

Propagación *in vitro* de Plantas de *Coffea arabica* var. Borbón Obtenidas por Mutagénesis Química *In vitro* Propagation of *Coffea arabica* var. Borbon Plants Obtained by Chemical Mutagenesis

Víctor Rubén López-Santos¹ , Víctor Manuel Ruíz-Valdiviezo¹ ,
Federico Antonio Gutiérrez-Miceli¹ , Nancy Ruiz-Lau² , José Gregorio Joya-Dávila³ ,
Veymar Guadalupe Tacias-Pascacio⁴ y José Alfredo Santiz-Gómez¹

¹ Tecnológico Nacional de México/IT de Tuxtla Gutiérrez, División de Estudios de Posgrado e Investigación. ² Cátedra CONACYT. Carretera Panamericana km 1080, Apartado postal 599. 29050 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; (V.R.L.S.), (V.M.R.V.), (F.A.G.M.), (J.A.S.G.), (N.R.L.).

[†] Autor para correspondencia: jose.sg@tuxtla.tecnm.mx

³ Instituto de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma de Baja California. Carretera a Delta s/n, Ejido Nuevo León. 21705 Nuevo León, Baja California, México; (J.G.J.D.).

⁴ Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Facultad de Ciencias de la Nutrición y Alimentos. Libramiento Norte Poniente 1150. 29039 Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México; (V.G.T.P.).

RESUMEN

Coffea arabica es una especie de interés económico en diversos países entre los cuales destaca México como uno de los principales exportadores. Sin embargo, existen diversas plagas y enfermedades como la roya del cafeto que merma la producción de los campos cafetaleros, afectando la economía de los productores. Por ello, las investigaciones en mejoramiento genético y la propagación de esta especie han aumentado en los últimos años. Entre las técnicas de mejoramiento genético destaca la mutagénesis. No obstante, las plantas mutantes pueden presentar insensibilidad a estímulos hormonales. Es por ello que esta investigación evaluó el efecto de diferentes reguladores de crecimiento en la respuesta morfogénica de plantas mutantes obtenidas por mutagénesis química empleando metanosulfonato de etilo (MSE) durante los procesos de propagación *in vitro*. En etapa de propagación no se observó diferencia en la respuesta de plantas mutagenizadas y no mutagenizadas, teniendo la mayor obtención de brotes (5.1) con 6 mg L⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (BAP). En la etapa de rizogénesis *in vitro* se observaron diferencias en la respuesta morfológica de formación de raíces en plantas mutantes, obteniendo que la combinación de 3 mg L⁻¹ de ácido naftalenacético y 3 mg L⁻¹ de ácido indolbutírico generó mayor formación de raíces (83%).

Palabras clave: micropropagación, morfogénesis, MSE, mutantes, rizogénesis.

SUMMARY

Coffea arabica is a species of economic interest in various countries, with Mexico standing out as one of the main exporters. However, there are several pests and diseases, such as coffee leaf rust, that reduce the production of coffee fields, affecting the economy of the producers. Therefore, research on genetic improvement and the propagation of this species has increased in recent years. Among the genetic improvement techniques, mutagenesis stands out. However, mutant plants may exhibit insensitivity to hormonal stimuli. For this reason, the research evaluated the effect of different growth regulators on the morphogenic response of mutant plants obtained through chemical mutagenesis using ethyl methanesulfonate (EMS) during *in vitro* propagation processes. During the propagation stage, no difference was observed in the response of mutagenized and non-mutagenized plants, with the



Cita recomendada:

López-Santos, V. R., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Gutiérrez-Miceli, F. A., Ruiz-Lau, N., Joya-Dávila, J. G., Tacias-Pascacio, V. G., & Santiz-Gómez, J. A. (2025). Propagación *in vitro* de Plantas de *Coffea arabica* var. Borbón Obtenidas por Mutagénesis Química. *Terra Latinoamericana*, 43, 1-10. e2000. <https://doi.org/10.28940/terra.v43i.2000>

Recibido: 18 de junio de 2024.

Aceptado: 29 de octubre de 2024.

Artículo. Volumen 43.

Marzo de 2025.

Editor de Sección:

Dr. Víctor Manuel Ruíz Valdiviezo



Copyright: © 2025 by the authors.

Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY NC ND) License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

highest shoot production (5.1) occurring with 6 mg L⁻¹ of 6-Benzylaminopurine (BAP). In the *in vitro* rhizogenesis stage, differences were observed in the morphological response of root formation in mutant plants, with the combination of 3 mg L⁻¹ of naphthaleneacetic acid and 3 mg L⁻¹ of indolebutyric acid resulting in the highest root formation (83%).

Index words: micropropagation, morphogenesis, EMS, mutants, rhizogenesis.

INTRODUCCIÓN

Coffea arabica, también conocido como café, es un cultivo de importancia económica para varios países, destacando México como uno de los principales exportadores. La producción de café no solo es crucial para la economía mexicana, sino también para la sostenibilidad de muchas comunidades agrícolas que dependen de este cultivo para su sustento (Torres-Castillo *et al.*, 2020). Sin embargo, el cultivo de café afronta diversas problemáticas como la susceptibilidad a diferentes plagas y enfermedades que merman la producción de los campos cafetaleros, afectando la economía de los productores (Cardeña-Basilio, Ramírez, Juárez, Huerta y Cruz, 2019). Entre las principales problemáticas se encuentra la roya del café, enfermedad provocada por el hongo *Hemileia vastatrix* (Henderson, 2019). Por ello, se han llevado a cabo diferentes investigaciones para la obtención de variedades resistentes a este patógeno (Vázquez-López, Espinoza, González y Guerrero, 2022). No obstante, se ha reportado que variedades que presentaban resistencia a la roya se han vuelto susceptibles al patógeno (Le, Okane, Ono, Tsuda y Yamaoka, 2022).

