻¹ Phy	35.6 a	18.8 b	52.7 b	8.8 a	12.7 ab

† Medias con letras distintas por columna son estadísticamente diferentes (Tukey≤0.05) de acuerdo con la transformación raíz de X+1; Sac 50 y 80 g L⁻¹: Diferentes concentraciones de sacarosa; Phy 8 y 16 g L⁻¹ diferentes concentraciones de phytigel.

En el Cuadro 3 se consignan las relaciones hídricas y la acumulación de biomasa en hojas tiernas. En este caso se registró que para todas las secciones de hoja (basal, media y apical), el Ψw disminuyó de forma importante al incrementar de 30 a 80 g L⁻¹ la sacarosa o de 5.2 a 16 g L⁻¹ el phytigel; i.e., el Ψw del medio con la concentración testigo de sacarosa (30 g L⁻¹) y phytigel (5.2 g L⁻¹) fue mayor. La disminución del potencial químico del agua de los callos, al elevar la concentración del agente osmótico, estuvo asociada con el incremento considerable de solutos en los callos. Esto se debió a que el Ψπ disminuyó al elevar la concentración de los agentes osmóticos para cada sección de la hoja tierna (Cuadro 3). La disminución tanto del Ψw como del Ψπ, al elevar la concentración del agente osmótico, propició el mantenimiento o incluso incrementos en el Ψp para la mayoría de las secciones de hoja tierna. Debido a estos resultados, se consideró que los callos de las diferentes secciones tuvieron la capacidad de osmorregulación al mantener el Ψp por la acumulación activa de solutos. Al

respecto, López-Gómez et al. (2011) consignan que las hojas de este mismo genotipo presentan una tolerancia a concentraciones elevadas de agentes osmóticos como el hipoclorito de calcio al 7 %. De igual forma Galvez-López et al. (2016), señalan que las hojas de este mismo genotipo presentan una marcada capacidad de ajustarse osmóticamente ante los incrementos de hipoclorito de calcio o sodio. Por otra parte, el medio de cultivo testigo, con las concentraciones más bajas de sacarosa (30 g L⁻¹) o phytigel (5.2 g L⁻¹), fue el menos indicado para controlar la humedad o hiperhidratación de los callos. Lo anterior estuvo asociado con el hecho de que estos tratamientos testigo presentaron, en todos los casos, un mayor porcentaje de humedad que fue de 72 a 83 %; mientras que los tratamientos con aumento de sacarosa y phytigel fueron de 63 a 76%. Todo ello significa que los callos en los tratamientos testigo presentaron mayor contenido de humedad o hiperhidratación. Por tal motivo fueron los callos con mayor peso fresco (Cuadro 3). Esto puede observarse en la Figura 1.

Cuadro 3. Relaciones hídricas y acumulación de biomasa en callos producidos en tres tipos de secciones de hojas tiernas de *C. canephora* P., INIFAP 95-9, sometidos a diferentes concentraciones de agentes osmóticos. Promedio de tres repeticiones ± error estándar.

Tratamiento	Ψ_w (bares)	$\Psi\pi$ (bares)	Ψ_p (bares)	Humedad (%)	Peso fresco (mg)	Consistencia de callo
1. Basal/Sac30	-6.25±3.9	-7.92±4.7	1.67±0.4	82.8	8.6	DF
2. Basal/Sac50	-10.72±4.6	-18.66±12.5	7.93±9.4	76.2	4.9	AC y P
3. Basal/Sac80	-11.58±9.7	-14.45±13.0	2.88±1.4	74.0	2.0	AFD y P
4. Basal/Phy5.2	-6.25±3.9	-7.92±4.7	4.81±5.2	82.8	8.6	FD
5. Basal/Phy8	-14.16±3.9	-28.07±17.5	13.91±14.1	76.8	5.6	AC
6. Basal/Phy16	-14.60±7.4	-17.49±8.4	2.89±1.5	77.0	4.2	AFD y P
7. Media/Sac30	-6.28±2.2	-12.37±4.4	3.08±2.5	81.6	10.3	AFD
8. Media/Sac50	-14.30±6.5	-34.63±24.9	20.33±18.6	72.2	2.4	AFD
9. Media/Sac80	-11.56±10.7	-17.92±12.6	6.35±5.4	72.0	1.4	AC
10. Media/Phy5.2	-6.28±2.2	-9.37±4.4	3.08±2.5	72.0	10.3	AFD
11. Media/Phy8	-15.16±4.1	-27.80±25.0	12.50±20.1	72.2	11.6	AFD
12. Media/Phy16	-19.19±8.4	-29.13±9.2	9.94±11.1	74.0	2.9	AFD y P
13. Apical/Sac30	-5.32±2.7	-7.46±4.0	2.14±1.8	83.8	17.5	AFD
14. Apical/Sac50	-13.61±5.5	-26.52±18.1	12.91±16.8	77.9	4.6	AFD y P
15. Apical/Sac80	-13.45±9.5	-17.69±10.8	4.24±3.5	71.0	1.7	FD y P
16. Apical/Phy5.2	-5.32±2.7	-7.46±4.0	2.14±1.8	83.8	17.5	AFD
17. Apical/Phy8	-16.63±12.9	-29.07±22.0	12.44±6.2	75.0	14.3	AC
18. Apical/Phy16	-9.63±4.8	-16.07±9.4	6.44±3.7	63.0	2.1	AFD y P

