

GERMINACIÓN Y DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE CAFÉ EN BIORREACTORES

[GERMINATION AND DEVELOPMENT OF COFFEE SEEDLINGS IN BIOREACTORS]

Iván Leal-García¹, Joaquín Alejandro Qui-Zapata², Martín Eduardo Ávila-Miranda¹, Isaac Andrade-González¹, Mayra Itzcalotzin Montero-Cortés^{1§}

¹Tecnológico Nacional de México. Instituto Tecnológico de Tlajomulco. División de Estudios de Posgrado e Investigación. Km 10, carretera Tlajomulco-San Miguel Cuyutlán. C.P. 45640. Tlajomulco de Zúñiga, Jalisco, México. ²Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. Unidad de Biotecnología Vegetal. Camino Arenero 1227, El Bajío. C.P. 45019 Zapopan, Jalisco México.

§Autor para correspondencia: (mayra.mc@tlajomulco.tecnm.mx).

RESUMEN

El café es un cultivo agrícola de gran importancia económica en México. Sin embargo, una de las limitaciones para la producción de café en México es la afectación por enfermedades, entre ellas la roya, lo que hace necesario generar estrategias efectivas que puedan prevenir o combatirla. Para esto, es imprescindible contar con un gran número de plantas que permitan evaluar tratamientos efectivos que controlen la enfermedad. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó la germinación y el desarrollo de café en diferentes sistemas de propagación (convencional y biotecnológicas). Las semillas se sometieron a un proceso de desinfección y se colocaron en sustrato (estéril y no estéril), en papel filtro, en medio semisólido y en un sistema de inmersión temporal (SIT) en condiciones *in vitro*. A los 7 días después del establecimiento de la semilla se evaluó el porcentaje de germinación obteniéndose un 16% en sustrato estéril y 25% en papel filtro, el mejor resultado se observó en los sistemas de cultivo *in vitro* con un 41% de germinación en medio semisólido y 83% de germinación en SIT. En cuanto al desarrollo de la plántula (día 30 de cultivo), en los tratamientos con medio de cultivo (semisólido y líquido) se presentaron la mayor longitud de hipocótilo. El sistema que presentó los mejores parámetros fue el SIT, donde se obtuvieron plántulas con el desarrollo de cotiledones. Estos resultados son un primer paso para obtener material vegetal para optimizar otras vías de propagación.

Palabras clave: *Coffea arabica*, cultivo *in vitro*, germinación, semilla.

ABSTRACT

Coffee is an agricultural crop of great economic importance in Mexico. However, one of the limitations for coffee production in Mexico is the affectation by diseases, including rust. Therefore, it is necessary to generate effective strategies that can prevent or combat it, for these, it is essential to have a large number of plants that evaluate effective treatments that control the disease. Therefore, in this research the germination and development coffee seedling were evaluated in different propagation systems (conventional and biotechnological) were evaluated. The seeds were subjected to a disinfection process and were placed on substrate (sterile and non-sterile), on filter paper, in semi-solid medium and in a temporary immersion system (TIS) under *in vitro* conditions. The 7 days after the establishment of the seed, the germination percentage was evaluated, obtaining 16% in sterile substrate and 25% in filter paper, the best results were in vitro culture systems with 41% germination in semisolid medium and 83% germination in TIS. Regarding the development of the seedling (day 30 of culture), in the treatments with culture medium (semi-solid and liquid) the longest hypocotyl length is present. The system that presented the best parameters was the SIT, where seedlings with cotyledon development were obtained. These results are a first step to obtain plant material to optimize other propagation pathways.

Index words: *Coffea arabica*, *in vitro* culture, germination, seed.

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica* L.) es una planta originaria de Etiopía donde se desarrolla a una altura de 1,000 a 2,000 msnm y a una temperatura de 10 a 20 °C, las variedades y especies de café se desarrollan y adaptan bien en las regiones de la zona tropical (Haarer, 1958). A nivel mundial los principales productores de café son Brasil, Colombia, Etiopía y Honduras, mientras que México ocupa el séptimo lugar de producción con 198,000 t (USDA, 2020). En México, los principales estados productores son Chiapas (41.27%), Veracruz (24.39%), Puebla (15.78%), Oaxaca (8.19%) y Guerrero (4.51%) (CEDRSSA, 2018). En los últimos 10 años el café reportó su nivel mínimo en producción a nivel nacional con 835,380 t de café en cerezo. México cuenta con condiciones ideales para el cultivo del café, con zonas montañosas del sureste del país que se encuentran a altitudes mayores a 900 m, así como temperaturas en el rango de 17.5 a 25.3 °C. La caficultura en el país representa una actividad fundamental en el sector agrícola, no sólo por el valor de su producción, sino además por ser un importante generador de divisas, además por las bondades que ofrece al ser un cultivo de gran relevancia ambiental, puesto que el 99% de los predios cafetaleros se establecen bajo sombra (SIA-SAGARPA, 2015).