El uso de agentes mutagénicos como el metanosulfonato de etilo (MSE) representa una alternativa para el mejoramiento genético de especies vegetales, generando una gran cantidad de variabilidad genética con un papel significativo en los procesos de mejora (Ingelbrecht, Espinoza, Nielen y Jankowicz, 2023; Joya y Gutiérrez, 2020). En este sentido, estudios han demostrado que el MSE genera cambios en la respuesta metabólica en plantas de *Coffea arabica* durante la infección por roya, presentando así características agronómicas deseables que pudiesen ser conservadas mediante propagación *in vitro* (Joya-Dávila, Gutierrez, Luján, Serano y Ruiz, 2023).

La propagación *in vitro* ha sido una técnica crucial para la multiplicación de *C. arabica*, permitiendo la obtención de plantas sanas y uniformes en grandes cantidades. Investigaciones previas han demostrado que esta técnica es efectiva para conservar las características genéticas de cultivares selectos, y la optimización de los medios de cultivo, ajustando las concentraciones de hormonas como las auxinas y las citoquininas, ha mejorado la eficiencia de la regeneración y el enraizamiento en cultivares de *C. arabica* (Etienne *et al.*, 2002; Ávila-Victor *et al.*, 2023). La técnica de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales con gran potencial se ha utilizado para la preservación y multiplicación de especies amenazadas o en peligro de extinción como *Echinocactus parryi* que es una cactácea amenazada y endémica del municipio de Juárez, Chihuahua, México (García-González, Santos, Flores y Osuna, 2020).

Estudios recientes han reportado que las plantas mutantes tienden a presentar baja sensibilidad a los estímulos hormonales *in vitro*, lo que puede dificultar su propagación. Esto ha sido particularmente evidente en plantas mutagenizadas de *Arabidopsis thaliana*, donde mutaciones en genes que regulan la percepción y señalización hormonal han llevado a respuestas atípicas en la morfogénesis *in vitro* (Werner, Motyka, Strnad y Schmölling, 2001). En el caso de *Coffea arabica*, investigaciones han comenzado a explorar estas diferencias, observando que las plantas mutagenizadas pueden requerir ajustes específicos en las concentraciones hormonales del medio de cultivo para lograr una propagación eficiente (Ávila-Victor *et al.*, 2023).

Esta baja sensibilidad puede dificultar la propagación masiva de las plantas mutagenizadas, ya que la respuesta hormonal es crucial para el desarrollo de estructuras vegetativas y reproductivas durante la micropropagación (Ahloowalia y Maluszynski, 2001; Nehnevajova *et al.*, 2019). Por lo tanto, es necesario optimizar las condiciones hormonales para mejorar la eficiencia de la propagación *in vitro* de estas plantas. Es por ello que el objetivo de este estudio fue evaluar la respuesta morfológica de plantas de *Coffea arabica* var. Borbón mutagenizadas y no mutagenizadas durante la propagación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal y Mantenimiento

Vitro plantas de *Coffea arabica* obtenidas mediante la exposición de callo embriogénico a una dosis de 140 mM de metanosulfonato de etilo (MSE) y plantas no tratadas fueron proporcionadas por el banco de germoplasma del laboratorio de cultivo de tejidos vegetales del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez. Las vitro plantas fueron mantenidas mediante subcultivos en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 100% adicionado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de L-Cisteína (Sigma Aldrich®, Alemania), 0.3 mg L⁻¹ de

6-Bencilaminopurina (BAP) (Sigma Aldrich®, Alemania), 2.5 g de Fitagel (Sigma Aldrich®, Alemania) como agente gelificante, el pH del medio fue ajustado a 5.7 ± 0.1 con una solución de NaOH al 1 N (Joya-Dávila *et al.*, 2023). El periodo de cultivo fue de dos meses, realizando subcultivos periódicos cada 15 días. El material vegetal se conservó en una cámara bioclimática a una temperatura de 25 ± 2 °C, con un fotoperiodo de 16 h a una intensidad lumínica de 35 micromoles por metro cuadrado por segundo.

Propagación

Las yemas se cultivaron en frascos de vidrio que contenían 20 mL de medio MS descrito anteriormente, suplementado con las concentraciones de BAP correspondientes. El cultivo se mantuvo durante 45 días en las condiciones antes mencionadas. Transcurrido este periodo, se contabilizaron los brotes obtenidos por cada unidad experimental. Para evaluar el efecto de BAP en la formación de brotes a partir de yemas apicales, se utilizó un diseño multifactorial 2×3 . El primer factor fue el tipo de planta, con dos niveles que fueron plantas mutagenizadas (140 mM de MSE) y plantas no mutagenizadas (0 mM de MSE). El segundo factor fue la concentración de BAP, con tres niveles que fueron 0, 3 y 6 mg L⁻¹. Cada unidad experimental incluyó una yema, y todos los tratamientos se realizaron con cuatro repeticiones cada uno.

Rizogénesis *in vitro*

Plántulas tratadas con 140 mM de MSE de 5 cm de altura fueron transferidas a medio MS al 50%, de sales suplementado con 15 g L⁻¹ de sacarosa, 100 mg L⁻¹ de L-Cisteína, los reguladores de crecimiento ANA (Sigma Aldrich®, Alemania) y AIB (Sigma Aldrich®, Alemania) en las concentraciones correspondientes (Cuadro 1), 2.5 g L⁻¹ de Fitagel y pH ajustado a 5.7 ± 0.1 con una solución de NaOH al 1 N. Las plántulas fueron mantenidas en condiciones de oscuridad durante 15 días en cámara bioclimática a 25 ± 2 °C y posteriormente se expusieron a un fotoperiodo de 16 h luz (35 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) durante 45 días. Adicionalmente, se evaluó el comportamiento en un control conformado por plantas sin tratamiento mutagénico en medio MS basal al 50% de sales (CP) y plantas tratadas con 140 mM de MSE en medio MS basal al 50% de sales (CN). La variable de respuesta evaluada fue el porcentaje de inducción de raíces.

