

## Medio de cultivo e inhibidores de etileno en la embriogénesis somática de café\*

### Culture medium and inhibitors of ethylene in the coffee somatic embryogenesis

Pablo López-Gómez<sup>1§</sup>, Leobardo Iracheta-Donjuan<sup>1</sup>, Ma. Del Carmen Ojeda-Zacarias<sup>2</sup> y Jean Paul Ducos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Campo Experimental Rosario Izapa- INIFAP. Tuxtla Chico, Chiapas. México. Tel: 01 (962) 1100271 C. P. 30870. (lopez.pablo@inifap.gob.mx; iracheta.leobardo@inifap.gob.mx). <sup>2</sup>Facultad de Agronomía-Universidad Autónoma de Nuevo León. Francisco Villa S/N. Col. Ex-Hacienda El Canadá. Gral. Escobedo, Nuevo León, México. C. P. 66054 Tel. 1340-4399. (ojedacz@yahoo.com.mx). <sup>3</sup>Research and Development Center Nestlé, 101, Avenue Gustave-Eiffel, Notre-Dame-D'Océ. B. P. 49716, 37097, Tours Cedex 2. France. Tel: (0033) 02 4762 8383. (Jean-Paul.Ducos@rdto.nestle.com). <sup>§</sup>Autor para correspondencia: lopez.pablo@inifap.gob.mx.

#### Resumen

La combinación de sales, hormonas y el ambiente gaseoso *in vitro* podrían afectar la expresión de la embriogénesis somática. Se estudió el efecto de la combinación de dos medios de cultivo e inhibidores de etileno sobre la inducción de callo embriogénico de *Coffea canephora* P., y su capacidad para proliferar y formar embriones. Se establecieron explantes foliares de cinco genotipos de *C. canephora* P., en dos medios diferentes, el 23A8 [sales de Yasuda con BAP (1.12 mg L<sup>-1</sup>); y la secuencia T1B/T2B consistente en un primer cultivo en T1B [50% de sales de MS con 2iP (2 mg L<sup>-1</sup>), 2, 4-D (0.5 mg L<sup>-1</sup>) y AIB (1 mg L<sup>-1</sup>); seguido del T2B [50 % de sales de MS con BAP (4 mg L<sup>-1</sup>) y 2, 4-D (1 mg L<sup>-1</sup>)]. Estos medios se suplementaron con AgNO<sub>3</sub> (6.8 mg L<sup>-1</sup>) y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (6.3 mg L<sup>-1</sup>). El uso de T1B/T2B propició mayor proliferación de callos (hasta 248 mg), pero bajos porcentajes de callo embriogénico (menores a 29 %) y menor grado de diferenciación que los obtenidos en el medio 23A8 (con 160 mg). En la fase de multiplicación se obtuvieron callos de 1 a 2.5 mg y una tasa de multiplicación de 10 a 24 veces la biomasa inicial. En la de diferenciación, se observó un potencial embriogénico de 25 mil a 137 mil embriones por gramo de callo inoculado. En cada etapa el efecto de los inhibidores de etileno dependió del genotipo en interacción con el medio de cultivo.

#### Abstract

The combination of salts, hormones and the gaseous environment *in vitro* could affect the expression of somatic embryogenesis. The effect of the combination of two culture media and inhibitors of ethylene induction of embryogenic callus of *Coffea canephora* P., and their ability to proliferate and form embryos was studied. five leaf explants of *C. canephora* P. genotypes were established in two different media, 23A8 [Yasuda salts with BAP (1.12 mg L<sup>-1</sup>); and T1B/T2B sequence consisting of a first crop T1B [50% of MS salts with 2iP (2 mg L<sup>-1</sup>), 2, 4-D (0.5 mg L<sup>-1</sup>) and AIB (1 mg L<sup>-1</sup>); followed by T2B [50% of MS salts with BAP (4 mg L<sup>-1</sup>) and 2, 4-D (1 mg L<sup>-1</sup>)]. These media were supplemented with AgNO<sub>3</sub> (6.8 mg L<sup>-1</sup>) and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (6.3 mg L<sup>-1</sup>). Using T1B/T2B led greater callus proliferation (up to 248 mg), but low percentages of embryogenic callus (less than 29%) and less differentiated than those obtained in the middle 23A8 (160 mg). In the multiplication phase were obtained calluses from 1 to 2.5 mg and multiplication rate of 10 to 24 times the initial biomass they. In differentiation, embryogenic potential of 25 000 to 137 000 embryos per gram of inoculated callus was observed. At each stage the effect of ethylene inhibitors genotype dependent on interaction with the culture medium.

**Palabras clave:** *Coffea canephora* P., AgNO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, potencial embriogénico, tasa de multiplicación.

**Keywords:** *Coffea canephora* P., AgNO<sub>3</sub>, embryogenic potential, multiplication rate, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

## Introducción

Varios factores pueden afectar la embriogénesis somática en café, tales como la combinación de sales, presencia o ausencia de algunas hormonas, así como el ambiente gaseoso de los contenedores *in vitro* (Kumar *et al.*, 2009; López-Gómez *et al.*, 2010). Generalmente, es posible inducir embriogénesis somática en *Coffea canephora* variedad Robusta, sólo con la presencia de la citocinina 6-benzilaminopurina (BAP) en el medio de inducción. Sin embargo, en algunos clones no se obtienen buenos resultados con este medio y en ciertos casos el desarrollo de callo embriogénico es un proceso largo, que va de seis a diez meses dependiendo del genotipo (López-Gómez *et al.*, 2010; López-Gómez *et al.*, 2011).