Ψ_w : potencial hídrico, $\Psi\pi$: potencial osmótico; Ψ_p : potencial de turgencia; Basal, Media y Apical: secciones de la hoja; Sac 30, 50 y 80: Diferentes concentraciones ($g L^{-1}$) de sacarosa; Phy 5.2, 8 y 16: diferentes concentraciones ($g L^{-1}$) de phytágel. AC= consistencia arenosa compacta. AFD= arenosa de fácil dispersión. P= consistencia pastosa. FD= de fácil dispersión.

Invariablemente se apreció que, sin importar la sección de la hoja tierna, los tratamientos 2, 5, 8, 11, 14 y 17, con concentraciones intermedias de sacarosa ($50 g L^{-1}$) o phytágel ($8 g L^{-1}$), fueron los que indujeron un menor $\Psi\pi$ o mayor acumulación de solutos y por tanto un mayor Ψ_p (Cuadro 3). Así mismo, estos tratamientos demostraron disminuir el contenido de humedad en los callos a valores de 72 a 77% y peso fresco de 2.4 a 14.3 mg.

diferenciación. En este caso este tipo de callo fue identificado en hojas tiernas sólo en los tratamientos 2 (Basal/Sac50), 5 (Basal/Phy8), 9 (Media/Sac80) y 17 (Apical/Phy8). Aunque en el tratamiento 2 (Basal/Sac50) el callo arenoso compacto estuvo mezclado con callo de consistencia pastosa, el cual no es deseable por no ser reactivo a la formación de líneas embriogénicas. Por tal motivo, se considera que el medio de cultivo con un incremento de $8 g L^{-1}$ de phytágel es recomendable para la producción de callo de calidad en la sección basal y apical de hojas tiernas; mientras que esta misma concentración en la sección media induce un callo de consistencia arenosa de fácil dispersión, lo cual se considera aceptable para la producción de líneas embriogénicas. En la sección media el incremento de $80 g L^{-1}$ de sacarosa produjo un callo arenoso compacto.

Lo anterior indica que los callos producidos por las diferentes secciones de hoja tierna tuvieron capacidad de osmorregulación y por tanto una disminución de la hiperhidricidad; aunque esto no fue una garantía para la producción de callo de consistencia arenosa y compacta o callo arenoso de fácil dispersión. Sin embargo, en todos los tratamientos con presencia de callo arenoso y compacto, en su gran mayoría correspondieron a la concentración media del agente osmótico ($50 g L^{-1}$ de sacarosa u $8 g L^{-1}$ de phytágel). Lo anterior indica que el incremento de los agentes osmóticos en el medio de cultivo reduce la hiperhidratación y en ciertos casos mejoran la calidad del callo en hojas tiernas.

El Cuadro 4 presenta las relaciones hídricas y peso fresco para cada sección de hoja joven; en este se consigna que el incremento de las concentraciones de los agentes osmóticos

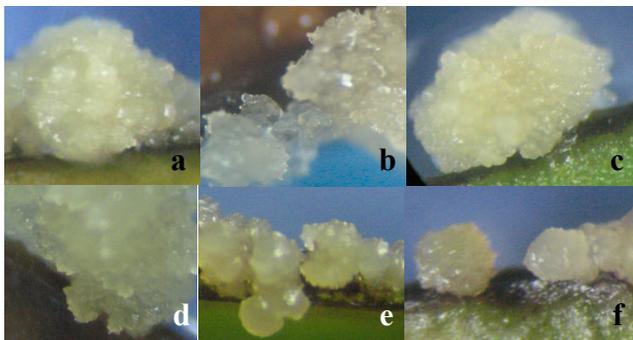


Figura 1. Callos generados a partir de secciones de hoja tierna en diferentes concentraciones de sacarosa y phytágel como agentes osmóticos para el control de la hiperhidratación. a) Callo en $30 g L^{-1}$ de sacarosa; b) $50 g L^{-1}$ de sacarosa; c) $80 g L^{-1}$ de sacarosa; d) $5.2 g L^{-1}$ de phytágel; e) $8 g L^{-1}$ de phytágel y f) $16 g L^{-1}$ de phytágel.