Cuadro 1. Diseño factorial 3² para evaluar el efecto de ANA y AIB sobre la rizogénesis *in vitro* plantas mutagenizadas de *Coffea arabica*.
Table 1. Factorial design 3² to evaluate the effect of ANA and AIB on rhizogenesis in mutagenized *Coffea arabica* in vitro plants.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento	
	ANA	AIB
	----- mg L ⁻¹ -----	
CP	0	0
CN	0	0
T1	0.5	0.5
T2	0.5	1.75
T3	0.5	3
T4	1.75	0.5
T5	1.75	1.75
T6	1.75	3
T7	3	0.5
T8	3	1.75
T9	3	3

Análisis Estadístico

Para la formación de brotes se midieron como variables de respuesta el número de brotes generados por cada unidad experimental a los 45 días por conteo manual. Los datos fueron analizados mediante un ANOVA multifactorial para cada factor general y mediante un ANOVA simple para las interacciones entre factores. Las medias se compararon con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) empleando el software Statgraphics Centurion XVI® (Statgraphics, 2005).

En la rizogénesis *in vitro*, en plantas mutagenizadas, se empleó un diseño de superficie de respuesta (3^2) en el cual se evaluó el efecto del ácido indolbutírico (AIB) y el ácido naftalenacético (ANA) en concentraciones de 0.5, 1.75 y 3 mg L⁻¹ cada uno. Las variables de respuesta estudiadas en la rizogénesis *in vitro* fueron el porcentaje de formación de raíces por cada unidad experimental. Los datos fueron analizados mediante un modelo de superficie de respuesta 3^2 (dos factores en tres niveles cada uno) empleando el software estadístico Statgraphics Centurion XVI® (Statgraphics, 2005).

Aclimatación

La aclimatación se realizó en dos fases. Durante la fase uno, plántulas de entre 5 y 7 cm de altura y con seis hojas verdaderas fueron extraídas del medio de cultivo y se retiró por completo el medio restante en las raíces empleando una solución de NaClO comercial al 5% (v:v). Posteriormente, las plántulas fueron transferidas a charolas de aclimatación con dimensiones de 18 × 14 × 11 cm con 12 cavidades, colocando una planta por cavidad. El sustrato empleado consistió en una mezcla de PeatMost® y Agrolita® en proporción 1:1 (v:v). A cada planta se le suministró 10 mL de una solución acuosa de Raizal 400® al 10% (p:v). Las charolas de aclimatación se mantuvieron en una cámara bioclimática bajo las condiciones de incubación antes descritas por un periodo de 30 días, aplicando irrigación por aspersión cada tercer día (Vallejos-Torres, Sánchez, García, Trigos y Arévalo, 2019).

En la segunda fase, las plantas fueron transferidas a contenedores de polietileno de 1 L de capacidad que contenían PeatMost®, Agrolita® y tierra negra en relación 1:1:1 (v:v:v) como sustrato y fueron colocadas en invernadero con exposición solar del 60% durante 30 días (Vallejo-Torres *et al.*, 2019). Cada planta se fertilizó con 2 g de fósforo en forma de fosfato diamónico (DAP; 46% de P₂O₅) (Khalajabadi, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de Brotes

A los 45 días de cultivo, se observó la formación de brotes en los tratamientos suplementados con 3 y 6 mg L⁻¹ de BAP. En concentración de 3 mg L⁻¹ de BAP, los brotes se formaron de manera lateral a partir del tallo que estaba en contacto con el medio de cultivo (Figura 1b), mientras que en concentraciones de 6 mg L⁻¹, se observó la formación de callo en la base de las yemas, a partir de la cual se generaron brotes que lograron desarrollarse (Figura 1c). En contraste, en el tratamiento control no se observó la formación de ninguna estructura en la base en contacto con el medio (Figura 1a). Este comportamiento es producto del efecto que tiene el BAP en los tejidos vegetales, ya que forma parte del grupo de reguladores de crecimiento vegetal del tipo citoquinina, las cuales son esenciales para controlar la respuesta a estímulos externos y son clave en numerosos procesos fisiológicos y de desarrollo (morfogénesis, organogénesis, formación de brotes) (Nehnevajova *et al.*, 2019), así como, el correcto flujo del ciclo celular, promoviendo así la división celular (Schaller, Street y Kieber, 2014). Mientras tanto, a partir del reconocimiento de las citoquininas por parte de la célula, comienza una ruta de transducción de señales que desemboca en respuestas fisiológicas tales como la proliferación de brotes y raíces, generación de cúmulos de células indiferenciadas y diferenciación celular (Müller y Sheen, 2007; Zürcher and Müller, 2016; Jameson y Song, 2020).

En la variable número de brotes se observó que, a medida que aumentó la concentración de BAP en el medio, también incrementó el número de brotes generados, sin embargo, no hubo diferencia estadística significativa ($P > 0.05$) respecto al origen de los explantes. Por el contrario, las diferentes concentraciones de BAP mostraron diferencia estadística significativa ($P \leq 0.05$) respecto al número de brotes, obteniendo una media de 5.1 brotes por explante en los tratamientos adicionados con 6 mg L⁻¹ de BAP (Cuadro 2).