En *C. arabica*, la presencia de alguna auxina es siempre necesaria para la obtención de callo embriogénico (Van Boxtel y Bertouly, 1996; Pierson *et al.*, 1983). Por otro lado, el ambiente gaseoso juega un papel muy importante en el cultivo *in vitro*. La atmósfera de los recipientes de cultivo puede contener altas concentraciones de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) y etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>). El primero es conocido por su efecto positivo en la fase de germinación *ex vitro* (Ducos *et al.*, 2009). El segundo es un componente que afecta la respuesta morfológica *in vitro*. Kumar *et al.*, (2009), demostraron que el etileno inhibe la embriogénesis secundaria en café Robusta. Algunos estudios se han basado en la aplicación de inhibidores del etileno (AgNO<sub>3</sub>, cloruro de cobalto y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) o inhibidores de la síntesis del etileno (ácido salicílico), para suprimir su efecto negativo (Kumar *et al.*, 2007).

Algunos reportes describen el efecto de los inhibidores en la inducción de la organogénesis *in vitro* (Giridhar *et al.*, 2003) y embriogénesis directa en café Robusta (Giridhar *et al.*, 2004), pero se desconocen sus efectos en la embriogénesis somática indirecta en cuanto a la inducción de callo embriogénico y su efecto para las fases de multiplicación y diferenciación.

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la combinación de dos medios de cultivo e inhibidores de etileno sobre la inducción de callo embriogénico de *C. canephora* P., y su capacidad para multiplicarse y diferenciarse.

## Introduction

Several factors can affect the somatic embryogenesis in coffee, such as the combination of salts, presence or absence of some hormones and the gaseous environment of the containers *in vitro* (Kumar *et al.*, 2009; López-Gómez *et al.*, 2010). Generally, it is possible to induce somatic embryogenesis in *Coffea canephora* Robusta variety, only the presence of the cytokinin 6-benzylaminopurine (BAP) in the induction medium. However, in some clones no good results are obtained with this medium and in some cases the development of embryogenic callus is a long process, ranging from six to ten months depending on the genotype (López-Gómez *et al.*, 2010; López-Gómez *et al.*, 2011).

In *C. arabica*, the presence of some auxin is always necessary for obtaining embryogenic callus (Pierson *et al.*, 1983; Van Boxtel and Bertouly, 1996). On the other hand, the gaseous environment plays a very important role in the culture *in vitro*. The atmosphere of the culture vessels may contain high concentrations of carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) and ethylene (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>). The first is known for its positive effect on germination phase *ex vitro* (Ducos *et al.*, 2009). The second is a component that affects the morphogenic response *in vitro*. Kumar *et al.* (2009), they showed that inhibits ethylene secondary embryogenesis in robusta coffee. Some studies have been based on the application of ethylene inhibitors (AgNO<sub>3</sub>, cobalt chloride and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) or inhibitors of ethylene synthesis (salicylic acid) to suppress their negative effect (Kumar *et al.*, 2007).

Some reports describe the effect of inhibitors on the induction of *in vitro* organogenesis (Giridhar *et al.*, 2003) and direct embryogenesis robusta coffee (Giridhar *et al.*, 2004), but its effects are unknown indirect somatic embryogenesis in as for embryogenic callus induction and its effect for multiplication and differentiation phases.

The aim of this work was to study the effect of the combination of two culture media and ethylene inhibitors on induction of embryogenic callus of *C. canephora* P., and their ability to multiply and differentiate.

## Materiales y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Desarrollo Nestlé, Tours, Francia (NR&DC-T siglas en Inglés). Se emplearon hojas jóvenes y totalmente expandidas de genotipos de *C. canephora* P., variedad Robusta (FRT06, FRT07, FRT09, FRT22 y FRT23), seleccionados por su alto rendimiento. Todos ellos obtenidos de la colección del NR&DC-T, los cuales fueron desinfectados y establecidos *in vitro* de acuerdo a la metodología de Ducos *et al.* (2007). Los explantes fueron incubados en condiciones de oscuridad a 25 °C, subcultivados cada 30 días y puestos en las mismas condiciones.

Se tuvieron seis tratamientos por genotipo que consistieron en: 1) el 23A8 [sales de Yasuda *et al.*, (1985), vitaminas de Gamborg (2002), 1.12 mg L<sup>-1</sup> de 6-Benzilaminopurina (BAP) y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa]; 2) el 23A8 adicionado con 6.8 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>; 3) el 23A8 adicionado con 6.3 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 4) secuencia de medios T1B/T2B (Van Boxtel y Berthouly 1996): el medio T1B (utilizado durante un mes) compuesto por 50% de las sales de Murashige y Skoog (1962), más vitaminas de Gamborg (2002), 2 mg L<sup>-1</sup> de 2-isopenteniladenina (2iP), 0.5 mg L<sup>-1</sup> de 2,4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), 1 mg L<sup>-1</sup> de ácido indolbutírico (AIB), 400 mg L<sup>-1</sup> de extracto de malta, 100 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; el T2B (empleado durante dos meses) compuesto por 50% de las sales y vitaminas de Murashige y Skoog (1962), 4 mg L<sup>-1</sup> de BAP, 60 mg L<sup>-1</sup> de sulfato de adenina, 1 mg L<sup>-1</sup> de 2, 4-D, 800 mg L<sup>-1</sup> de extracto de malta, 200 mg L<sup>-1</sup> de caseína hidrolizada y 30 g L<sup>-1</sup> de sacarosa; 5) la secuencia de medios T1B/T2B adicionado con 6.8 mg L<sup>-1</sup> de AgNO<sub>3</sub>; y 6) el T1B/T2B adicionado con 6.3 mg L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Todos los medios fueron gelificados con 8 g L<sup>-1</sup> de agar y ajustados a un pH de 5.6. En el cuarto mes se eliminaron el AgNO<sub>3</sub> y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> y en el sexto mes del establecimiento *in vitro* se evaluaron el porcentaje y peso fresco de callo embriogénico (tejido friable, amarillo y de aspecto granuloso) (Ducos *et al.*, 1999). Cada tratamiento consistió de cuatro repeticiones de tres cajas Petri, una caja Petri con 50 mL de medio de cultivo e inoculado con quince explantes, un explante consistió en 3 mm<sup>2</sup> de hoja.

