

Cambios bioquímicos y morfométricos en *Coffea arabica* posterior a un tratamiento con metanosulfonato de etilo

Biochemical and morphometric changes in *Coffea arabica* after a treatment with ethyl methanesulfonate

José Gregorio Joya-Dávila^{1*}, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli¹, María Celina Luján-Hidalgo¹, Leslie Alondra Serrano-Gómez¹, Benigno Ruíz-Sesma²

¹ Tecnológico Nacional de México/IT de Tuxtla Gutiérrez, División de Estudios de Posgrado e Investigación, Carretera Panamericana km. 1080, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, C.P. 29050, México.

² Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 80. Carretera Federal Mérida - Chetumal Vía Corta km 169, Chunhuhub, Carrillo Puerto, Quintana Roo, C.P. 77160. México.

RESUMEN

El uso de metanosulfonato de etilo (EMS) es una tecnología utilizada para aumentar la variabilidad genética de cultivos. En el mejoramiento genético del café, EMS podría generar nuevos rasgos fenotípicos y bioquímicos de importancia agrícola. El objetivo de la presente investigación fue determinar los cambios en la morfología y producción de metabolitos secundarios en plantas de café generadas a partir de líneas celulares tratadas con EMS. Callos de *Coffea arabica* cv., Borbón fueron expuestos a nueve concentraciones de EMS, posteriormente, se determinó el porcentaje de supervivencia y la biomasa fresca. Se regeneraron plantas en medio MS suplementado con vitaminas, antioxidantes y 6-bencilaminopurina. A las 20 semanas se registraron cambios morfológicos observados con respecto a los callos no tratados con EMS. Empleando hojas secas se hizo la extracción de metabolitos secundarios, la cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución. La supervivencia y crecimiento del callo disminuyó con el aumento de la concentración de EMS (dosis letal media: 148.8 mM), en plántulas generó cambios en la morfología de la hoja, enanismo y la formación de tres meristemas, que aumentarían el número de hojas. Finalmente, 140 mM de EMS incrementó el contenido de cafeína, ácido cafeico y ácido clorogénico.

Palabras clave: mutagénesis, EMS, variabilidad genética, metabolismo secundario

ABSTRACT

The use of ethyl methanesulfonate (EMS) is a technology used to increase the genetic variability of cultivars. In coffee genetic improvement, EMS could generate new phenotypic and biochemical traits of agricultural importance. The objective of this research was to determine the changes in morphology and production of secondary metabolites in coffee plants generated from cell lines treated with EMS. Callus of *Coffea arabica* cv., Borbon were exposed to nine concentrations of EMS, and subsequently, the percentage of survival and fresh biomass were determined. Plants were regenerated on MS medium supplemented with vitamins, antioxidants, and

6-benzylaminopurine. At 20 weeks, morphological changes were observed compared to the callus not treated with EMS. Using dried leaves, secondary metabolites were extracted and quantified by high-performance liquid chromatography. Callus survival and growth decreased with increasing EMS concentration (mean lethal dose: 148.8 mM), in seedlings, it generated changes in leaf morphology, dwarfism, and the formation of three meristems, which would increase the number of leaves. Finally, 140 mM of EMS increased the content of caffeine, caffeic acid, and chlorogenic acid.

Keywords: mutagenesis, EMS, genetic variability, secondary metabolism

INTRODUCCIÓN

De las semillas del café se origina la bebida más consumida a nivel mundial denominada café, su origen y diversidad se ubica en las montañas de Etiopía en África (Mishra, 2019). El café se caracteriza por su crecimiento arbustivo, con dos meristemas caulinares opuestos que moldean la arquitectura de las ramas, las hojas son verdes, elípticas y apiculadas, con diferencias en la coloración de los brotes y frutos (IPGRI, 1996; González, 2022). En México el cultivo de café abarca una superficie de 710,897 ha distribuidas en 14 estados, (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera – SIAP, 2022). De las dos especies comerciales del género *Coffea* la más cultivada es *C. arabica* por sus atributos en taza, la cual, actualmente presenta limitantes en la producción al ser altamente susceptible a enfermedades y plagas, conllevando a la exploración de nuevos genotipos resistentes. La generación de nuevos cultivares de café utilizando el mejoramiento convencional, requiere la evaluación de siete ciclos de autopolinización de semilla a semilla, en un tiempo de 30 años (Loyola *et al.*, 2016), además, la estrecha diversidad genética del café y su comportamiento perenne, requieren de procesos que reduzcan el tiempo de los protocolos de mejoramiento genético (Cui *et al.*, 2020).