Al analizar los callos producidos en función de su calidad, se encontró que la consistencia arenosa compacta (AC), es la que caracterizó a los callos de mayor calidad, sin hiperhidratación, con potencial elevado para generar líneas embriogénicas con alta capacidad de multiplicación y

sólo influyó en la disminución del Ψ_w y Ψ_π en los tratamientos 2 (Basal/Sac50) y 18 (Apical/Phy16). Con el resto de los tratamientos, el aumento de la concentración de sacarosa y phytigel no afectó el Ψ_w . De forma general los tratamientos que si presentaron reducción del Ψ_w fueron los tratamientos 2 (Basal/Sac50), 7 (Media/Sac30), 10

(Media/Phy5.2) y 18 (Apical/Phy16). Así mismo estos manifestaron un incremento de la acumulación activa de solutos al disminuir el Ψ_π , aunque esto no repercutió en el mantenimiento del Ψ_p , con valores elevados. No obstante, de éstos, el tratamiento 7 y 10 correspondieron a callos en el medio con la concentración más baja de sacarosa y phytigel.

Cuadro 4. Relaciones hídricas y acumulación de biomasa en callos producidos en tres tipos de secciones de hojas jóvenes de *C. canephora* P., INIFAP 95-9, sometidos a diferentes concentraciones de agentes osmóticos. Promedio de tres repeticiones \pm error estándar.

Tratamiento	Ψ_w (bares)	Ψ_π (bares)	Ψ_p (bares)	Humedad (%)	Peso fresco (mg)	Consistencia
1. Basal/Sac30	-9.32 \pm 6.1	-19.45 \pm 13.7	7.45 \pm 3.9	73.5	2.0	AFD
2. Basal/Sac50	-21.91 \pm 13.3	-26.45 \pm 14.0	4.54 \pm 1.8	62.7	7.2	AFD
3. Basal/Sac80	-15.75 \pm 11.6	-19.32 \pm 11.3	3.57 \pm 0.6	65.7	1.57	P
4. Basal/Phy5.2	-9.32 \pm 6.1	-19.45 \pm 13.7	7.45 \pm 3.9	73.5	2.0	AFD
5. Basal/Phy8	-17.45 \pm 10.4	-19.37 \pm 9.7	1.92 \pm 0.8	72.7	1.65	AFD
6. Basal/Phy16	-8.19 \pm 4.4	-22.25 \pm 14.0	14.06 \pm 10.1	77.5	5.7	AFD y P
7. Media/Sac30	-25.95 \pm 10.3	-28.79 \pm 11.4	2.84 \pm 2.1	73.0	3.0	AFD
8. Media/Sac50	-14.69 \pm 9.1	-17.99 \pm 8.8	3.30 \pm 2.09	61.5	3.4	AFD
9. Media/Sac80	-15.11 \pm 10.2	-20.5 \pm 9.3	5.45 \pm 2.5	66.4	3.5	P
10. Media/Phy5.2	-25.95 \pm 10.3	-28.79 \pm 11.4	2.84 \pm 2.1	73.0	3.0	AFD
11. Media/Phy8	-8.87 \pm 4.8	-25.75 \pm 9.8	16.88 \pm 8.2	74.5	11.7	AC
12. Media/Phy16	-9.35 \pm 4.5	-20.84 \pm 11.9	11.49 \pm 10.8	62.5	3.5	AC y P
13. Apical/Sac30	-14.54 \pm 8.0	-19.81 \pm 8.6	5.27 \pm 4.3	71.5	9.2	AFD
14. Apical/Sac50	-13.46 \pm 10.2	-15.57 \pm 10.0	2.11 \pm 1.8	65.9	4.0	P y FD
15. Apical/Sac80	-16.78 \pm 8.9	-21.74 \pm 8.2	4.96 \pm 2.9	73.9	2.3	P y FD
16. Apical/Phy5.2	-14.54 \pm 8.0	-19.81 \pm 8.6	5.27 \pm 4.3	71.5	9.2	AFD
17. Apical/Phy8	-13.37 \pm 8.6	-20.79 \pm 7.0	7.42 \pm 1.9	75.0	6.8	AFD y P
18. Apical/Phy16	-17.44 \pm 11.2	-27.38 \pm 18.3	9.94 \pm 7.2	72.3	6.0	AFD y P

Ψ_w : potencial hídrico, Ψ_π : potencial osmótico; Ψ_p : potencial de turgencia; Basal, Media y Apical: secciones de la hoja; Sac 30, 50 y 80 g L⁻¹: Diferentes concentraciones de sacarosa; Phy 5.2, 8 y 16 g L⁻¹: diferentes concentraciones de phytigel. AC= consistencia arenosa compacta. AFD= arenosa de fácil dispersión. P= consistencia pastosa. FD= de fácil dispersión.