Después de seis meses de inducción y en los tratamientos en donde hubo suficiente callo, se seleccionaron callos embriogénicos y se transfirieron a 10 mL de medio líquido de multiplicación (23A8 sin agar), en matraces Erlenmeyer de 25 mL con una densidad de 10 g L<sup>-1</sup>. Los matraces fueron colocados en un agitador orbital (110 rpm), a 25 °C en

## Materials and methods

This work was conducted at the Center for Research and Development Nestle, Tours, France (NR&DC-T) the young leaves are used and fully expanded genotypes of *C. canephora* P., Robusta variety (FRT06, FRT07, FRT09, FRT22 and FRT23), selected for their high performance. All they obtained from the collection of NR&DC-T, which were disinfested and established *in vitro* according to the methodology of Ducos *et al.* (2007). The explants were incubated in the dark at 25 °C, subcultured every 30 days and placed under the same conditions.

The Six treatments consisted genotype were taken: 1) the 23A8 [Yasuda *et al.* (1985) salts, Gamborg (2002) vitamins, 1.12 mg L<sup>-1</sup> of 6-benzylaminopurine (BAP) and 30 g L<sup>-1</sup> sucrose]; 2) I 23A8 supplemented with 6.8 mg L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>; 3) I 23A8 supplemented with 6.3 mg L<sup>-1</sup> of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 4) sequence T1B/T2B means (Van Boxtel and Berthouly 1996): the T1B medium (used for a month) composed of 50% of Murashige and Skoog (1962), more vitamins Gamborg (2002), 2 mg L<sup>-1</sup> of 2-isopentenyladenine (2iP), 0.5 mg L<sup>-1</sup> of 2,4-dichlorophenoxyacetic (2, 4-D), 1 mg L<sup>-1</sup> of indolbutyric acid (AIB), 400 mg L<sup>-1</sup> of extract malt, 100 mg L<sup>-1</sup> of hydrolysed casein and 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose; T2B (employed for two months) comprised 50% of the salts and vitamins of Murashige and Skoog (1962), 4 mg L<sup>-1</sup> of BAP, 60 mg L<sup>-1</sup> of adenine sulfate, 1 mg L<sup>-1</sup> of 2, 4-D, 800 mg L<sup>-1</sup> of malt extract, 200 mg L<sup>-1</sup> of hydrolysed casein and 30 g L<sup>-1</sup> of sucrose; 5) sequence T1B/T2B media supplemented with 6.8 mg L<sup>-1</sup> of AgNO<sub>3</sub>; and 6) the T1B/T2B supplemented with 6.3 mg L<sup>-1</sup> of Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. All media were gelled with 8 g L<sup>-1</sup> of agar and adjusted to pH 5.6. In the fourth month they eliminated and Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and AgNO<sub>3</sub> in the sixth month of *in vitro* setting were evaluated percentage and fresh weight of embryogenic callus (friable tissue, yellow and grainy) (Ducos *et al.*, 1999). Each treatment consisted of four replications of three Petri dishes, a Petri dish with 50 mL of culture medium and inoculated with fifteen explant explant consisted of 3 mm<sup>2</sup> sheet.

After six months of induction and treatments where there were sufficient callus, embryogenic callus were selected and transferred to 10 mL of liquid multiplication medium (23A8 without agar) in Erlenmeyer flasks 25 mL with a density of 10 g L<sup>-1</sup>. The flasks were placed on an orbital shaker (110 rpm) at 25 °C in darkness. At this stage the fresh weight (mg), multiplication rate was evaluated, [Tm=

oscuridad. En esta fase se evaluó el peso fresco (mg), tasa de multiplicación [ $T_m = (Pf(\text{semana } 6) - Pf(\text{semana } 0)) / Pf(\text{semana } 0)$ ] y el grado de diferenciación de la suspensión de acuerdo al criterio descrito en el Cuadro 1.

**Cuadro 1. Criterio para la evaluación del grado de diferenciación de la suspensión en la fase de multiplicación en medio líquido de genotipos de *C. canephora*.**

**Table 1. Criteria for evaluating the degree of differentiation of the suspension in the multiplication phase in liquid medium of *C. canephora* genotypes.**

Grado de diferenciación	Descripción
I	Embriones somáticos en fase torpedo (muy diferenciado)
II	Embriones somáticos en diferente estadio (globular, acorazonado, torpedo), heterogéneos en tamaño y forma
III	Mezcla de embriones en diferente estadio homogéneos en forma
IV	Mezcla de agregados celulares y embriones
V	Solo agregados celulares