Por otra parte, la producción de café reportó su nivel mínimo desde que se tiene registro; uno de los principales factores que explican la disminución de la producción nacional durante la década reciente son la disminución de la superficie cosechada y la reducción de la productividad de los cafetales, relacionada principalmente con la avanzada edad de las plantaciones y afectaciones de la roya de la hoja de café, causada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Uredinales) es la principal enfermedad de variedades susceptibles de *C. arabica* alrededor del mundo. Aunque todo su ciclo de vida ocurre en las hojas, la clorosis y la defoliación afectan el llenado y la maduración de granos de café, reduciendo el tamaño y la calidad del grano (SAGARPA, 2016).

En *C. arabica*, después de un proceso de selección relativamente largo, unos veinte años como mínimo, las variedades comerciales son propagadas por semillas en viveros. Esta selección permite obtener una variedad generalmente estable y homogota con los caracteres buscados (Coste, 1968). Otra de las técnicas usadas en la multiplicación de plantas, es la propagación vegetativa, que permiten la multiplicación idéntica o clonación del material a gran escala. La multiplicación vegetativa juega un papel importante en especies perennes como el café, el cual puede ser propagado vegetativamente por medio de estacas o injerto (Coste, 1968; Solano, 2001). Los nuevos avances en la biotecnología generaron nuevas técnicas de propagación de plantas entre las cuales se encuentra la propagación por microesquejes, que consiste en el establecimiento de nudos o entrenudos proveniente del vástago de la planta, con el fin de obtener nuevos vástagos mediante el desarrollo de yemas preexistentes, las cuales podrán a su vez, proporcionar nuevos esquejes, o ser enraizados, obteniéndose así múltiples plantas idénticas a la planta madre (García y Rafael, 1990; Solano, 2001).

La propagación *in vitro* es una herramienta muy efectiva para generar plantas en la mayor parte del año, sin embargo, la tendencia por introducir nuevas tecnologías ha sido cada vez más progresiva, por lo que se implementó la semiautomatización de la micropropagación por medio de sistemas de inmersión temporal (SIT) que ofrecen una estrategia práctica en la reducción de costos de producción (Mordocco, 2009). Los SIT son biorreactores semiautomatizados diseñados para la propagación masiva de tejidos, embriones u organelos con medio líquido. El principio de estos sistemas es la inmersión de explantes tiempo y frecuencia determinado. Se ha demostrado que los SIT son herramientas poderosas para la micropropagación de plantas (Lorenzo, 1998).

Debido a la lenta y baja propagación de plantas de café en vivero con altos problemas fitosanitarios como la roya de café (*H. vastatrix*) y por la baja germinación al ser una semilla recalcitrante, es necesaria

la búsqueda de nuevas alternativas mediante el uso de herramientas biotecnológicas, técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* en medio semisólido y SIT, como alternativas para la rápida propagación clonal de cafetos libres de patógenos e independiente de la influencia estacional del ambiente para satisfacer la demanda de plántulas con mejor calidad y en menor tiempo. Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo optimizar el proceso de germinación y desarrollo de plántulas de café empleando sistemas de propagación convencional (sustrato y papel filtro) y biotecnológico (medio semisólido y SIT), en el que se evaluó tanto el porcentaje de germinación de semillas como parámetros de desarrollo de plántulas de café (*C. arábica*).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se recolectaron semillas de café (*C. arábica* var. *Typica*) de huertos de traspatio ubicados con las coordenadas (20°24'44''N 103°23'30''W), municipio de Tlajomulco Zúñiga, perteneciente a la región centro del Estado de Jalisco. Las semillas se trasladaron a las instalaciones del Tecnológico Nacional de México Campus Tlajomulco, en el laboratorio de cultivo de tejidos de la Planta Piloto para ser procesadas. Las semillas se lavaron con agua corriente, se despulparon manualmente (eliminación de pericarpio, pulpa, capa de pectina y pergamino) y se sometieron a una solución de cloro al 10% con 0.5 ml de tween 80/1 de solución durante 15 min, posteriormente se enjuagaron con agua corriente y se secaron en un secador de charolas (marca Polinox modelo TABIM094) a una temperatura de 30±2 °C durante 24 h, posteriormente las semillas se conservaron en un frasco de vidrio a temperatura ambiente (aproximadamente a 25±2 °C) para su posterior uso.