Lo anterior hace pensar que los incrementos de sacarosa y phytigel en las diferentes secciones de hojas jóvenes no influyeron en la reducción de la humedad o la hiperhidratación del callo generado. Sin embargo, podría existir la posibilidad de que el efecto de estos agentes osmóticos sea más tardado para el tejido con mayor grado de madurez que caracteriza a la hoja joven por lo que el tiempo de 30 días no haya sido suficiente para detectar tal efecto.

Por otro lado, la consistencia de los callos de mayor calidad y con potencial para generar líneas embriogénicas (AC) fue posible identificarlo en el tratamiento 11 (Media/Phy8) y 12 (Media/Phy16), lo cual puede observarse en la Figura 2.

Aunque en este último caso se generó callo de tipo pastoso de características no deseables y el cual es poco reactivo en la producción de líneas embriogénicas. Así mismo se pudo apreciar que para cada sección de hoja, todos los tratamientos con el medio testigo (1, 4, 7, 10, 13 y 16) generaron un callo arenoso, pero de fácil dispersión que puede ser aceptable para la producción de líneas embriogénicas.

Con base a los resultados obtenidos se considera que para la hoja joven no es viable hacer una recomendación confiable ya que el tiempo de 30 días parece no ser ni siquiera para la medición del callo. Por lo que es necesario evaluarlo a los 60 o incluso a los 70 días. No obstante, para las tres secciones de hojas se podría utilizar el medio testigo (30 g L⁻¹ de sacarosa

y 5.2 g L⁻¹ de phytigel) y adicionalmente el complementado con 8 g L⁻¹ de phytigel para la sección media de la hoja.

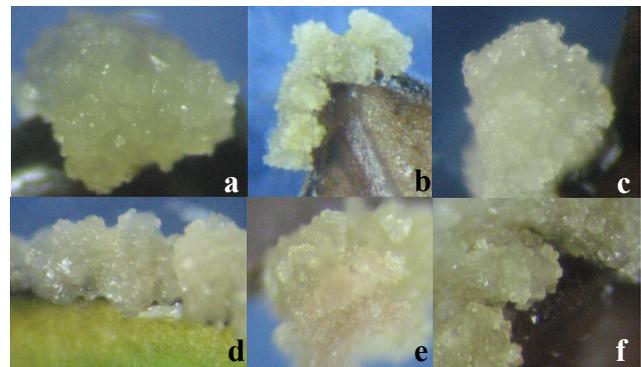


Figura 2. Callos inducidos a partir de secciones de hojas jóvenes con diferentes concentraciones de sacarosa y phytigel. a) Callo con 30 g L⁻¹ de sacarosa; b) 50 g L⁻¹ de sacarosa; c) 80 g L⁻¹ de sacarosa; d) 5.2 g L⁻¹ de phytigel; e) 8 g L⁻¹ de phytigel y f) 16 g L⁻¹ de phytigel.

4. Conclusión

Fue posible controlar la hiperhidricidad en callos inducidos a partir de diferentes secciones foliares. Los explantes de hoja tierna difirieron en capacidad y velocidad de respuesta

morfogénica y de osmorregulación con respecto a los explantes de hoja joven. Las secciones de hojas tiernas produjeron una mayor respuesta morfológica en cuanto a la producción de callo, embriones y peso fresco; así como una mayor capacidad de osmorregulación sobre todo en la sección basal y apical de la hoja, conforme se incrementó la concentración de sacarosa y phytigel. Se produjo callo de alta calidad (consistencia arenosa compacta) o intermedia (arenosa de fácil dispersión), con bajo contenido de humedad en cada una de las secciones de hoja tierna y joven, los cuales fueron los siguientes: a) Sección basal, media y apical de hoja tierna en medio de cultivo con 8 g L⁻¹ de phytigel. b) Sección basal y apical de hoja joven en medio de cultivo con 5.2 g L⁻¹ de phytigel y 30 g L⁻¹ de sacarosa. c) Sección media de hoja joven en medio de cultivo con 8 g L⁻¹ de phytigel.