Por otro lado se seleccionaron callos embriogénicos y se colocaron en 100 mL de medio líquido para la diferenciación (23A8 sin agar y BAP), en matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, con una densidad de  $1 \text{ g L}^{-1}$ . Los matraces fueron colocados en agitadores orbitales (110 rpm), a  $25^\circ\text{C}$  con fotoperiodo de 16 hrs luz (0.1 - 0.6 kilolux) y 8 h de oscuridad. Para esta etapa se evaluaron la cantidad de embriones producidos por matraz para conocer el potencial embriogénico [número de embriones  $\text{g}^{-1}$  de callo = número de embriones por matraz (número de embriones en 1 g de muestra X peso total de embriones por matraz g) / densidad de inóculo inicial (g)]. Los cambios a medio fresco se hicieron de acuerdo a lo sugerido por Ducos *et al.* (2003). Se establecieron tres repeticiones por tratamiento, donde una repetición fue un matraz Erlenmeyer con la densidad antes mencionada. Todas las variables fueron analizadas por un ANOVA y la comparación de medias se llevó a cabo con la prueba de Tukey con 0.05 de significancia estadística, con la ayuda del programa estadístico SAS versión 9.0 (SAS institute 2002).

( $Pf(\text{week } 6) - Pf(\text{week } 0) / Pf(\text{week } 0)$ ) and the degree of differentiation of the suspension according to the criteria described in Table 1.

Furthermore embryogenic callus were selected and placed in 100 mL of liquid medium for differentiation (23A8 without agar and BAP) in 250 mL of Erlenmeyer flasks capacity, with a density of  $1 \text{ g L}^{-1}$ . The flasks were placed on orbital shakers (110 rpm) at  $25^\circ\text{C}$  with 16 hours photoperiod light (0.1 to 0.6 kilolux) and 8h dark. For this step were evaluated the number of embryos produced per flask to know the embryogenic potential [number of embryos  $\text{g}^{-1}$  of callus = number embryos per flask (number of embryos in 1 g of sample x total weight of embryos per flask g) / initial inoculum density (g)]. The changes were made to fresh medium according to suggested by Ducos *et al.* (2003). The three repetitions per treatment, which was a repetition Erlenmeyer flask with the aforementioned density were established. All variables were analyzed by ANOVA and mean comparison was carried out with the Tukey test with statistical significance 0.05, with the help of statistical program SAS version 9.0 (SAS Institute 2002).

## Results and discussion

At six months of induction, explants began to produce different types of morphogenic response. One was the formation of embryogenic callus (Figure 1a). The was also possible to observe direct embryogenesis expressed in the formation of groups of embryos directly explant (Figure 1b), production of aqueous, necrotic and nodular callus (Figure 1c, d, e and f); and late embryogenic callus formation from the aqueous, necrotic and nodular callus (Figure 1 e, f g h) and explant no response (Figure 1i). About Ducos *et al.* (2007) mentioned undesirable embryo formation directly explant, as this type of response (direct embryogenesis) limits the potential of somatic embryogenesis for mass propagation scheme.

In treatments whose base medium was the 23A8 the formation of embryogenic callus was given from the explant in treatments with the average 23A8, but in treatments with T1B/T2B sequence (in the presence of auxin), the formation of embryogenic callus It came from a necrotic callus that formed early, as in the case of genotype FRT07 in the middle T1B/T2B supplemented with  $\text{AgNO}_3$  (Figure 1f). This confirms the findings of Ducos *et al.* (2009) and López-Gómez *et al.* (2010), who mentioned that it is possible

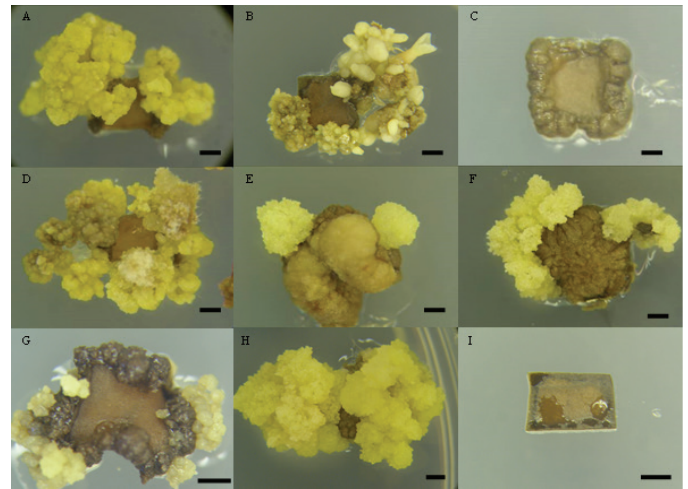
## Resultados y discusión

A los seis meses de inducción, los explantes comenzaron a producir diferentes tipos de respuesta morfológica. Una de ellas fue la formación de callo embriogénico (Figura 1a). También fue posible observar embriogénesis directa expresada en la formación de grupos de embriones directamente del explante (Figura 1b), producción de callo acuoso, necrótico y nodular (Figura 1c, d, e y f); y formación tardía de callo embriogénico a partir del callo acuoso, necrótico y nodular (Figura 1 e, f, g y h) y explante sin respuesta (Figura 1i). Al respecto Ducos *et al.* (2007) mencionan como indeseable la formación de embriones de manera directa del explante, ya que este tipo de respuesta (embriogénesis directa) limita el potencial de la embriogénesis somática para un esquema de propagación masiva.