La mutagénesis *in vitro* mediante agentes químicos se ha convertido en un instrumento útil para incrementar la variabilidad genética con aplicación en fitomejoramiento y

*Autor para correspondencia: José Gregorio Joya Dávila
Correo-e: d19270972@tuxtla.tecnm.mx

Recibido: 17 de febrero de 2023

Aceptado: 30 de abril de 2023

Publicado: 1 de septiembre de 2023

genómica funcional (Suprasanna *et al.*, 2015). El metanosulfonato de etilo (EMS) es el agente mutagénico de uso común en plantas para generar cambios bioquímicos, fisiológicos y morfológicos dependientes de la dosis de exposición. Los rasgos morfológicos y bioquímicos permiten la diferenciación fenotípica entre plantas silvestres y mutantes, además, han sido, los primeros marcadores de selección de plantas de utilidad en la agricultura (Purente *et al.*, 2020). Serrat *et al.* (2014) reportan que molecularmente EMS alquila la base nitrogenada guanina en el oxígeno seis, ocupando uno de los puentes de hidrógeno de la unión con la base citosina generando una transición de G:C por A:T, por consiguiente, ocurre cambio en la secuencia de aminoácidos que conforman proteínas y en patrones de expresión. Al respecto, en *Agave americana* el tratamiento con EMS incrementó la actividad de la fenilalanina amonio liasa (PAL) y el contenido de metabolitos secundarios (Reyes *et al.*, 2019). La PAL inicia la ruta de biosíntesis del ácido cafeico y ácidos clorogénicos, metabolitos presentes en el café que son utilizados por la planta como defensa frente a patógenos (Luján-Hidalgo *et al.*, 2020). El enanismo es un efecto característico después de la mutación en muchos cultivares, generando entrenudos cortos y reducción de algunas estructuras vegetativas (Rime *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2023), que pueden ser de utilidad agronómica en muchos cultivares. A la fecha no se han generado variedades de *C. arabica* usando EMS, que proporcionen nuevos rasgos bioquímicos y fenotípicos importantes para el mejoramiento genético del café. El objetivo de la presente investigación fue determinar los cambios en la morfología y producción de metabolitos secundarios en plantas de café generadas a partir de callos tratados con EMS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se utilizaron callos inducidos a partir de hojas de *Coffea arabica* cv., Borbón, cultivados en recipientes de vidrio según Joya-Dávila *et al.* (2023). La composición del medio de cultivo fue 2.2 g L⁻¹ de medio Murashige y Skoog (1962) [MS, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EE. UU.] suplementado con 30 g L⁻¹ de sacarosa, 0.2 g L⁻¹ de ácido cítrico y 0.2 g L⁻¹ de ácido ascórbico (Sigma Aldrich®), 7.25 µM de 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y 4.4 µM de 6-bencilaminopurina (BAP), el pH del medio se ajustó a 5.7 y se solidificó con Phytigel™ (Sigma®, 2.5 g L⁻¹). Las condiciones de cultivo correspondieron a oscuridad total en cámara bioclimática a 25 ± 1 °C, por un periodo de 12 semanas con tres subcultivos.

Tratamiento con EMS

Callos de 200 mg (n = 20) fueron expuestos a nueve concentraciones EMS (0, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 y 220 mM) (Sigma®-Aldrich), durante dos horas, con agitación manual cada 10 min (Bolívar *et al.*, 2018 con modificaciones). Se realizó la inactivación del EMS con 100 mM de tiosulfato de sodio durante cinco minutos, seguido de tres lavados con agua estéril. Posteriormente, los callos fueron transferidos a medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹) líquido durante una hora en

agitación, se secaron en papel absorbente estéril por cinco minutos. Seguidamente, se cultivaron en medio MS (2.2 g L⁻¹) suplementado con 0.5 g L⁻¹ de carbón activado, 30 g L⁻¹ de sacarosa y 2.5 g L⁻¹ de Phytigel™, el pH se ajustó a 5.7, los cultivos permanecieron en oscuridad a 25 ± 1 °C.

Treinta días después fueron transferidos a medio de inducción de callo embriogénico reportado por Joya-Dávila *et al.* (2023), conformado por medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹), suplementado con sacarosa (30 g L⁻¹), 17.6 µM de BAP, 1.8 µM de 2,4-D, 30 µM de AgNO₃ y se solidificó con Phytigel™ (Sigma®, 2.5 g L⁻¹), el pH se ajustó a 5.7. Las condiciones de cultivo correspondieron a oscuridad total en cámara bioclimática a 25 ± 1 °C. Después de 25 d se evaluó el incremento de masa fresca (IMF) según la ecuación [1], el porcentaje de supervivencia y la dosis letal media (DL₅₀) se calculó mediante regresión lineal.