Agradecimientos

El presente trabajo forma parte del proyecto de investigación “Desarrollo de protocolos para la propagación de plantas por embriogénesis somática de café y cacao”, con financiamiento Fiscal del INIFAP. SIGI: 11324919999.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses

Referencias

Avila-Victor CM, Ordaz-Chaparro VM, Arjona-Suárez EJ, Iracheta-Donjuan L, Gómez-Merino FC, Robledo-Paz A. 2023. *In vitro* mass propagation of coffee plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through indirect somatic embryogenesis. *Plants* 12: 1237.

Berthouly M. 1997. Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica* L. In: *Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura*. Heredia, Costa Rica. pp 25-49.

Brand M. 1993. Agar and ammonium nitrate influence hyperhricity, tissue nitreand total nitrogen content of serviberry (*Almelanchier arborea*) shoots *in vitro*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 1: 275-281.

Cárdenas LMA. 1999. Osmorreguladores en cultivo *in vitro* de porta injertos de cítricos. Tesis de Doctorado. Colegio de Posgraduados. Montecillo. Texcoco. Edo. de México, México. 94 p.

Clifford MN, Willson KC. 1985. Coffee: botany, biochemistry and production of beans and beverage. American Edition. Westport, Connecticut. 457 p.

Freire SM, Balsero F, Gomez K. 2004. Formación de callos de *Persea americana* Mill. cultivar Catalina a partir de segmentos de hojas de plantas *in vitro*. *Biotecnología Vegetal* 2: 85-90.

Gálvez-López, AL, Iracheta-Donjuan L, Medina-Ovando I, Aguirre-Medina JF. 2016. Relaciones hídricas en explantes foliares de *Coffea canephora* (Pierre) ex Froeher. *Agroproductividad* 9(10): 26-31.

Gamborg OL. 2002. Plant tissue culture. The technology. Part 1. Exegetics Ltd. Edington. 547 p.

George EF. 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1, The Technology. Exergetics Ltd. Edington, Wilts. England. 574 p.

Harman TH, Kester ED. 1989. Propagation de plantas, principios y prácticas, Ed. Continental. México, D.F. 760 p.

Henderson TP. 2019. La roya y el futuro del café en Chiapas. *Revista Mexicana de Sociología* 81(2): 389-416.

Ivanova M, Staden JV. 2011. Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 104: 13–21.

Kevers C, Franck T, Strasser RJ, Dommès J, Gaspar T. 2004. Hyperhydricity of micropropagated shoots: atypically stress-induced change of physiological. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 77: 181-191.

López-Gómez P, Iracheta-Donjuan L, Castellanos-Juárez M, Méndez-López I, Aguirre-Medina JF, Gutiérrez-Díez A, Ojeda-Zacarias MC, Pérez-Pérez BR. 2011. Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. cultivados *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 2(5): 645-657.

López-Gómez P, Iracheta-Donjuan L, Castellanos-Juárez M, Méndez-López I, Sandoval-Esquivéz A, Aguirre-Medina JF, Ojeda-Zacarias MC, Gutiérrez-Díez A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(3): 205-213.

López-Gómez P, Iracheta-Donjuan L., Ojeda-Zacarias MC, Ducos JP. 2016. Medio de cultivo e inhibidores de etileno en la embriogénesis somática de café. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(7): 1749-1757.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473.

Quintana-Escobar AO, Iracheta-Donjuan L, Méndez-López I, Alonso-Báez M. 2017. Caracterización de genotipos élite de *Coffea canephora* por su tolerancia a la sequía. *Agronomía Mesoamericana* 28(1): 183-198.

Saher S, Piqueras A, Hellin E, Olmos E. 2004. Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum* 120: 152-161.

Solano W. 2001. Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* L. por embriogénesis somática. Tesis Licenciatura. Universidad de Costa Rica. Turrialba, Costa Rica. 87 p.

Wintgens JN, Zamarripa CA. 2004. Coffee propagation In: *Coffee growing, processing, sustainable production*. Ed: Wintgens JN. (ed) Wiley-VCH Nestlé. KGaA, Weinheimpp: 87-136.

Yasuda T, Fuji Y, Yamaguchi T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant and Cell Physiology* 26: 595-597.

Yoshida F, Kobayashi T, Yoshida T. 1973. The mineral nutrition of cultured chlorophyllous cell of tobacco. Effects of sucrose, Ca, Cl and B in the medium on the yield, friability, chlorophyll contents and mineral absorption of cell. *Plant and Cell Physiology* 14: 329-339.

Ziv M. 1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants En: *Micropropagation technology and application*. Ed: Debergh, PC & R.H. Zimmerman. Kluwer Academic Publisher. U.S.A. 479 p.