En los tratamientos cuyo medio base fue el 23A8 la formación de callo embriogénico se dio a partir del explante en los tratamientos con el medio 23A8, pero en los tratamientos con la secuencia T1B/T2B (en presencia de auxinas), la formación de callo embriogénico se dio a partir de un callo necrótico que se formó en etapas tempranas, tal es el caso del genotipo FRT07 en el medio T1B/T2B suplementado con  $\text{AgNO}_3$  (Figura 1f). Lo anterior confirma lo encontrado por Ducos *et al.* (2009) y López-Gómez *et al.* (2010), quienes mencionan que es posible obtener callo embriogénico sólo con la presencia de BAP como regulador del crecimiento; sin embargo, algunos autores en estudios con diversos genotipos de café Robusta mencionan que es necesaria la presencia de auxinas (González, 2003), e incluso un balance entre auxinas y citocininas, que favorezcan la formación de callo con potencial embriogénico (Van Boxtel y Berthouly, 1996).

En el Cuadro 2, se puede observar que hay diferencias significativas entre los tratamientos para cada variable, con excepción de la biomasa para los genotipos FRT07 y FRT22, así como en el porcentaje de callo embriogénico para el genotipo FRT22. En la comparación del porcentaje de callo embriogénico obtenido en los medios 23A8 y T1B/T2B, se puede observar que el segundo medio propició una drástica reducción de la respuesta morfológica para los genotipos FRT07 y FRT09. Por el contrario, este mismo medio favoreció el peso del callo embriogénico del genotipo FRT23. Para los genotipos FRT06 y FRT22 este medio tendió a disminuir la frecuencia de callo embriogénico, sin embargo, incrementó el peso. Este tipo de respuesta ha sido

to obtain embryogenic callus only with the presence of BAP as a growth regulator; however, some authors in studies with different genotypes of robusta coffee mentioned that the presence of auxin (González, 2003) is necessary, and even a balance between auxin and cytokinin, which favor the formation of callus with embryogenic potential (Van Boxtel and Berthouly, 1996).



**Figura 1. Diferente respuesta morfológica de genotipos de café Robusta. a) callo embriogénico del FRT06 en 23A8; b) embriogénesis directa del FRT07 en 23A8- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; c) callo necrótico del FRT07 en T1B/T2B; d) callo embriogénico y acuoso del FRT06 en 23A8- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; e) callo embriogénico a partir de callo necrótico del FRT22 en T1B/T2B- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; f) callo embriogénico a partir de callo necrótico del FRT07 en T1B/T2B- $\text{AgNO}_3$ ; g) callo embriogénico a partir de callo nodular del FRT22 en el medio 23A8- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; h) callo embriogénico del FRT23 en T1B/T2B- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; e i) explante sin respuesta morfológica. Barra= 1 mm.**

**Figure 1. Different morphogenic response of robusta coffee genotypes. a) embryogenic callus on the FRT06 in 23A8; b) direct embryogenesis FRT07 in 23A8- $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; c) in necrotic callus FRT07 in T1B/T2B; d) aqueous and embryogenic callus of 23A8-FRT06 in  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; e) embryogenic callus from necrotic callus of FRT22 in T1B/T2B-  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; f) embryogenic callus from necrotic callus of FRT07 in T1B / T2B- $\text{AgNO}_3$ ; g) callus from nodular embryogenic callus FRT22 in the medium 23A8-  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; h) embryogenic callus of FRT23 in T1B/T2B-  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ; and i) explant without morphogenic response. Bar= 1 mm.**

In Table 2, it can be seen that there are significant differences between treatments for each variable, with the exception of biomass for FRT07 and FRT22 genotypes as well as in the

observada en diversas especies al utilizar nuevos inductores de calogénesis en cultivos de interés agrícola (Montes *et al.*, 2000).

percentage of embryogenic callus for genotype FRT22. In comparing the percentage of embryogenic callus obtained in the means 23A8 and T1B/T2B, it can be seen that the second

**Cuadro 2. Porcentaje de callo embriogénico (CE) y peso fresco (PFS) en medio semisólido de genotipos de café obtenidos a partir de los medios de inducción; peso fresco en medio líquido (PFL), tasa de multiplicación (TDM), grado de diferenciación de la suspensión (GD) de líneas celulares en fase de multiplicación en medios líquidos y número de embriones (ES) por gramo de callo para el potencial embriogénico de los callos en la fase de diferenciación y en presencia de inhibidores de etileno.**

**Table 2. Percentage of embryogenic callus (CE) and fresh weight (PFS) in semisolid medium of coffee genotypes obtained from the induction means; fresh weight in liquid medium (PFL), multiplication rate (TDM), degree of differentiation of the suspension (GD) OF cell lines under multiplication in liquid media and number of embryos (ES) per gram of callus for embryogenic potential callus differentiation stage in the presence of inhibitors and ethylene.**