Sistema de inmersión temporal (SIT)

Para el armado de biorreactores, Sistema de Inmersión Temporal (SIT), se efectuó de acuerdo con Berthouly y Etienne (2005). Se emplearon frascos de vidrio con capacidad de medio litro con tapas metálicas, se realizaron dos orificios a la tapa, en los cuales se fijaron conexiones de plástico para fijar las mangueras al sistema con su respectivo filtro hidrofóbico de 0.22 micrómetros (µm). Se realizó la conexión de dos frascos a través de las mangueras, y se instalaron en el sistema previamente armado, conectado a un compresor de aire para permitir los recambios de medio de un frasco a otro para permitir la inmersión del explante en el medio de cultivo.

Desinfección de semillas de café

Para el establecimiento de las semillas en condiciones *in vitro*, las semillas despulpadas y secas se sometieron a un proceso de desinfección en condiciones asépticas con soluciones estériles. Se colocaron las semillas en una solución desinfectante con fungicida (benomilo) a una concentración de 1.0 g l⁻¹ y estreptomycin a una concentración de 0.3 g l⁻¹ durante 20 min. Posteriormente, se realizaron tres enjuagues con agua destilada, enseguida se colocaron en una solución al 30% de cloro comercial (cloralex) durante 20 min y se les dio tres enjuagues con agua destilada. Después se sumergieron en etanol al 70%) por 2 min y se realizaron nuevamente tres enjuagues con agua destilada. Finalmente, se transfirieron en una solución con 0.1 g l⁻¹ ácido ascórbico y 0.15 g l⁻¹ ácido cítrico durante 1 min y se transfirieron en los diferentes sistemas convencionales y biotecnológicos.

Establecimiento del experimento

Una vez desinfectadas las semillas se transfirieron a los siguientes tratamientos: TG0 (Control) sustrato no estéril 2:1:1 (*Peat moss*-Perlita-Dolomita). TG1. Sustrato estéril; TG2. Semillas en papel filtro, TG3. Semillas en medio semisólido y TG4. Semillas en biorreactor, SIT, con un tiempo de inmersión de un min cada seis horas. Todos los tratamientos se mantuvieron a 25±2 °C con fotoperiodo (16 h luz /8 h oscuridad) durante 30 días. La evaluación de la germinación se realizó hasta los 7 días, se consideró que la semilla

germinó cuando la radícula rompe la testa de la semilla cigótica. Para el sistema cerrado (medio semisólido) y el SIT (medio líquido).

Se preparó el medio ZG (por sus siglas en inglés *Zygotic Germination Medium*) para la germinación de la semilla de café (Quiroz, 2006), suplementado con 0.1 mg l^{-1} de ácido naftalenacético (ANA) y 0.5 mg l^{-1} de cinetina, también se adicionó 30 g l^{-1} de sacarosa y 4 gr l^{-1} de gelrite, se ajustó el pH a 5.8 antes de adicionar el gelificante. En el caso del medio semisólido y para los biorreactores (SIT) se realizó el mismo medio de cultivo sin adicionar el gelificante. Para el tratamiento con sustrato se preparó una mezcla de 60%, volumen/volumen (v/v) de *peat moss*, 20% (v/v) perlita y 20% (v/v) dolomita, la cual se hidrató con agua destilada para llevar el sustrato a capacidad de campo para su posterior esterilización a $120 \text{ }^{\circ}\text{C}$ a 117 kilopascales (kPa), durante 20 min.

Diseño experimental

Para el experimento de germinación de semillas y desarrollo de plántulas el diseño experimental fue de bloques completamente al azar. Los datos presentados corresponden a la media de cuatro replicas, cada una con cinco semillas. Para la germinación, se contabilizó las semillas germinadas en el día siete después de iniciada la hidratación de la semilla cigótica y se calculó el porcentaje de germinación. Para el desarrollo de la plántula se evaluó en el día treinta (después de la imbibición de la semilla cigótica) el número de raíces secundarias (NRS), la longitud de la raíz principal (LRP), la longitud del hipocótilo (HP) y el número de plantas que desarrollaron los cotiledones (NPC). Los datos fueron sujetos a un análisis de varianza. La comparación de medias fue determinada por la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Germinación de semilla de café

Durante la evaluación de la germinación de semillas de café (*C. arabica*), no se observó germinación de semillas en el sustrato sin esterilizar (TG0), se observó la presencia de microorganismos, principalmente hongos, los cuales probablemente afectaron el proceso de germinación. Para el sustrato estéril (TG1) se obtuvo un 25% de germinación de semillas (Figura 1).