$$\text{IMF} = \text{masa final} - \text{masa inicial} \quad [1]$$

Regeneración de plantas

Para las siguientes determinaciones fueron considerados los tratamientos 0, 140 y 160 mM de EMS, por presentar la cantidad de biomasa embriogénica requerida. Los callos embriogénicos fueron transferidos a medios de cultivo para la maduración de embriones, conformado por medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹), suplementado con vitaminas (piridoxina 4.86 µM, ácido nicotínico 8.12 µM, tiamina 29.65 µM y myo-inositol 554 µM), sacarosa 30 g L⁻¹, L-Cisteína 0.04 g L⁻¹, extracto de malta 0.8 g L⁻¹, caseína 0.2 g L⁻¹, 4.44 µM de BAP, carbón activado 2 g L⁻¹ y 2.8 g L⁻¹ Phytigel™, el pH se ajustó a 5.6. Posteriormente, embriones somáticos cotiledonares se transfirieron a medio de germinación conformado por MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹) suplementado con vitaminas (piridoxina 4.86 µM, ácido nicotínico 8.12 µM, tiamina 29.65 µM y myo-inositol 554 µM), sacarosa 30 g L⁻¹, GA₃ (Sigma®, 2.89 µM) y Phytigel™ (Sigma®, 2.8 g L⁻¹), pH 5.6 (Sanglard *et al.*, 2019).

Determinación de parámetros morfométricos

Un grupo de 50 embriones somáticos cotiledonares seleccionados al azar por tratamiento (0, 140 y 160 mM de EMS) fueron distribuidos en cinco grupos (n = 10). Después de cuatro semanas de cultivo en medio de germinación fueron transferidos a medio MS (Sigma®, 4.3 g L⁻¹) suplementado con sacarosa 30 g L⁻¹ y 2.8 g L⁻¹ Phytigel™, el pH se ajustó a 5.6 (se realizaron dos subcultivos). Transcurridas 16 semanas de cultivo se evaluó el porcentaje de supervivencia de plantas y los parámetros morfológicos, número de hojas, altura de plantas, dimensiones de la hoja, forma y tipo de ápice, adicionalmente, se registraron cambios estructurales observados con respecto a los callos no tratados con EMS (0 mM). Las determinaciones se realizaron con base en el catálogo global de café arábica de world coffee research (2019) y descriptores morfométricos reportados para Chiapas por González (2022).

Extracción y cuantificación de metabolitos secundarios

La extracción se realizó utilizando ultrasonido con una frecuencia de 20 kHz, potencia de 130 W, a 35 °C por 20 min.

Empleando 250 mg de hojas deshidratadas y pulverizadas (Horno a 35 °C; hasta peso constante) en 10 mL de metanol al 80 %. Posteriormente, se centrifugó a 4000 rpm por 15 min para separar sólidos, se filtró al vacío usando papel Whatman número dos, al final se lavó con 5 mL de metanol al 100 %, este proceso se realizó dos veces. Por medio de rotaevaporación a 65 °C y vacío de -9.82 PSI, fue separado el disolvente y el agua restante se eliminó por liofilización a -39 °C y 0.47 mBar. Los extractos se almacenaron a -20 °C hasta las determinaciones cromatográficas. Todo el procedimiento se realizó en cuarto oscuro con luz difusa y protegiendo los extractos con una cubierta de aluminio. Se utilizó un procesador de sonda ultrasónica GEX130PB (Sonic and Materials Inc) y un liofilizador LABCONCO FreeZone 4.5 Plus (Adaptado de Luján-Hidalgo *et al.*, 2020).

La cuantificación de ácido cafeico (AC), cafeína (CF), ácido clorogénico (CL) y ácido gálico (AG), se efectuó mediante cromatografía líquida de alta resolución [PerkinElmer Series 200 HPLC Systems, Shelton, CT, USA.] conectado a un detector de arreglo de diodos. Las muestras liofilizadas fueron resuspendidas en agua tridestilada (5 mg mL⁻¹) y se filtraron con una membrana de 0.22 µm. Se empleó una columna Kromasil 100-5-C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm, 100A -SPELCO, Bellefonte, CA, USA). Como fase móvil se utilizó acetonitrilo/ácido fórmico al 0.1 % (80:20 v v⁻¹) (FASE A) y ácido fórmico al 1 % (v v⁻¹) (FASE B) en una relación 10:90 con un flujo constante de 1 mL por minuto en modo isocrático. La cuantificación se realizó a 280 nm para CF y AG, a 320 nm para AC y CL. Se inyectaron 10 µL de muestra. Las curvas de calibración se realizaron con estándares Sigma-Aldrich® de CL, AG, AC y CF (50, 100, 200, 300, 400 y 500 ppm) disueltos en agua tridestilada. Los metabolitos fueron expresados en µg por g⁻¹ de hoja seca

Análisis estadístico de los datos

Todos los ensayos se establecieron en un diseño completamente al azar, cada tratamiento estuvo conformado por cuatro repeticiones. Para cada variable se realizó un análisis de varianza y la prueba de comparación de medias de Tukey (P ≤ 0.05), en el paquete estadístico SAS® OnDemand (2022).