Genotipo/tratamiento	CE (%) <sup>†</sup>	PFS (mg) <sup>†</sup>	PFL (g) <sup>†</sup>	TDM <sup>†</sup>	ES g <sup>-1</sup> de callo <sup>†</sup>	GD <sup>†</sup>
FRT06						
23A8	41 ab	82 ab	1.9 a	18 a	39 252 a	VI
23A8-AgNO <sub>3</sub>	1 c	2 b	- <sup>‡</sup>	-	-	-
23A8-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	3 a	160 a	2 a	19 a	31 481 a	V
T1B/T2B	22 b	110 ab	1.5 a	14 a	97 737 a	V
T1B/T2B-AgNO <sub>3</sub>	1 c	3 b	-	-	-	-
T1B/T2B-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	41 ab	174 a	1.8 a	17 a	95 796 a	IV
FRT07						
23A8	39 ab	25 a	1.7 a	16 a	66 476 a	IV
23A8-AgNO <sub>3</sub>	30 ab	25 a	1.4 a	13 a	48 667 a	IV
23A8-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	56 a	18 a	1.3 a	13 a	-	IV
T1B/T2B	1 c	2 a	-	-	-	-
T1B/T2B-AgNO <sub>3</sub>	12 bc	60 a	1.2 a	12 a	59 026 a	IV
T1B/T2B-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5 c	31 a	-	-	53 550 a	-
FRT09						
23A8	50 a	26 a	2.3 a	22 a	62 840 a	IV
23A8-AgNO <sub>3</sub>	0 b	0 b	-	-	-	-
23A8-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	45 a	32 a	2.5 a	24 a	59 580 a	IV
T1B/T2B	0 b	0 b	-	-	-	-
T1B/T2B-AgNO <sub>3</sub>	0 b	0 b	-	-	-	-
T1B/T2B-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0 b	0 b	-	-	-	-
FRT22						
23A8	15 a	13 a	1.1 a	10 a	-	V
23A8-AgNO <sub>3</sub>	0 a	0 a	-	-	-	-
23A8-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	18 a	15 a	-	-	-	-
T1B/T2B	6 a	61 a	1.6 a	15 a	116 530 a	III
T1B/T2B-AgNO <sub>3</sub>	3 a	2 a	1.3 a	13 a	-	V
T1B/T2B-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6 a	24 a	2.3 a	22 a	94 083 a	III
FRT23						
23A8	65 a	18 b	1 b	9 b	25 720 a	V
23A8-AgNO <sub>3</sub>	1 c	1 b	-	-	-	-
23A8-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	71 a	40 ab	1.3 ab	12 b	137 555 a	V
T1B/T2B	29 b	248 a	1.4 ab	13 ab	69 646 bc	II
T1B/T2B-AgNO <sub>3</sub>	0 c	0 b	-	-	-	-
T1B/T2B-Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	28 b	198 ab	2.4 a	24 a	86 687 ab	II

<sup>†</sup>Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes según Tukey ( $p \leq 0.05$ ). <sup>‡</sup>En estos tratamientos no fue posible establecer la multiplicación y diferenciación en medios líquidos por no contar con suficiente callo embriogénico.

Lo concerniente al efecto de los inhibidores del etileno, la respuesta fue diferente y dependió de los genotipos y del medio. Para el genotipo FRT06, se pudo ver que la presencia del  $\text{AgNO}_3$  inhibió la producción de callo embriogénico en ambos medios. En general, el  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  en ambos medios tuvo un efecto positivo, ya que en la mayoría de los genotipos evaluados, en interacción con alguno de los medios evaluados favoreció la formación de callo embriogénico, y por consiguiente hasta la obtención de embriones somáticos. Para el genotipo FRT07, el  $\text{AgNO}_3$  favoreció la producción de biomasa, pero sólo cuando fue adicionado a la secuencia de medios T1B/T2B; esto último confirma los resultados obtenidos por otros autores, quienes consignan que el efecto del  $\text{AgNO}_3$ , estará en función del genotipo, especie y sobre todo en interacción con otros reguladores como las auxinas y fuentes de carbono (Fuentes *et al.*, 2000; Giridhar *et al.*, 2004). Para el genotipo FRT09, los inhibidores no favorecieron la embriogénesis en ninguno de los medios evaluados.

Para el genotipo FRT22 tanto para la frecuencia de callo embriogénico como para la biomasa, no se detectó efecto por la presencia de inhibidores de etileno. Y por último, para el genotipo FRT23, la producción de callo embriogénico fue mejor con la secuencia de medios T1B/T2B adicionado con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Esta respuesta puede atribuirse a la concentración empleada de los inhibidores de etileno, ya que de acuerdo a Wang *et al.* (2002) el efecto inhibitorio de la acción del etileno por el  $\text{AgNO}_3$  dependerá del número de iones plata para reemplazar a los iones de cobre que necesita el etileno para tener receptores funcionales en las células vegetales.

En la fase de multiplicación, no se detectaron diferencias significativas en términos de biomasa, tasa de multiplicación y calidad de la suspensión para los genotipos FRT06, FRT07, FRT09 y FRT22. La tasa de multiplicación fue de 10 a 20 después de seis semanas de cultivo. Estos resultados concuerdan con los resultados de Ducos y Pétiard (2003), quienes mencionan que la multiplicación de biomasa se da por un factor de 2 a 3 cada dos semanas.

En el caso del genotipo FRT23, el análisis estadístico mostró que la biomasa y la tasa de multiplicación de callos obtenido de la secuencia T1B/T2B adicionado con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  fueron mayor que el resto de los tratamientos; sin embargo, esta suspensión estuvo compuesta principalmente por embriones en diferente estado, tal material recibió una clasificación de "II" por lo que no puede ser considerado como una suspensión celular. Al respecto Ducos y Pétiard (2003) mencionan que una suspensión celular en la fase de multiplicación debe

half led to a drastic reduction in the morphogenic response for FRT09 and FRT07 genotypes. Conversely, this same medium favored the weight of embryogenic callus FRT23 genotype. For FRT06 and FRT22 genotypes hereby tended to decrease the frequency of embryogenic callus, however, it increased weight. This type of response has been observed in various species using inductors callogenesis new crops of agricultural interest (Montes *et al.*, 2000).

The concerning the effect of inhibitors of ethylene, the response was different and depended on the genotypes and the environment. For genotype FRT06, you could see that the presence of  $\text{AgNO}_3$  inhibited the production of embryogenic callus in both media. Overall,  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  in both media had a positive effect, since in most genotypes, interacting with any of the media tested favored formation of embryogenic callus and therefore to obtaining somatic embryos. The FRT07 for genotype, the favored  $\text{AgNO}_3$  biomass production, but only when was added to the sequence T1B/T2B means; the latter confirms the results obtained by other authors, who recorded the effect of  $\text{AgNO}_3$ , will depend on the genotype, species and especially in interaction with other regulators such as auxin and carbon sources (Fuentes *et al.*, 2000; Giridhar *et al.*, 2004). The FRT09 for genotype inhibitors embryogenesis not favored in any of the media tested.