En el caso de la germinación en papel filtro (TG2) fue el tratamiento que presentó la menor germinación comparado con los demás tratamientos (8.33%). Sin embargo, no se presentó diferencia significativa entre los tratamientos TG0, TG1 y TG3. En el caso del medio semisólido (TG3) se obtuvo un 41.7% de germinación de semillas. El mejor resultado se obtuvo con el sistema de inmersión temporal (TG4), obteniéndose un 83.3% de germinación de semilla de café. La semilla cigótica, contiene una planta embrionaria en su condición inactiva, la planta joven, protegida por diferentes capas de tejidos, contiene las reservas necesarias para activar su metabolismo, cuando se cumplan las condiciones para la germinación.

El proceso de germinación inicia con la imbibición de agua, posteriormente se promueve el alargamiento celular y finalmente con el aumento en el número de células, se finaliza con la protrusión de la radícula (Toole *et al.*, 1956). De acuerdo con lo anterior en este experimento los porcentajes de germinación entre 25 a 8.33% se presentaron en las semillas que se encontraban en sustrato (TG1) y papel filtro (TG2), las semillas que germinaron bajo estas condiciones activaron su metabolismo durante la imbibición y emplearon únicamente las reservas del endospermo de la semilla para promover la división y crecimiento celular para lograr la germinación, ya que el sustrato y el papel filtro no contiene componentes que puedan promover o acelerar el proceso de germinación.

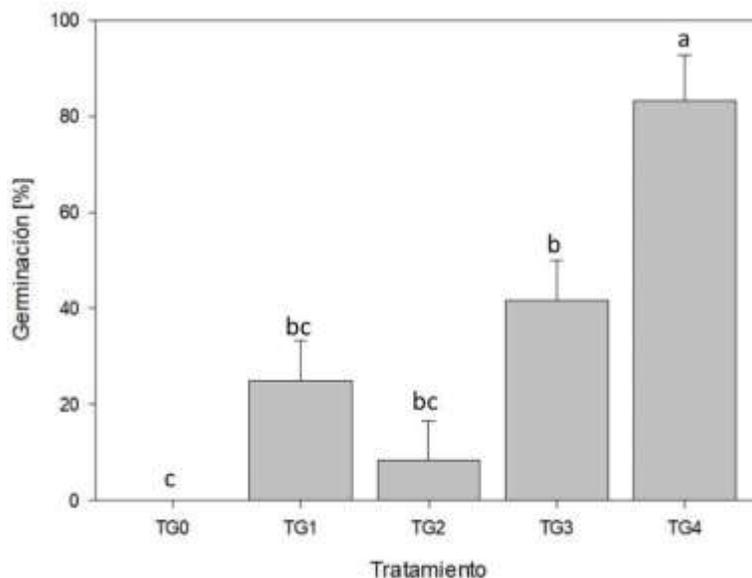


Figura 1. Porcentaje de germinación de semillas de café (*C. arabica*) a los 7 días de evaluación. TG0 (Control) sustrato no estéril 2:1:1 (*Peat moss*-Perlita-Dolomita). TG1. Sustrato estéril; TG2. Semillas en papel filtro, TG3. Semillas en medio semisólido y TG4. Semillas en biorreactor, Sistema de Inmersión Temporal (SIT). Las barras representan las medias con el error estándar y diferentes letras entre barras denotan diferencia significativa ($P < 0.05$)

En el caso de medio de cultivo semisólido y líquido, este último empleado en el SIT contiene macronutrientes, micronutrientes, sacarosa, vitaminas y reguladores de crecimiento (ANA y cinetina), estos componentes son un aporte adicional para la semilla de café, los cuales favorecen la germinación acortando los tiempos e incrementando el número de semillas que logran la germinación. Antes de la imbibición, la mayoría de las células en tejidos meristemáticos de embriones de semillas (las únicas poblaciones celulares que proliferan) tienen un contenido de ADN G1 y metabólicamente se encuentran en un estado similar a G0, caracterizado por la ausencia de señales que favorezcan la proliferación celular. Sin embargo, la imbibición no provoca una entrada inmediata en el ciclo. En cambio, hay un retraso de hasta varias horas antes de que la fase S se vuelva evidente (Vázquez y Sánchez, 2003).