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Se observó una correlación negativa entre la supervivencia de callos y la dosis de EMS (Figura 1). La supervivencia celular disminuyó con el aumento de la concentración de EMS, con diferencias estadísticas significativas con respecto al control a partir de la dosis de 140 mM, llegando a ser letales a dosis superiores de 180 mM. Los callos no viables se caracterizaron por una coloración marrón y compactos. En esta investigación la dosis letal media calculada (148.8 mM; 60 min) y la dosis letal (200 mM; 60 min), fueron bajas con respecto a las reportadas por Bolívar *et al.* (2018) para la variedad Catuaí, con una DL₅₀ de 185.2 mM y dosis letal de 555.7 mM con exposición de 60 min. Lo que podría interpretarse como una respuesta diferencial entre variedades de café al tratamiento con EMS, situación que también fue observada por Chen *et*

al. (2023) en tres variedades de *Arachis hypogaea*. Estos resultados indican que es necesario determinar la dosis óptima de EMS previo a la inducción de mutaciones, que permita obtener células totipotenciales y alta frecuencia de mutaciones (Mba *et al.* 2010).

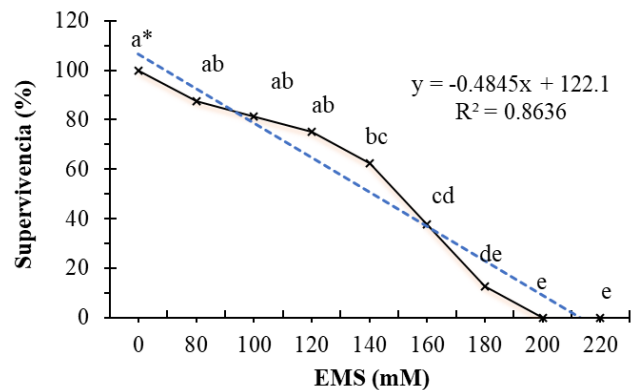


Figura 1. Efecto de concentraciones crecientes de EMS en la supervivencia de callos de *C. arabica*. *Diferente literal en la misma serie indica diferencias significativas (Tukey, P < 0.05).

Figure 1. Effect of increasing concentrations of EMS on callus survival of *C. arabica*.

*Different literal in the same series indicates significant differences (Tukey, P < 0.05).

Con respecto al tratamiento control sin EMS, la masa fresca del callo disminuyó significativamente 81 y 56 % con 80 y 100 mM de EMS respectivamente. Concentraciones posteriores presentaron un incremento estadísticamente similar al control hasta 140 mM, dosis posteriores inhibieron el crecimiento (160 mM, 78 %; 180 mM, 100 %) (Figura 2). Los resultados encontrados pueden deberse a un efecto hormético de EMS en el crecimiento celular, al respecto, se ha reportado que la cepa TA100 de *Salmonella typhimurium* (auxótrofa para el aminoácido histidina) presentan diversas respuestas a la exposición con mutágenos químicos, altas concentraciones son letales, mientras que concentraciones por debajo de la DL₅₀ aumentan el número de colonias que mediante un mecanismo de adaptación/replicación pueden crecer en medios carentes de histidina por la inducción de mutaciones (Calabrese *et al.*, 2011).

La mayor formación de callo embriogénico posterior al tratamiento con EMS se observó en el control y las concentraciones de 140 y 160 mM (dosis cercanas a la DL₅₀), dosis superiores inhibieron la formación embriogénica. En cuanto a las características morfológicas fueron similares en los tres casos (Figura 3 a-c). Con respecto al número de embriones somáticos recuperados (n = 4) fue significativamente menor con el incremento de la dosis (47, 21 y 8 embriones cotiledonares respectivamente). Resultado que puede atribuirse al efecto genotóxico generado por EMS sobre la plasticidad y totipotencia de las células embriogénicas (Behera *et al.*, 2012). De acuerdo con Castro *et al.* (2006) una célula es viable si tiene la capacidad de crecer y desarrollarse, por lo que, los callos tratados con EMS que no presentaron incremento de

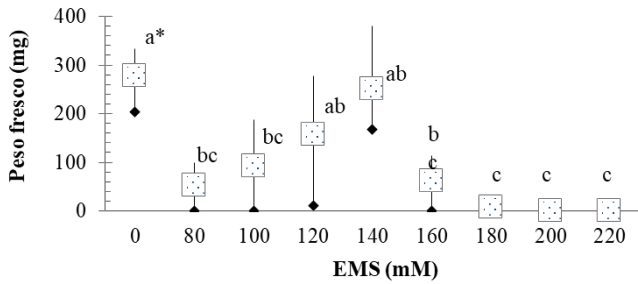


Figura 2. Masa fresca en callos de *C. arabica* expuestos a diferentes concentraciones de EMS. *Diferente literal indica diferencias significativas (Tukey $P < 0.05$).