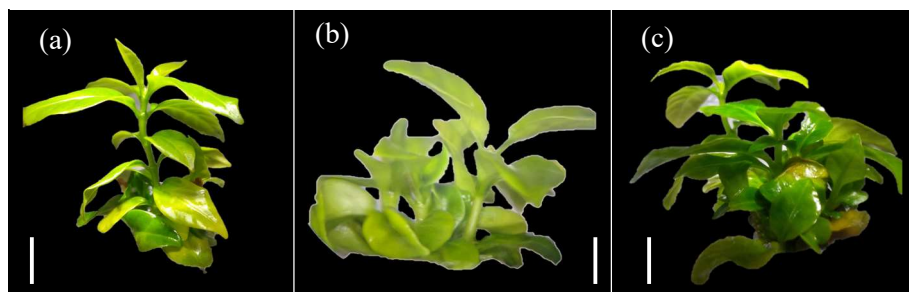


Figura 1. Brotes generados a partir de yemas apicales cultivadas en diferentes concentraciones de BAP. (a) = 0 mg L⁻¹; (b) = 3 mg L⁻¹; (c) = 6 mg L⁻¹. La escala en la barra corresponde a 1 centímetro.

Figure 1. Shoots generated from apical buds cultured in different concentrations of BAP. (a) = 0 mg L⁻¹; (b) = 3 mg L⁻¹; (c) = 6 mg L⁻¹. The scale on the bar corresponds to 1 centimeter.

Los resultados son correspondientes con lo obtenido por diversos grupos de trabajo, donde se reportan concentraciones cercanas a 6 mg L⁻¹ para la mayor formación de brotes mediante organogénesis directa en diversas variedades de *Coffea arabica* (Ebrahim, Shibli, Makhadmeh, Shatnawi y Abu-Ein, 2007; El Gawad, Mahdy y Boshra, 2012; Suliansyah, Resigia, Febjislami, Amanda y Rahimah, 2021). De igual manera, Suliansyah *et al.* (2021), indicaron que existen concentraciones mayores a 7 mg L⁻¹ que son perjudiciales para la formación de brotes, por lo que concentraciones entre 5 y 7 mg L⁻¹ son las óptimas para la obtención de esta respuesta morfogénica.

El comportamiento similar entre genotipos utilizados sugiere que el tratamiento con 140 mM de MSE no generó cambios en receptores que afectaran la sensibilidad a estímulos generados por reguladores de crecimiento del tipo citoquinina como el BAP. Efectos similares fueron observados por Nehnevajova *et al.* (2019), en mutantes de *Brassica napus*. Sin embargo, en mutantes de *Arabidopsis* con mutaciones en múltiples genes de receptores de citoquininas (IPT) se encontró un bajo crecimiento del meristemo y baja proliferación de brotes (Werner y Schmölling, 2009). Esto indica que la sensibilidad a citoquininas en mutantes puede variar respecto a la especie.

Rizogénesis *in vitro*

La rizogénesis *in vitro* se observó a los 45 días en plantas de *Coffea arabica* no mutagenizadas en medio de cultivo MS al 50% de sales, mientras que, las plantas mutagenizadas con dosis de 140 mM de MSE no presentaron desarrollo de raíces. Debido a ello, fue necesaria la adición de ANA y AIB al medio de cultivo para las plantas mutantes. En este sentido, después de 35 días se observó la formación de raíces en los tratamientos 2, 5, 6, 7 y 9 (Figura 2). En general, las plántulas generaron raíces amorfas, desdiferenciación celular previa a la formación de raíces, engrosamiento de la raíz principal y formación de raíces adventicias. La resistencia o insensibilidad a auxinas es un efecto documentado por diversos autores en el mutante *lbr5* de *Arabidopsis*, donde se ha reportado baja formación de raíces, insensibilidad a auxinas sintéticas y limitada tasa de producción endógena de citoquininas (Monroe-Augustus, Zolman y Bartel, 2003; Strader *et al.*, 2011; Emenecker *et al.*, 2023).

Cuadro 2. Efecto de la concentración de BAP y el origen del explante sobre la formación de brotes en plántulas mutagenizadas de *Coffea arabica*.
Table 2. Effect of BAP concentration and explant type on shoot formation in *Coffea arabica* mutant plants.

Origen de los explantes	BAP			Media origen de explante (HSD= 2.69)
	0	3	6	
	----- mg L ⁻¹ -----			
MSE 0 mM	0±0.0 d	2.8±0.2 b	4.8±0.2 a	2.53 A
MSE 140 mM	0±0.0 d	1.4±0.24 c	5.4±0.24 a	2.26 A
Media por concentración de BAP (HSD = 0.59)	0 C	2.1 B	5.1 A	Interacciones (HSD=0.79)

HSD = diferencia honestamente significativa ($P \leq 0.05$). Las letras minúsculas indican diferencia significativa para las interacciones entre factores (ANOVA simple). Las letras mayúsculas indican la significancia estadística para cada nivel de cada factor general (ANOVA multifactorial).

HSD = Honestly Significant Difference ($P \leq 0.05$). Lowercase letters indicate significant difference for interactions between factors (Simple ANOVA). Uppercase letters indicate statistical significance for each level of each general factor (Multifactor ANOVA).