En investigaciones previas se ha demostrado que la adición de reguladores de crecimiento como auxinas (ANA) y citocininas (cinetina) tiene un efecto positivo durante la activación de ciclo celular (transición de la fase G1 a la fase S) durante la germinación, acortando los tiempos de la protusión de raíz y el porcentaje de germinación (Baiza *et al.*, 1989; Reyes *et al.*, 1991; Nikolić *et al.*, 2006). Esto se puede observar en los resultados obtenidos en los tratamientos con medio de cultivo adicionado con citocinina (cinetina) y auxina (ANA) en los tratamientos TG3 y TG4 (SIT) en el que se incrementó el porcentaje de germinación 1.67 y 3.33 veces; respectivamente; comparado con el tratamiento TG1 (sustrato estéril) (Figura 1).

Cabe resaltar que dentro de las vitaminas que incluye el medio de cultivo, se encuentra la biotina que es necesaria para la germinación de semillas ya que tiene un papel fundamental en bloquear enzimas que inhiben la germinación de semillas, 7-ceto-8-aminopelargónico, KAPA (Kucera *et al.*, 2005), además de las vitaminas también contiene reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas) que promueven la división celular, acelerando el proceso de germinación (Mok y Mok, 2001; Chiwocha *et al.*, 2005; Kucera *et al.*, 2005; Belin *et al.*, 2009; Subbiah y Reddy, 2010); haciendo más eficiente el proceso de germinación de semillas en los tratamiento con medio de cultivo (TG3. medio semisólido y TG4 medio líquido).

Desarrollo de plántulas de café

Después de iniciada la imbibición de la semilla cigótica se evaluó a los 30 días el desarrollo de la plántula. En la figura 2 se muestra que el desarrollo de cada uno de los tratamientos. En el Cuadro 1 se presentan los valores de los parámetros de desarrollo que se evaluaron después del proceso de germinación.

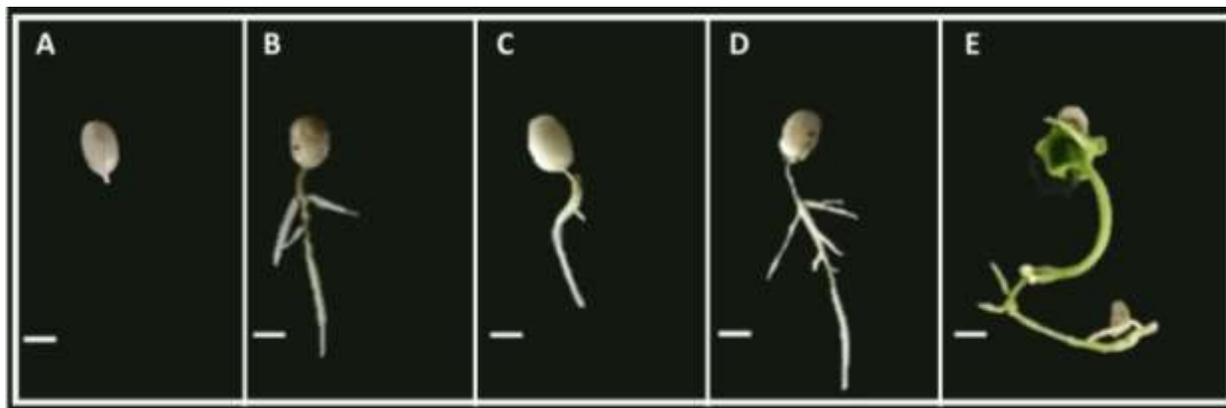


Figura 2. Germinación y desarrollo de plántula de cafeto a los 30 días en condiciones controladas. A. TG0 (Control) sustrato no estéril 2:1:1 (*Peat moss*-Perlita-Dolomita). B. TG1. Sustrato estéril. C. TG2. Semillas en papel filtro. D. TG3. Semillas en medio semisólido. E. TG4. Semillas en biorreactor, Sistema de Inmersión Temporal (SIT). La barra representa 1 cm.

En cuanto a la longitud del hipocótilo, en el Cuadro 1 se muestra que los tratamientos TG3 y TG4 (con medio de cultivo) presentaron la mayor longitud de hipocótilo con 3 y 5.37 cm, respectivamente; seguido del tratamiento TG1 (sustrato estéril) con 2.02 cm de longitud. En cuanto a los tratamientos TG0 y TG2 en este periodo de tiempo aún no se desarrollaba el hipocótilo. El único tratamiento que presentó el desarrollo de cotiledones fue el tratamiento TG4 y ningún tratamiento presentó el desarrollo de hojas verdaderas hasta este tiempo evaluado.