Figure 2. Fresh mass in callus of *C. arabica* exposed to different concentrations of EMS. *Different literal indicates significant differences (Tukey $P < 0.05$).

biomasa y formación de embriones fueron determinados como no viables, mismos que en posteriores subcultivos presentaron necrosis y deshidratación, sin respuesta a medios de multiplicación celular.

Las plantas desarrolladas de callos expuestos a EMS presentaron aspecto similar con las plantas control (Figura 3 d-f), con diferencias estadísticas en las dimensiones estructurales (Tabla 1). El EMS generó enanismo y por consiguiente acortamiento de entrenudos como se observa en la Figura 4 (d). La altura del tallo se redujo entre 46 y 51 %, la disminución del tamaño de las hojas estuvo acompañado de cambios en la forma, en plantas control la forma fue elíptica y las variantes EMS presentaron formas ovada, irregular y lanceolada. La supervivencia de plántulas disminuyó a la par con el incremento de las dosis de EMS, los embriones que no lograron desarrollarse se caracterizaron por una morfología de tallo y hoja cotiledonar deforme, que con el tiempo presentaron oxidación de forma ascendente hasta generar necrosis general, comportamiento similar observado en callos y células en suspensión de *C. arabica* (Bolívar *et al.*, 2018). En cuanto al número de hojas, solo se observó diferencias significativas entre el control y la concentración más alta evaluada, rela-

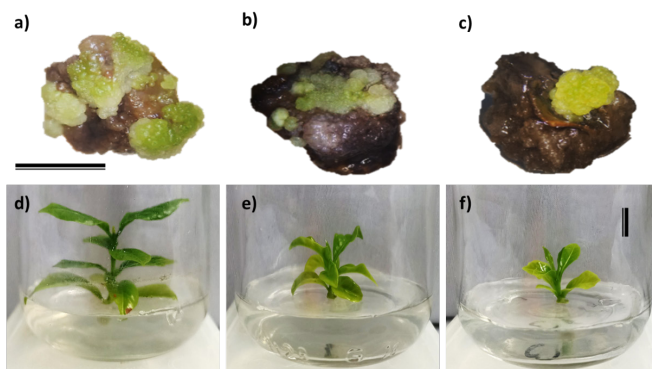


Figura 3. Formación de callos embriogénicos y desarrollo de plantas de *C. arabica* cv., Borbon posterior al tratamiento con EMS (a y d = Control; b y e = 140 mM; c y f = 160 mM). barra negra = 10 mm.

Figure 3. Embryogenic callus formation and plant development of *C. arabica* cv., Borbon following EMS treatment (a and d = Control; b and e = 140 mM; c and f = 160 mM). Black bar = 10 mm.

cionado con la disminución en la velocidad de crecimiento. Estos cambios morfométricos son efectos característicos de la exposición de EMS en células vegetales, como se ha reportado en varios modelos de estudio, entre ellos *Agave americana* (Reyes *et al.*, 2019), mango cv., Arka Puneet (Rime *et al.*, 2019) y mandarina (Mallick *et al.*, 2016).

Tabla 1. Parámetros morfométricos modificados por EMS en plantas de *Coffea arabica*.

Table 1. Morphometric parameters modified by EMS in *Coffea arabica* plants.

EMS (mM) ¹	Altura	LH ³	AH ⁴	Número de hojas	Supervivencia de plantas
	mm				
0	45.6 ± 4.6 ^{a*}	2.7 ± 0.24 ^a	1.5 ± 0.1 ^a	9.6 ± 0.4 ^a	72 ± 12 ^a
140	23.2 ± 5.2 ^b	1.7 ± 0.54 ^b	1.0 ± 0.5 ^b	8.8 ± 1.2 ^{ab}	52 ± 8 ^b
160	21.0 ± 9.4 ^b	1.9 ± 0.60 ^b	0.86 ± 0.3 ^b	8.0 ± 0 ^b	26 ± 14 ^c
DMS ²	8.3	0.58	0.47	1.37	16.0

¹Concentración de EMS evaluada. ²Diferencia mínima significativa.

³Largo de la hoja. ⁴Ancho de la hoja. *Diferente literal entre columnas indica diferencias significativas entre tratamientos (Tukey $P < 0.05$).