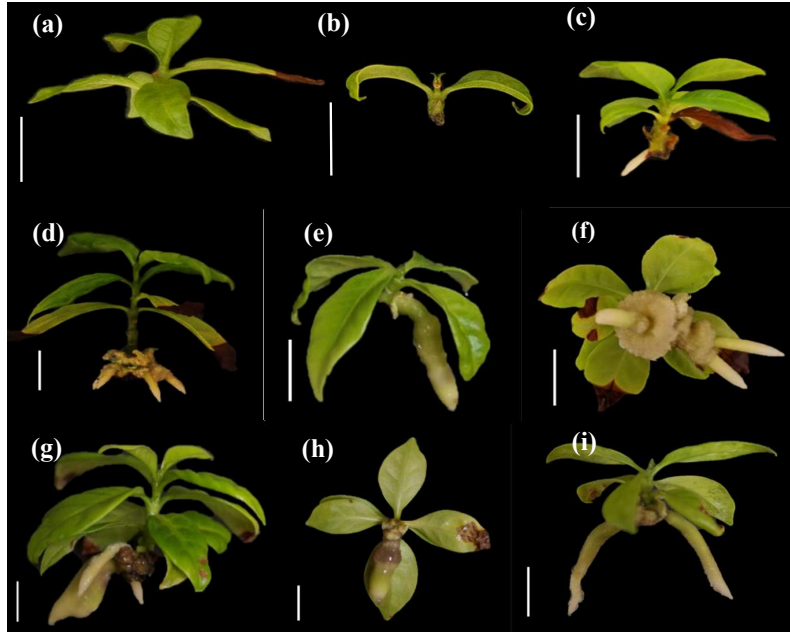


Figura 2. Formación de raíces en plantas de *Coffea arabica*. (a) y (b) Tratamiento control; (c) Tratamiento 2; (d) Tratamiento 5; (e) y (f) Tratamiento 6; (g) Tratamiento 7; (h) e (i) Tratamiento 9; La escala en la barra corresponde a 1 centímetro.

Figure 2. Root formation in *Coffea arabica* plants. (a) and (b) Control treatment; (c) Treatment 2; (d) Treatment 5; (e) and (f) Treatment 6; (g) Treatment 7; (h) and (i) Treatment 9; The scale on the bar corresponds to 1 centimeter.

La rizogénesis es una respuesta morfogénica normalmente mediada por hormonas del tipo auxina (Roychoudhry y Kepinski, 2022). Esto se debe a la acumulación de auxinas en las células del ápice radicular generada por un gradiente de auxinas en la planta (Remy y Duque, 2014), lo cual desencadena la activación de genes asociados a la formación y desarrollo de raíces y la desdiferenciación celular (Quint y Gray, 2006). Así mismo, el transporte de auxinas genera acidificación en la pared celular y la ruptura de las microfibras de celulosa por activación de enzimas denominadas expansinas (Majda y Robert, 2018). Esta ruptura genera que la pared se vuelva laxa y la célula sufra expansión, lo cual genera un alargamiento y engrosamiento en las estructuras radiculares. Un sistema radicular defectuoso también fue observado en mutantes de *Arabidopsis* con mutaciones en los genes *ARR* del tipo A, *ARR7* y *ARR15* donde estas mutaciones resultaron en una señalización ectópica de citoquinina, abolieron la expresión de genes que codifican células madre y causaron defectos severos en el patrón de la raíz (Riefler, Novak, Strnad y Schmölling, 2006; Müller y Sheen, 2008). Esto último se atribuye a mutaciones que disminuyen la producción de citoquinina endógena, resultando en la inhibición de los reguladores del tipo B involucrados en la regulación de la elongación de la raíz (Argyros *et al.*, 2008; Ishida, Yamashino, Yokoyama y Mizuno, 2008; Werner y Schmölling, 2009).

Los resultados del análisis estadístico del modelo de superficie de respuesta donde se evaluó el efecto del ANA, AIB y las interacciones entre ambos factores indicaron que el efecto con mayor significancia estadística en la formación de raíces con $P = 0.0047$ fue el generado con AIB (Figura 3a). Dicho resultado se puede comprobar en el gráfico de efectos principales que muestra que el factor AIB tuvo mayor participación en la formación de raíces que ANA (Figura 3 b). Además, se observó que las concentraciones óptimas para la obtención del mayor porcentaje de formación de raíces (83%) fue cuando ambos reguladores de crecimiento se encuentran en la concentración más alta; es decir, 3 mg L^{-1} cada uno (Figura 3c).

Se ha reportado que concentraciones mayores a 3 mg L^{-1} de AIB han resultado ser efectivas en la inducción del mayor porcentaje de formación de raíces *in vitro* (Ebrahim *et al.*, 2007, El Gawad *et al.*, 2012). Sin embargo, se ha demostrado que concentraciones similares de ANA (mayores a 3 mg L^{-1}) no inducen porcentajes elevados de formación de raíces, como indican Meherat *et al.* (2012). Además, la combinación de diversas auxinas promueve el crecimiento temprano de raíces y su desarrollo *in vitro* (Ahmed, Feyissa y Disasa, 2013; Dumaslan, Tad-awan y Manuel, 2023), resultando efectiva la combinación entre ANA y AIB. No obstante, es probable que, para genotipos mutantes, como es el caso de los evaluados en este estudio, la concentración de hormonas deba ser elevada para suplir las deficiencias que puedan existir en receptores, vías de transducción de auxinas o desequilibrio en la homeostasis de auxinas (Werner y Schmölling, 2009; Rasmussen, Hosseini, Hajirezaei, Druege y Geelen, 2015).