En estudios anteriores se ha demostrado que el uso de sistemas de inmersión temporal se tiene una mayor eficiencia obteniéndose un mejor desarrollo de brotes en *Pinus radiata*, en el caso de banana (*Musa* sugrupo AAH) se obtuvo una mayor proliferación brotes, hasta seis veces más, en contraste con el medio semisólido (Aitken–Christie and Jones, 1987; Alvard *et al.*, 1993). En el caso de café (*C. arabica*) la multiplicación por microesquejes en medio semisólido tiene un valor limitado, debido al lento crecimiento de los brotes ortotrópicos, mientras que en un sistema de inmersión temporal se tiene una tasa de multiplicación más elevada comparada con el medio semisólido (Berthouly *et al.*, 1995).

Cuadro 1. Evaluación de parámetros de crecimiento de plántulas de café.

Tratamiento	NRS	LRP [cm]	HP [cm]	NPC
TG0	0.00±0.00c	0.03±0.06e	0.00±0.00d	0.00±0.00b
TG1	8.50±1.93b	3.59±1.03c	2.02±0.54c	0.00±0.00b
TG2	1.00±0.00c	1.07±0.12d	0.00±0.00d	0.00±0.00b
TG3	7.92±1.50b	5.19±0.83b	3.00±0.39b	0.00±0.00b
TG4	16.42±5.50 ^a	8.18±0.96a	5.37±1.12a	2.00±0.00a

NRS: Número de raíces secundarias. LRP: Longitud de raíz principal. HP: Longitud de hipocótilo. NC: Número de plantas con desarrollo de cotiledones. En el cuadro se representa la media con el error estándar y las diferentes letras denotan diferencias significativas ($P < 0.05$)

En esta investigación el uso de SIT resultó ser el sistema más eficiente para el desarrollo de la plántula comparado con los otros sistemas. Esto puede deberse a que el SIT proporciona un suministro de oxígeno adecuado al explante, al proveer un suministro secuencial e intermitente de nutrientes con los cambios de medio de cultivo y reduciendo la contaminación (Teisson *et al.*, 1999).

Referente al desarrollo del sistema radicular en la plántula, en el cuadro 1 se muestra que TG3 y TG4 (con medio de cultivo) presentaron la mayor longitud de raíz principal con 5.19 y 8.18 cm; respectivamente; seguido de los tratamientos TG1 y TG2 (3.59 y 1.0 cm, respectivamente); mientras que en el TG0 apenas se observó la protrusión de la raíz. En cuanto al número de raíces secundarias también se observó la misma tendencia presentándose el mayor número en el TG4 con 16.42 NRS, seguido de TG3 y TG1 con 7.92 y 8.50 NRS, respectivamente (Figura 2).

Los mejores resultados se observaron en el sistema de inmersión temporal (TG4), este resultado puede deberse a que las plántulas de café desarrolladas en el SIT permiten el intercambio gaseoso (sistema semiabierto), comparado con el tratamiento TG3 (medio semisólido), el cual no presenta intercambio gaseoso (sistema cerrado). En ambos tratamientos (TG3 y TG4) se proveen los nutrientes necesarios para optimizar el desarrollo de la plántula después del proceso de germinación, en el que se incluyen reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas), las cuales promueven la división celular. En el caso de citocininas también promueve el desarrollo vegetativo en las plántulas (Sul y Korban 1994; Hill and Schaller, 2013); y en el de las auxinas promueven el desarrollo del sistema radicular (Alarcón *et al.*, 2019).

En los TG0, TG1 y TG2, las semillas tardan en desarrollar la plántula de café, debido a que el sustrato y el papel filtro, carecen de los nutrientes que aceleren la germinación y el desarrollo, solamente cuentan con los nutrientes que les provee el endospermo de la semilla cigótica. En el cuadro 1, se muestra que las plántulas del TG1 (sustrato estéril) presentan mayor desarrollo del sistema radicular comparado con el TG2 (papel filtro). Esto puede deberse porque el sustrato proporciona las condiciones de oscuridad, la cual promueve el desarrollo del sistema radicular, mientras que, en el TG2, las semillas siempre están expuestas en condiciones de fotoperiodo, esta condición puede afectar negativamente el desarrollo del sistema radicular como se observó en el caso de plantas de *Arabidopsis* sp., en el que el sistema radicular fue inhibido por la presencia de luz (Silva *et al.*, 2015). En cuanto al TG0 (sustrato sin esterilizar), el desarrollo es mínimo, además de la falta de nutrientes adicional, varias semillas fueron afectadas por microorganismos presentes en el sustrato no estéril.