Algunas variantes somaclonales EMS (160 mM) presentaron distintas formas de ápice (puntiagudo, obtuso y tridentado) y cambios en la coloración de la hoja, entre ellos, clorosis, albinismo y mosaicos (Figura 4 d-e). Anteriormente, ya se ha reportado que EMS ocasiona cambios en el contenido y distribución de la clorofila en las hojas, relacionados con la biosíntesis de esta macromolécula (Joya-Dávila y Gutiérrez, 2020; Pawar *et al.*, 2010); en condiciones *in vitro* este tipo de mutantes pueden desarrollarse al suplementar los medios de cultivo con fuentes de carbono, pero agrónomicamente no tienen utilidad.

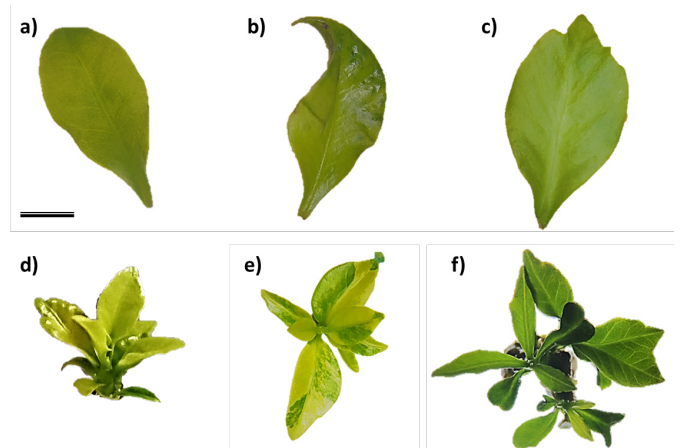


Figura 4. Cambios estructurales en plantas de *C. arabica* cv., Borbon tratadas con EMS. a-c) diferentes formas y ápice de la hoja. d) clorosis y entrenudos cortos. e) mosaicos cloróticos. f) presencia de tres meristemos y doble nervadura central. Barra negra = 5 mm.

Figure 4. Structural changes in *C. arabica* cv., Borbon plants treated with EMS. a-c) different shapes and apex of the leaf. d) chlorosis and short internodes. e) chlorotic mosaics. f) presence of three meristems and double midrib. Black bar = 5 mm.

Por último, en plantas obtenidas de callos tratados con 140 mM de EMS se observó la presencia de dos nervaduras primarias y tres meristemas caulinares por entrenudo (Figura 4 f). A la fecha todas las variedades de *Coffea* sp., están conformadas por dos meristemas caulinares, esta modificación estructural inducida por EMS pudiese incrementar el área foliar y número de frutos a cosechar. Estos cambios morfológicos pueden corresponder a que la exposición de los callos a EMS modificó los patrones de expresión de genes responsables de la conformación estructural de las plantas (Zhang *et al.*, 2016).

La producción basal de cafeína, ácido cafeico y ácido clorogénico aumentó 15, 6 y 11 % respectivamente en plantas tratadas con 140 mM de EMS; mientras que las plantas tratadas con 160 mM no generaron cambios significativos con respecto a las plantas control, exceptuando el contenido de ácido clorogénico que disminuyó (Tabla 2). En todos los tratamientos las señales analíticas para el ácido gálico no fueron cuantificables. Se ha reportado que el EMS incrementa el contenido de metabolitos secundarios (fructanos) y la actividad de fenilalanina amonio liasa (PAL) en plantas de agave (Reyes *et al.*, 2019). La producción basal de metabolitos secundarios está regulada por la acción enzimática en las rutas de biosíntesis, en el caso de los fenilpropanoides la actividad catalítica de PAL es clave en el inicio de la producción de fenoles (ácido cafeico o clorogénico). La utilidad de estos metabolitos está relacionada con mecanismos de defensa bioquímica relacionados con la biosíntesis de lignina (Campa *et al.*, 2005), que en procesos de infección limitan el crecimiento microbiano o los confina, impidiendo la difusión de toxinas y extracción de nutrientes de la célula (de Melo *et al.*, 2020).

Tabla 2. Efecto de EMS en la concentración de metabolitos secundarios en hojas de *Coffea arabica* cv., Borbón.

Table 2. Effect of EMS on the concentration of secondary metabolites in leaves of *Coffea arabica* cv., Borbon.

EMS (mM) ¹	Cafeína	Ácido cafeico	Ácido clorogénico	Ácido gálico
	µg/g HS ³			
0	8464 ± 210 ^{b*}	1288.3 ± 26 ^{ab}	11681.9 ± 294 ^b	ND
140	9577 ± 312 ^a	1360.1 ± 46 ^a	12960.5 ± 299 ^a	ND
160	8191 ± 240 ^b	1220.1 ± 11 ^b	10397.2 ± 111 ^c	ND
DMS ²	743.7	72.4	852.7	-

¹Concentración de EMS evaluada. ²Diferencia mínima significativa. ³Hoja seca. ND = No detectado * Diferente literal entre columnas indica diferencias significativas entre tratamientos (Tukey P < 0.05).