The FRT22 genotype for both the frequency of embryogenic callus as biomass, no effect was detected by the presence of inhibitors of ethylene. And finally, for genotype FRT23, production of embryogenic callus was better with the sequence T1B/T2B media supplemented with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . This response can be attributed to the use concentration of ethylene inhibitors, since according to Wang *et al.* (2002) the inhibitory effect of ethylene action by  $\text{AgNO}_3$  depend on the number of silver ions to replace copper ions need to have functional ethylene receptors in plant cells.

In the multiplication phase, no significant differences were detected in terms of biomass, multiplication rate and quality of the suspension for FRT06, FRT07, FRT09 and FRT22 genotypes. The multiplication rate was 10 to 20 after six weeks of culture. These results are consistent with the results of Ducos and Pétiard (2003), who mentioned that the multiplication of biomass is given by a factor of two to three every two weeks.

In the case of genotype FRT23, statistical analysis showed that biomass and multiplication rate of callus obtained from the T1B/T2B sequence added with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  were greater than the other treatments; however, this suspension was mainly

estar compuesta por agregados celulares compactos y de un tamaño aproximado de 0.3 a 1.5 mm. En el resto de los casos, se pudo observar que las suspensiones estaban compuestas por una mezcla de agregados celulares y embriones, o bien sólo por agregados; este último tipo de respuesta es la deseada ya que permiten establecer un esquema de propagación masiva, ya sea para reiniciar un ciclo de multiplicación o inducir la diferenciación para la obtención de embriones.

En cuanto a la diferenciación se pudo observar que el potencial embriogénico varió de 25 a 137 mil embriones por gramo de callo inoculado (Cuadro 2). Estos resultados son similares a los obtenidos por Ducos *et al.* (2007), quienes mencionan que el potencial embriogénico de los callos de café Robusta es de 50 000 embriones en promedio por gramo de callo.

Lo concerniente al origen de los callos, no se detectaron diferencias significativas para los genotipos FRT06, FRT07, FRT09 y FRT22. Sin embargo, en el genotipo FRT06 se pudo ver que los callos embriogénicos provenientes de la secuencia T1B/T2B y T1B/T2B con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  presentaron un mayor potencial que los callos provenientes del medio 23A8 (Testigo). Por otro lado, para el genotipo FRT23 se encontraron diferencias significativas y el mejor tratamiento para este genotipo lo propiciaron los callos provenientes del medio 23A8 adicionado con  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (un poco más de 137 mil embriones por gramo de callo embriogénico inoculado). Al respecto Kumar *et al.* (2007) mencionan que el efecto del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  no es claro y parece estar asociado a que este como componente del medio puede favorecer la síntesis endógena de auxinas. Por lo que un estudio dirigido a evaluar los niveles endógenos de este regulador en presencia y ausencia de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , podría contribuir a confirmar o descartar ésta hipótesis.

## Conclusiones

Se logró determinar el efecto de inhibidores de etileno en interacción con dos medios de cultivo. El callo embriogénico obtenido a partir de los tratamientos mostró capacidad para proliferar en medio líquido, y el potencial embriogénico suficiente para obtener una cantidad aceptable de embriones por gramo de callo. En cada fase de la embriogénesis somática de café, el efecto de los inhibidores de etileno dependió de los genotipos en interacción con el medio de cultivo. Lo anterior permitió sugerir medios de cultivo adicionales en cada genotipo evaluado para la propagación por embriogénesis somática.

composed of embryos in different state, such material received a rating of "II" so cannot be considered as a cell suspension. About Ducos and Pétiard (2003) note that a cell suspension in the multiplication phase must consist of compact and a size of approximately 0.3 to 1.5 mm cell aggregates. In other cases, it was observed that suspensions were composed of a mixture of cell aggregates and embryos, or only aggregates; the latter type of response is desired as they allow to establish a mass propagation scheme either to restart a multiplication cycle or induce differentiation to obtain embryos.

As differentiation could be observed that the embryogenic potential ranged from 25 to 137 000 embryos per gram of callus inoculated (Table 2). These results are similar to those obtained by Ducos *et al.* (2007), who mentioned that the embryogenic potential of robusta coffee callus is on average 50 000 embryos per gram of callus.

The concerning the origin of corns, no significant differences for FRT06, FRT07, FRT09 and FRT22 genotypes were detected. However, in the genotype FRT06 it could be seen that the embryogenic callus from the T1B/T2B and T1B/T2B with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  sequence showed a greater potential calluses from the middle 23A8 (Witness). On the other hand, for genotype FRT23 were found significant differences and the best treatment for this genotype led the calluses from the middle 23A8 added with  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (a little more than 137 000 embryos per gram of embryogenic callus inoculated). About Kumar *et al.* (2007) mention that the effect of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  is unclear and appears to be associated with this as a component of the medium can promote the endogenous synthesis of auxin. So a study to assess endogenous levels of this regulator in the presence and absence of  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , could help confirm or refute this hypothesis.

## Conclusions

It was possible to determine the effect of ethylene inhibitors in interaction with two culture media. The embryogenic callus obtained from treatments showed ability to proliferate in liquid medium, the embryogenic potential sufficient and to obtain an acceptable number of embryos per gram of callus. In each phase of somatic embryogenesis coffee, the effect of ethylene inhibitors genotypes depended on interaction with the culture medium. This allowed suggest additional means of culture in each genotype evaluated for propagation by somatic embryogenesis.