Estos resultados obtenidos de la presente investigación servirán como base para continuar con la optimización del proceso de germinación y desarrollo de la plántula, las cuales servirán para mejorar las vías de regeneración existentes en cultivo *in vitro* (microesquejes y embriogénesis somática), para que en un futuro cercano se puedan emplear estas plantas para establecer protocolos de infección de roya (*H. vastatrix*) en condiciones controladas para la conservación de la roya (sin pérdida de viabilidad) y generar estrategias eficientes de control de la enfermedad.

CONCLUSIONES

De los cinco tratamientos que se evaluaron en este estudio, los TG3 y TG4 fueron los que destacaron, presentando el mayor porcentaje de germinación de semillas de café, mostrando que las vitaminas y los reguladores de crecimiento juegan un papel muy importante en acelerar la germinación de semillas en condiciones controladas. En cuanto al desarrollo de la plántula, el TG4 fue el tratamiento que promovió más eficientemente el desarrollo de plántulas.

AGRADECIMIENTOS

Investigación realizada en el Laboratorio de Biotecnología del Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Tlajomulco en colaboración con el CIATEJ. Proyecto financiado por el TecNM, Convocatoria 2021, No. 13481 y al proyecto FORDECYT 292474 financiado por CONACyT. Agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) y al Laboratorio Nacional PlanTECC por el apoyo otorgado en el proyecto: Mantenimiento de la infraestructura del Laboratorio Nacional PlanTECC, No. 315918.

LITERATURA CITADA

- Aitken-Christie, J. and C. Jones. 1987. Towards automation: radiata pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 8:185–196. <https://doi.org/10.1007/BF00040945>.
- Alarcón, M.V., J. Salguero and P.G. Lloret. 2019. Auxin modulated initiation of lateral roots is linked to pericycle cell length in maize. *Front. Plant Sci.* 10:11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00011>.
- Alvard, D, F. Côte and C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. Effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 32: 55–60. <https://doi.org/10.1007/BF00040116>.
- Baíza, A.M., J.M. Vázquez-Ramos and E. Sánchez-de Jiménez. 1989. DNA synthesis and cell division in embryonic maize tissues during germination. *Journal of Plant Physiology* 135; 416–421. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(89\)80097-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(89)80097-5).
- Belin, C., C. Megies, E. Hauserova, L. López-Molina. 2009. Abscisic acid represses growth of the *Arabidopsis* embryonic axis after germination by enhancing auxin signaling. *Plant Cell*, 21(8): 2253–68. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.067702>.
- Berthouly M., M. Dufour, D. Alvard, C. Carasco, L. Alemano and C. Teisson. 1995. Coffee micropropagation in a liquid medium using the temporary immersion technique. In: ASIC Publishers (eds) 16th International Scientific Colloquium on Coffee, Kyoto, Japon, Vevey. pp. 514–519.
- Berthouly, M. and H. Etienne. 2005. Temporary immersion system: a new concept for use liquid medium in mass propagation, *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation*, Ed. Springer Netherlands. pp. 165-195.
- Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria (CEDRSSA). 2018. El café en México diagnóstico y perspectiva. México: Cámara de Diputados y CEDRSSA. <http://www.cedrssa.gob.mx/files/10/30EI%20caf%C3%A9%20en%20M%C3%A9xico:%20diagn%C3%B3stico%20y%20perspectiva.pdf>.
- Chiwocha, S.D.S., A.J. Cutler, S.R. Abrams, S.J. Ambrose, J. Yang, A.R.S. Ross, A.R. Kermode. 2005. The *etr1-2* mutation in *Arabidopsis thaliana* affects the abscisic acid, auxin, cytokinin and gibberellin metabolic pathways during maintenance of seed dormancy, moist-chilling and germination. *Plant Journal*, 42(1); 35–48. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02359.x>.
- Coste, R., 1968. *Le caféier*. G.P. Maisonneuve et Larose. Paris: 310 p.
- Department of Agriculture of de United States (USDA). 2020. Foreign agricultural service. USDA Global Market Analysis. 2 June 2021. <https://downloads.usda.library.cornell.edu/usda-esmis/files/m900nt40f/377214491/z029pw759/coffee.pdf>.
- Etienne, H.B.E. 1999. Aportes de la biotecnología en el mejoramiento genético del café. *Desafíos de la caficultura en Centroamérica*. Bertrand, B. and b. Rapidel Eds. IICA. San José, Costa Rica, 457-495.
- García, E.V. y M. Rafael. 1990. Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* “Catimor”) cultivados *in vitro*. *Agronomía Tropical*, Venezuela, V. 40. Pp. 281-290.
- Haarer, A.E. 1958. *Modern coffee production*. Leonard Hill.
- Hill, K. and G.E. Schaller. 2010. Enhancing plant regeneration in tissue culture: A molecular approach through manipulation of cytokinin sensitivity. *Plant Signal Behav* 2013; 8: e25709. <http://dx.doi.org/10.4161/psb.25709>.