Por otro lado, incrementar el contenido de cafeína en cafetos tiene importancia para la salud. Se ha reportado que el consumo de café disminuye el riesgo de la enfermedad de Parkinson, ya que sus efectos están mediados por la cafeína a través de la acción antagonista del receptor de adenosina (Ishibashi *et al.*, 2022). En agricultura el contenido de cafeína está relacionado con mecanismos de defensa bioquímica a fitopatógenos; en café al momento de la esporulación de

Hemileia vastatrix las plantas susceptibles incrementan la síntesis de cafeína (Luján-Hidalgo *et al.*, 2020), posiblemente por su acción antimicrobiana al inhibir estructuras de crecimiento (Cuadrado *et al.*, 2009).

CONCLUSIÓN

La determinación de la dosis adecuada de EMS permite inducir cambios de importancia en plantas de *C. arabica*. Dosis superiores a la DL₅₀ generan cambios no deseables y disminuyen la supervivencia celular, dosis inferiores en particular 140 mM, ocasionó cambios estructurales importantes en la morfología caulinar del tallo con utilidad en las labores de recolección y poda, además, incrementó el contenido de metabolitos secundarios de alto valor agronómico en lo referente a la resistencia del café al ataque de fitopatógenos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo otorgado a través de la beca para JDJG (CVU. 789022) y a el Tecnológico Nacional de México (TecNM) por el apoyo financiero al proyecto 14102.22-P. Al laboratorio de analítica y biología molecular del TecNM - Tuxtla Gutiérrez, por el apoyo en el desarrollo de los experimentos bioquímicos.

REFERENCIAS

- Behera, M., Panigrahi, J., Mishra, R., and Rath, S. 2012. Analysis of EMS induced *in vitro* mutants of *Asteracantha longifolia* L. Nees using RAPD markers. *Indian Journal of Biotechnology*. pp 39-47.
- Bolívar, A., Valdez, M., and Gatica, A. 2018. Responses of Arabica coffee (*Coffea arabica* L. var. Catuai) cell suspensions to chemically induced mutagenesis and salinity stress under *in vitro* culture conditions. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. 54(6): 576-589. <https://doi.org/10.1007/s11627-018-9918-x>.
- Calabrese, E., Stanek, E., and Nascarella, M. 2011. Evidence for hormesis in mutagenicity dose-response relationships. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*. 726(2): 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.04.006>.
- Campa, C., Venkataramaiah, M., Kochko, A., G al, L., Bourgeois, M., Moreau, C., Harmon, S. and Noirot, M. 2005. Candidate gene strategy for the study of the chlorogenic acid biosynthesis. In: ASIC 2004. 20th International Conference on Coffee Science, Bangalore, India, 11-15 October 2004. Association Scientifique Internationale du Café (ASIC). pp 644-650.
- Castro, L., Escobedo, R., and Miranda-Ham, M. 2006. Measurement of cell viability *in vitro* cultures. *Plant Cell Culture Protocols*. 318: 71-76. <https://doi.org/10.1385/1-59259-959-1:071>.
- Chen, H., Xiong, F., Xu, R., Chen, X., Zhong, H., Zhang, Y., Lan, X., Zhang, H., Chen, Y., Hu, R., Lin, G. and Tang, Z. 2022. Construction of EMS-induced peanut mutant libraries and identification of pod-related traits mutant lines. *Phyton-International Journal of Experimental Botany*. 92(2): 537-557. <https://doi.org/10.32604/phyton.2022.023912>.