## Recomendaciones

Adicionalmente al medio 23A8 empleado generalmente en la fase de inducción de callo embriogénico de café Robusta, se pueden recomendar los siguientes medios de cultivo: genotipos FRT06 y FRT23= T1B/T2B y T1B/T2B-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; para el genotipo FRT07= T1B/T2B-AgNO<sub>3</sub> y; para el genotipo FRT09= 23A8-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

## Agradecimientos

A los fondos fiscales del INIFAP y a la empresa Nestlé S. A. de C. V., por el apoyo recibido para la realización de este trabajo en el Centro de Investigación y Desarrollo de Nestlé, Tours, Francia (NR&DC-T siglas en Inglés).

## Literatura citada

- Ducos, J. P.; Gianforcaro, M.; Florin, B.; Pétiard, V. and Deshayes, A. 1999. A technically and economically attractive way to propagate elite *Coffea canephora* (Robusta) clones: *in vitro* somatic embryogenesis. *In: XVIII Colloquium Sci. Int. Coffee*. Helsinki. 295-301 pp.
- Ducos, J. P.; Alenton, R.; Reano, J. F.; Kanchanomai, C.; Deshayes, A. and Pétiard, V. 2003. Agronomic performance of *Coffea canephora* P. trees derived from large-scale somatic embryo production in liquid medium. *Euphytica*. 131(2):215-223.
- Ducos, J. P. and Pétiard, V. 2003. Propagation of clones of Robusta (*Coffea canephora* P.) par embryogénèse somatique en milieu liquide. *In: El Hadrami I, Daayf, F. (Eds.). Biotechnologies Végétales: de la Structure des Génomes à l'Amélioration des Plantes*, El Watanya, Marrakech, Morocco. 142-159 pp.
- Ducos, J. P.; Labbe, G.; Lambot, C.; Pétiard, V. and Towill, L. 2007. Pilot scale process for the production of pre-germinated somatic embryos of selected robusta (*Coffea canephora*) clones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*. 43:(6) 652-659.
- Ducos, J. P.; Prévot A.; Lambot C. and Pétiard V. 2009. Positive effect of the CO<sub>2</sub> released by commercial substrates on the *ex vitro* germination rates of coffee somatic embryos. *Acta Hort.* (ISHS). 812:329-336.
- Fuentes, S. R. L.; Calheiros, M. B. P.; Manettifilho, J. and Vieira, L. G. E. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 60(1):5-13.
- Gamborg, O. L. 2002. *Plant Tissue Culture. The Technology. Part 1*. Exegetics Ltd. Edington. 547 p.
- Giridhar, P.; Indu, E. P.; Vijaya Ramu, D. and Ravishankar, G. A. 2003. Effect of silver nitrate on *in vitro* shoot growth of *Coffea*. *Tropical Sci*. 43(3):144-146.

## Recommendations

THE 23A8 addition to the medium generally used in the induction phase of embryogenic callus robusta coffee can recommend the following culture media: genotypes FRT06 and FRT23= T1B/T2B and T1B/T2B-Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; for genotype FRT07= T1B/T2B-AgNO<sub>3</sub> and; for genotype FRT09= 23A8- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

*End of the English version*



- Giridhar, P.; Indu, E. P.; Vinod, K.; Chandrashekar, A. and Ravishankar, G. A. 2004. Direct somatic embryogenesis from *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P. ex Fr., under the influence of ethylene action inhibitor-silver nitrate. *Acta Physiol. Plantarum*. 26(3):299-305.
- Gonzalez, V. M. E. 2003. Estudio del proceso de calogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffea canephora* P.). *Rev. Colomb. Biotecnol*. 5(1):16-22.
- Kumar, V.; Ramakrishna, A. and Ravishankar, G. A. 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P ex Fr. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 43(6):602-607.
- Kumar, V.; Parvatam, G. and Ravishankar, G. A. 2009. AgNO<sub>3</sub>-a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Elec. J. Biotechnol*. 12(2):1-15.
- López-Gómez, P.; Iracheta-Donjuan, L.; Castellanos-Juárez, M.; Méndez-López, I.; Sandoval-Esquivel, A.; Aguirre-Medina, J. F.; Ojeda-Zacarias, M. C. y Gutiérrez-Díez, A. 2010. Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Rev. Fitotec. Mex*. 33:205-213.
- López-Gómez P.; Iracheta-Donjuan L.; Castellanos-Juárez M.; Méndez-López I.; Aguirre-Medina J.F.; Gutiérrez-Díez A.; Ojeda-Zacarias M.C. y Pérez-Pérez B. R. 2011. Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos elite de *Coffea* spp., cultivados *in vitro*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*. 2:645-657.
- Montes, S.; Aldaz, J. P.; Cevallos, M.; Cabrera, J. C. y López, M. 2000. Uso del bioregulador Pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales*. 21(3):29-32.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15:473-497.
- Pierson, E. S.; Van Lammern, A. A. M.; Schel, H. N. and Staritsky, G. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf dishes of *Coffea canephora*. *Protoplasma*. 115:208-216.
- SAS Institute Inc., 2002, Cary, NC, USA.
- Wang, K. L. C.; Hai, L. and Ecker, J. R. 2002. Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell*. s131-s151 supplement.
- Van Bostel, J. and Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult*. 44:7-17.
- Yasuda, T.; Fujii, Y.; and Yamaguchi, T. 1985. Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol*. 26:595- 597.