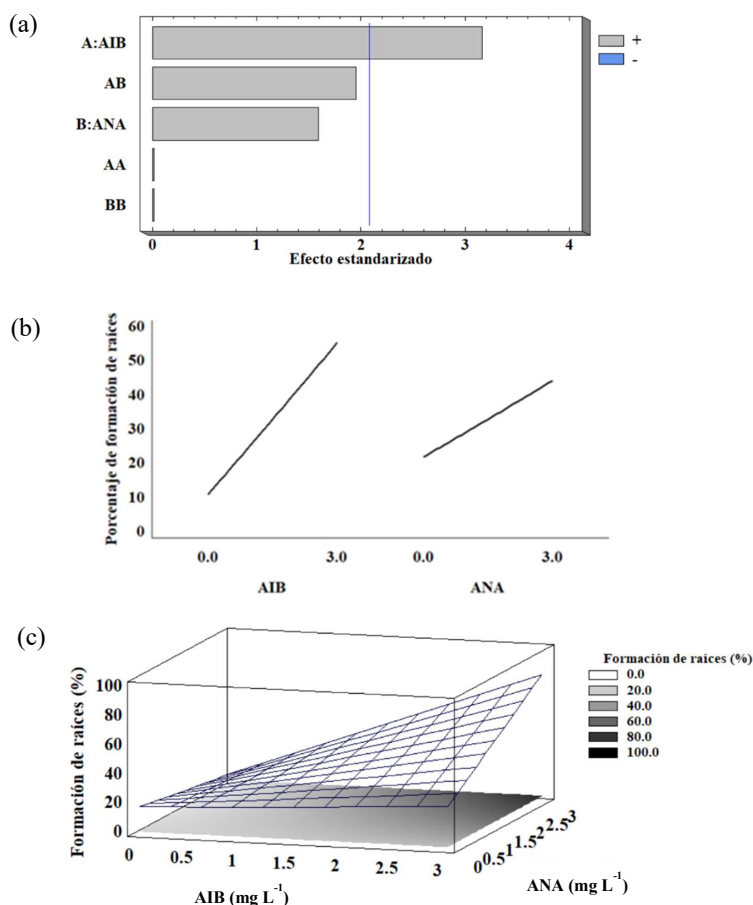


Figura 3. Gráficos estadísticos generados por el diseño experimental de superficie de respuesta para evaluar el efecto de ANA y AIB sobre la rizogénesis *in vitro* en plantas mutagenizadas de *Coffea arabica*. (a) Gráfica de Pareto estandarizada del efecto del AIB y ANA; (b) Gráfico de efectos principales de AIB y ANA sobre el porcentaje de formación de raíces; (c) Gráfico de superficie de respuesta estimada del efecto relativo de AIB y ANA sobre el porcentaje de formación de raíces.

Figure 3. Statistical graphs generated by the response surface experimental design to evaluate the effect of NAA and IBA on *in vitro* rhizogenesis in mutagenized *Coffea arabica* plants. (a) Standardized Pareto chart of the effect of IBA and NAA; (b) Main effects plot of IBA and NAA on the percentage of root formation; (c) Estimated response surface plot of the relative effect of IBA and NAA on the percentage of root formation.

Aclimatación

Finalmente, después de la aclimatación, se obtuvo el 80% de supervivencia para plantas control y 70% para plantas mutagenizadas. La muerte de las plantas ocurrió en la primera etapa de la aclimatación, cuando estas fueron colocadas en sustrato orgánico. Durante esta etapa, también se observó la elongación de las raíces en la primera semana, así como elongación de entrenudos y crecimiento apical (Figura 4a). Una vez concluida esta fase, no se registró muerte de ningún ejemplar, y el crecimiento fue notable en todos los casos (Figura 4b).

Resultados similares a los obtenidos en este estudio fueron reportados por El Gawad *et al.* (2012), donde se indujo la supervivencia hasta el 71% empleando una mezcla de turba y agrolita en relación 1:1 (v:v). Es preciso señalar que, en esta investigación; la aclimatación en dos fases resultó ser adecuada para este cultivo, ya que el período de aclimatación es esencial para las plántulas cultivadas *in vitro*, puesto que facilita su transición a condiciones naturales, promoviendo la adaptación y supervivencia fuera del ambiente controlado del laboratorio (Quisen, Raizer y Iriarte, 2013). Los resultados también indican que la mezcla de sustratos fue la adecuada, ya que permitió la oxigenación en la zona radicular de las plantas, promoviendo así la transpiración y el intercambio gaseoso (Valdés, Shukla, González y Saxena, 2021).



Figura 4. Plantas de *Coffea arabica* en las diferentes fases de aclimatación. (a) Planta con una semana en condiciones *ex vitro*, la escala en la barra corresponde a 1 cm; (b) Planta de *Coffea arabica* con 45 días en condiciones *ex vitro*, la escala en la barra corresponde a 5 centímetros.

Figure 4. *Coffea arabica* plants in different stages of acclimatization. (a) Plant with one week under *ex vitro* conditions, scale on the bar corresponds to 1 cm; (b) *Coffea arabica* plant with 45 days under *ex vitro* conditions, scale on the bar corresponds to 5 centimeters.

CONCLUSIONES

Las plantas mutantes no mostraron insensibilidad a los estímulos generados por BAP durante la fase de propagación, ya que la citocinina indujo la formación de brotes en los explantes evaluados. La concentración óptima de BAP fue de 6 mg L⁻¹ para la mayor formación de brotes. No obstante, las plantas mutantes mostraron nula formación de raíces de forma espontánea a comparación de las plantas control, lo cual podría deberse a múltiples mutaciones en genes asociados a esta respuesta morfogénica, por ello es necesaria la adición de ANA y AIB para la rizogénesis *in vitro* en los explantes mutagenizados. La aclimatación en dos fases mostró alta tasa de supervivencia de las plántulas, indicando que esta actividad facilita la transición exitosa a condiciones naturales.

DECLARACIÓN DE ÉTICA

No aplicable.

CONSENTIMIENTO PARA PUBLICACIÓN

No aplicable.

DISPONIBILIDAD DE DATOS

El conjunto de datos analizados durante el estudio actual está disponible a solicitud razonable.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no tienen intereses en competencia.

FINANCIACIÓN

Esta investigación fue financiada por el Tecnológico Nacional de México, con clave asignada 19933.24-P bajo el registro del Proyecto "Propagación de plantas de *Coffea arabica* obtenidas por mutagénesis química y análisis genético de la resistencia a roya (*Hemileia vastatrix*)", en la Convocatoria 2024: Proyectos de Investigación Científica, Desarrollo Tecnológico e Innovación.