- Kucera, B., M.A. Cohn and G. Leubner-Metzger. 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci. Res.* 15(4):281–307. <https://doi.org/10.1079/SSR2005218>.
- Lorenzo, J.G. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 54:197–200. <https://doi.org/10.1023/A:1006168700556>.
- Mok, D.W.S and M.C. Mok. 2001. Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 52:89–118. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.52.1.89>.
- Mordocco, A.M., J.A. Brumbley and P. Lakshmanan. 2009. Development of a temporary immersion system (RITA®) for mass production of sugarcane (*Saccharum* spp. interspecific hybrids). *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 45, 450. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9173-7>.
- Nikolić, R., N. Mitić, R. Miletić and M. Nešković. 2006. Effects of cytokinins on *in vitro* seed germination and early seedling morphogenesis in *Lotus corniculatus* L. *J Plant Growth Regul* 25(3); 187–194. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0129-4>.
- Quiroz-Figueroa, F., M. Monforte-González, R.M. Galaz-Ávalos and V.M. Loyola-Vargas. 2006. Direct somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. In: Loyola-Vargas V.M. and Vázquez-Flota, F. (eds). *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology™*. Vol. 318. Humana Press.
- Reyes, J., L.F. Jiménez-García, M.A. González and J.M. Vázquez-Ramos. 1991. Benzyladenine-stimulation of nuclear DNA synthesis and cell division in germinating maize. *Seed Science Research* 1, 113–117. <https://doi.org/10.1017/S096025850000074X>.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA). 2016. Panorama agroalimentario I café. 2016. Dirección de Investigación y evaluación Económica y Sectorial, 34.
- Servicio de Información Alimentaria y Pesquera (SIAP) y la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural (SAGARPA). 2015. Convención internacional del café en México.
- Silva-Navas, J., M.A. Moreno-Risueno, C. Manzano, M. Palleró-Baena, S. Navarro-Neila, B. Téllez-Robledo, J.M. García-Mina, R. Baigorri, F.J Gallego and J.C. del Pozo. 2015. D-Root: a system for cultivating plants with the roots in darkness or under different light conditions. *The Plant Journal* 84(1): 244–255. <https://doi.org/10.1111/tpj.12998>.
- 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* por embriogénesis somática. Tesis Licenciatura en Ingeniería en Agronomía con énfasis en Fitotecnia. Turrialba, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. pp. 50–87.
- Subbiah, V. and K.J. Reddy. 2010. Interactions between ethylene, abscisic acid and cytokinin during germination and seedling establishment in *Arabidopsis*. *J. Biosci.* 35:451–458. <https://doi.org/10.1007/s12038-010-0050-2>.
- Sul, I.W. and S.S. Korban. 1994. Effect of different cytokinins on axillary shoot proliferation and elongation of several genotypes of *Sequoia sempervirens*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 30 (3), 131–135. <https://doi.org/10.1007/BF02632201>.
- Teisson, C., D. Alvard, M. Lartaud, H. Etienne, M. Berthouly, M. Escalona and J.C. Lorenzo. 1999. Temporary immersion for plant tissue culture. In: *Plant Biotechnology and in vitro Biology in the 21st Century, Proceedings of the IXth International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Section H: Novel micropropagation methods*, Jerusalem. pp. 629–632.
- Toole, E.H., S.B. Hendricks, H.A. Borthwick and V.K. Toole. 1956. Physiology of seed germination. *Annual Review of Plant Physiology.* 7(1): 299–324. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.07060156.001503>.
- Vázquez-Ramos, J.M. and M. de la Paz-Sánchez. 2003. The cell cycle and seed germination. *Seed Science Research* 13:113–130. <https://doi.org/10.1079/SSR2003130>.