CONTRIBUCIÓN DE LOS AUTORES

Conceptualización: J.A.S.G. y F.A.G.M. Metodología: V.R.L.S. Validación: J.A.S.G. y V.M.R.V. Análisis formal: V.R.L.S. Investigación: V.R.L.S. Recursos: F.A.G.M., J.A.S.G. y J.G.J.D. Escritura, preparación del borrador original: V.R.L.S. Escritura, revisión y edición: J.A.S.G. y J.G.J.D. Visualización: J.A.S.G. y V.R.L.S. Supervisión: J.A.S.G. Administración del proyecto: V.M.R.V. y N.R.L. Adquisición de fondos: J.A.S.G. y V.G.T.P.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por otorgamiento de la beca de maestría a V.R.L.S. para realizar esta investigación. También agradecemos al Tecnológico Nacional de México por brindar el apoyo financiero del proyecto con la clave 19933.24-P.

LITERATURA CITADA

- Ahloowalia, B. S., & Maluszynski, M. (2001). Induced mutations-A new paradigm in plant breeding. *Euphytica*, 118, 167-173. <https://doi.org/10.1023/A:1004162323428>
- Ahmed, W., Feyissa, T., & Disasa, T. (2013). Somatic embryogenesis of a coffee (*Coffea arabica* L.) hybrid using leaf explants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(4), 469-475. <https://doi.org/10.1080/14620316.2013.11512993>
- Argyros, R. D., Mathews, D. E., Chiang, Y. H., Palmer, C. M., Thibault, D. M., Etheridge, N., ... & Schaller, G. E. (2008). Type B response regulators of Arabidopsis play key roles in cytokinin signaling and plant development. *The Plant Cell*, 20(8), 2102-2116. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059584>
- Ávila-Victor, C. M., Ordaz-Chaparro, V. M., Arjona-Suárez, E. d. J., Iracheta-Donjuan, L., Gómez-Merino, F. C., & Robledo-Paz, A. (2023). *In vitro* mass propagation of coffee plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through indirect somatic embryogenesis. *Plants*, 12, 1237. <https://doi.org/10.3390/plants12061237>
- Cardeña-Basilio, I., Ramírez-Valverde, B., Juárez-Sánchez, J. P., Huerta-de la Peña, A., & Cruz-León, A. (2019). Campesinos y sistema de producción de café ante el problema de la roya en el municipio de Hueytamalco, Puebla, México. *Espacio Abierto*, 28(2), 57-70.
- Dumastan, M. R., Tad-awan, B. A., & Manuel, S. B. (2023). Direct Organogenesis and Regeneration of Arabica Coffee Cultivars. *Mountain Journal of Science and Interdisciplinary Research (formerly Benguet State University Research Journal)*, 83(2), 43-56.
- Ebrahim, N., Shibli, R., Makhadmeh, I., Shatnawi, M., & Abu-Ein, A. (2007). *In vitro* propagation and *in vivo* acclimatization of three coffee cultivars (*Coffea arabica* L.) from Yemen. *World Applied Sciences Journal*, 2(2), 142-150.
- El Gawad, N., Mahdy, H. A., & Boshra, E. S. (2012). *In vitro* micropropagation protocol and acclimatization of coffee trees (*Coffea arabica* L.). *Journal of Plant Production*, 3(1), 109-116.
- Emenecker, R. J., Cammarata, J., Yuan, I., Howard, C., Ebrahimi Naghani, S., Robert, H. S., & Strader, L. C. (2023). Abscisic acid biosynthesis is necessary for full auxin effects on hypocotyl elongation. *Development*, 150(23), dev202106. <https://doi.org/10.1242/dev.202106>
- Etienne, H., Anthony, F., Dussert, S., Fernandez, D., Lashermes, P., & Bertrand, B. (2002). Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38, 129-138. <https://doi.org/10.1079/IVP2001273>
- García-González, D. A., Santos-Díaz, M. D. S., Flores-Margez, J. P., & Osuna-Ávila, P. (2020). Influencia del Ca²⁺, pH, agar y reguladores de crecimiento en la propagación in vitro de *Echinocactus parryi* (Engelm). *Terra Latinoamericana*, 38(3), 489-498. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i3.734>
- Henderson, T. P. (2019). La roya y el futuro del café en Chiapas. *Revista Mexicana de Sociología*, 81(2), 389-416.
- Ingelbrecht, I. L., Espinoza, N. A., Nielen, S., & Jankowicz-Cieslak, J. (2023). Mutation breeding in Arabica coffee. In J. Jankowicz-Cieslak (Ed.), *Mutation breeding in coffee with special reference to leaf rust: Protocols* (pp. 3-17). Berlin Heidelberg, Germany: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-662-67273-0_1
- Ishida, K., Yamashino, T., Yokoyama, A., & Mizuno, T. (2008). Three type-B response regulators, ARR1, ARR10 and ARR12, play essential but redundant roles in cytokinin signal transduction throughout the life cycle of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 49(1), 47-57. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm165>
- Jameson, P. E., & Song, J. (2020). Will cytokinins underpin the second 'Green Revolution'? *Journal of Experimental Botany*, 71(22), 6872-6875. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa447>
- Joya, D. J. G., & Gutiérrez-Miceli, F. A. (2020). Ethyl methanesulfonate as inductor of somaclonal variants in different crops. *Phyton*, 89(4), 1-16.
- Joya-Davila, J. G., Gutierrez-Miceli, F. A., Luján-Hidalgo, M. C., Serano-Gómez, L. A., & Ruiz-Sesma, B. R. (2023). Cambios bioquímicos y morfológicos en *Coffea arabica* posterior a un tratamiento con metanosulfonato de etilo: Cambios bioquímicos y morfológicos en *Coffea arabica*. *Biotecnia*, 25(3), 36-41. <https://doi.org/10.18633/biotecnia.v25i3.1969>
- Khalajabadi, S. S. (2008). *Fertilidad del suelo y nutrición del café en Colombia*. Chinchiná, Caldas, Colombia: Centro Nacional de Investigaciones de Café.
- Le, C. T. M., Okane, I., Ono, Y., Tsuda, Y., & Yamaoka, Y. (2022). Incidence of coffee leaf rust in Vietnam, possible original sources and subsequent pathways of migration. *Frontiers in Plant Science*, 13, 872877. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.872877>
- Majda, M., & Robert, S. (2018). The role of auxin in cell wall expansion. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4), 951. <https://doi.org/10.3390/ijms19040951>
- Meherat, M., Shatnawi, M., Shibli, R., Qudah, T., Malloh, S. A., & Tamadour, A. Q. (2022). Clonal propagation of tetragonolobus palaestinus bioss: A Jordanian medical plant. *Acta Agriculturae Slovenica*, 118(3), 1-9. <https://doi.org/10.14720/aas.2022.118.3.1208>
- Monroe-Augustus, M., Zolman, B. K., & Bartel, B. (2003). IBRS5, a dual-specificity phosphatase-like protein modulating auxin and abscisic acid responsiveness in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 15(12), 2979-2991. <https://doi.org/10.1105/tpc.017046>
- Müller, B., & Sheen, J. (2007). Advances in cytokinin signaling. *Science*, 318(5847), 68-69. <https://doi.org/10.1126/science.1145461>
- Müller, B., & Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature*, 453(7198), 1094-1097. <https://doi.org/10.1038/nature06943>

- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nehnevajova, E., Ramireddy, E., Stolz, A., Dobrev, P. I., Motyka, V., & Schmülling, T. (2019). Root enhancement in cytokinin-deficient oilseed rape causes leaf mineral enrichment, increases the chlorophyll concentration under nutrient limitation and enhances the phytoremediation capacity. *BMC Plant Biology*, 19, 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1657-6>
- Quint, M., & Gray, W. M. (2006). Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(5), 448-453. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.006>
- Quisen, R. C., Raizer, M. D. M., & Iriarte-Martel, J. H. I. M. (2013). Acclimatization of micropropagated plantlets of *Heliconia Sexy Pink*. *Revista de Ciências Agrárias Amazonian Journal of Agricultural and Environmental Sciences*, 56, 1-5.
- Rasmussen, A., Hosseini, S. A., Hajirezaei, M. R., Druge, U., & Geelen, D. (2015). Adventitious rooting declines with the vegetative to reproductive switch and involves a changed auxin homeostasis. *Journal of Experimental Botany*, 66(5), 1437-1452. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru499>
- Remy, E., & Duque, P. (2014). Beyond cellular detoxification: a plethora of physiological roles for MDR transporter homologs in plants. *Frontiers in Physiology*, 5, 93524. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00201>
- Riefler, M., Novak, O., Strnad, M., & Schmülling, T. (2006). Arabidopsis cytokinin receptor mutants reveal functions in shoot growth, leaf senescence, seed size, germination, root development, and cytokinin metabolism. *The Plant Cell*, 18, 40-54. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.037796>
- Roychoudhry, S., & Kepinski, S. (2022). Auxin in root development. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 14(4), a039933.
- Schaller, G. E., Street, I. H., & Kieber, J. J. (2014). Cytokinin and the cell cycle. *Current Opinion in Plant Biology*, 21, 7-15. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2014.05.015>
- Strader, L. C., Wheeler, D. L., Christensen, S. E., Berens, J. C., Cohen, J. D., Rampey, R. A., & Bartel, B. (2011). Multiple facets of Arabidopsis seedling development require indole-3-butyric acid-derived auxin. *The Plant Cell*, 23, 984-999. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083071>
- Statgraphics Technologies (2005). *Statgraphics Centurion Version 18 User's Manual*. The Plains, VA, USA: Statgraphics Inc.
- Suliansyah, I., Resigia, E., Febjislami, S., Amanda, C. P., & Rahimah, L. (2021). Multiplication of arabica "Solok Rajo" coffee through bio cellular technology. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 741(1), 1-9. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/741/1/012053>
- Torres-Castillo, N. E., Melchor-Martínez, E. M., Ochoa-Sierra, J. S., Ramírez-Mendoza, R. A., Parra-Saldívar, R., & Iqbal, H. M. (2020). Impact of climate change and early development of coffee rust—An overview of control strategies to preserve organic cultivars in Mexico. *Science of the Total Environment*, 738, 140225. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140225>
- Valdés, Y. C., Shukla, M. R., González-Vega, M. E., & Saxena, P. K. (2021). Improved Conservation of Coffee (*Coffea arabica* L.) Germplasm via Micropropagation and Cryopreservation. *Agronomy*, 11(9), 1861. <https://doi.org/10.3390/agronomy11091861>
- Vallejos-Torres, G., Sánchez, T., García, M. A., Trigos, M., & Arévalo, L. A. (2019). Efecto de hongos formadores de micorrizas arbusculares en clones de (*Coffea arabica*), variedad caturra en Perú. *Acta Agronómica*, 68(4), 278-284. <https://doi.org/10.15446/acag.v68n4.72117>
- Vázquez-López, P., Espinoza-Arellano, J. de J., González-Mancilla, A., & Guerrero-Ramos, L. A. (2022). Características de productores y plantaciones de café en la zona norte de Chiapas. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 13, 101-111. <https://doi.org/10.29312/remexca.v13i28.3266>
- Werner, T., & Schmülling, T. (2009). Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology*, 12(5), 527-538. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.07.002>
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., & Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10487-10492. <https://doi.org/10.1073/pnas.171304098>
- Zürcher, E., & Müller, B. (2016). Cytokinin synthesis, signaling, and function—advances and new insights. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 324, 1-38. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.01.001>