- Cuadrado, I. M., Llamazares, R. M., Martínez, A. P. y García, R. P. 2009. Actividad alelopática de la cafeína en plántulas de trigo y lenteja. *Ambiociencias*. 4: 29-36.
- Cui, L., Hanika, K., Visser, R. G., and Bai, Y. 2020. Improving pathogen resistance by exploiting plant susceptibility genes in coffee (*Coffea* spp.). *Agronomy*. 10(12): 1928. <https://doi.org/10.3390/agronomy10121928>.
- de Melo, C. M. L., da Cruz Filho, I. J., de Sousa, G. F., de Souza, G. A., do Nascimento, D. K. D., da Silva, R. S., Rodrigues, B., de Lima, R. G., Alves, M. C. and de Moraes, G. J. 2020. Lignin isolated from *Caesalpinia pulcherrima* leaves has antioxidant, antifungal and immunostimulatory activities. *International Journal of Biological Macromolecules*. 162: 1725-1733. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.003>.
- González, A. 2022. Caracterización morfoagronómica de variedades élite de *Coffea arabica* L. seleccionados participativamente con respuesta fenotípica al estrés abiótico. Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas, México.
- IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). Descriptors for coffee (*Coffea* spp. and *Psilanthus* spp.). Roma, Italia. 36 p. [Consultado 23 enero 2023] 1996. Disponible en https://www.bioversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/365.pdf.
- Ishibashi, K., Miura, Y., Wagatsuma, K., Toyohara, J., Ishiwata, K. and Ishii, K. 2022. Adenosine A2A Receptor Occupancy by Caffeine After Coffee Intake in Parkinson's Disease. *Movement Disorders*. 37 (4): 853-857. <https://doi.org/10.1002/mds.28897>.
- Joya-Dávila, J.G. and Gutiérrez, F.A. 2020. Ethyl methanesulfonate as inductor of somaclonal variants in different crops. *Phyton*. 89(4): 835-850. <https://doi.org/10.32604/phyton.2020.013679>.
- Joya-Dávila, J. G., Ruiz-Sesma, B., Lecona-Guzmán, C. A., Ruiz-Lau, N., Ruiz-Valdiviezo, V. M., Rojas-Martínez, R. I. and Gutiérrez Miceli, F. A. 2023. Field phytoprotection of *Coffea arabica* mother plants, disinfection and callogenesis induction. *Agrociencia*. <https://doi.org/10.47163/agrociencia.v57i2.2707>.
- Loyola-Vargas, V.M., Avilez-Montalvo, J.R., Avilés-Montalvo, R.N., Márquez-López, R.E., Ga-laz-Ávalos, R.M. and Mellado-Mojica, E. 2016. Somatic Embryogenesis in *Coffea* spp. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) *Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications*. Springer, Cham. pp 241-266. https://doi.org/10.1007/978-3-319-33705-0_15.
- Luján-Hidalgo, M. C., Jiménez, L. A., Ruiz, N., Reyes, S. J. y Gutiérrez, F. A. 2020. Cambios bioquímicos en respuesta al ataque de roya en plantaciones de café. *Polibotánica*. 49(1): 149-160. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.49.10>.
- Mallick, M., Awasthi, O. P., Paul, V., Verma, M. K., and Jha, G. 2016. Effect of physical and chemical mutagens on leaf sclerophylly and stomatal characteristics of *Kinnow mandarin* mutants. *Indian Journal of Horticulture*. 73(2): 291-293. <http://dx.doi.org/10.5958/0974-0112.2016.00063.3>.
- Mba, C., Afza, R., Bado, S., and Jain, S.M. 2010. Induced mutagenesis in plants using physical and chemical agents. *Plant cell culture: essential methods*. 20: 111-130.
- Mishra, M.K. 2019. Genetic Resources and Breeding of Coffee (*Coffea* spp.). In: Al-Khayri, J., Jain, S., Johnson, D. (eds) *Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops*. Springer, Cham. pp. 475-515. https://doi.org/10.1007/978-3-030-23112-5_12.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-493. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- Pawar, N., Pai, S., Nimbalkar, M., Kolar, F. and Dixit, G. 2010. Induction of chlorophyll mutants in *Zingiber officinale* Roscoe by gamma rays and EMS, *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 22(1): 406-411. <https://doi.org/10.9755/ejfa.v22i5.4828>.
- Purent, N., Chen, B., Liu, X., Zhou, Y. and He, M. 2020. Effect of ethyl methanesulfonate on induced morphological variation in M3 generation of *Chrysanthemum indicum* var. Aromaticum. *HortScience*. 55(7): 1099-1104. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI15068-20>.
- Reyes, S. J., Ramírez, M. L., Arias, C., Rodríguez, M. A., Lecona, C. A., Ruiz, V. M., González, D. and Gutiérrez, F. A. 2019. Morphometric and biochemical changes in *Agave americana* L. plantlets induced by ethyl methanesulfonate. *Phyton*. 88 (3): 277. <https://doi.org/10.32604/phyton.2019.06504>.
- Rime, J., Dinesh, M. R., Sankaran, M., Shivashankara, K. S., Rekha, A., and Ravishankar, K. V. 2019. Evaluation and characterization of EMS derived mutant populations in mango. *Scientia Horticulturae*. 254(1): 55-60. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.04.015>.
- Sanglard, N. A., Amaral, P. M., Sattler, M. C., de Oliveira, S. C., Cesário, L. M., Ferreira, A., Carvalho, R. C. and Clarindo, W. R. 2019. Indirect somatic embryogenesis in *Coffea* with different ploidy levels: a revisiting and updating study. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36(2): 255-267. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1511-9>.
- Serrat, X., Esteban, R., Guibourt, N., Moysset, L., Nogués, S. and Lalanne, E. 2014. EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli as a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. *Plant Methods*. 10(5): 1-14. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-5>.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Cierre de la producción agrícola 1980 a 2022. Gobierno de México. [Consultado 27 diciembre 2022] 2022. Disponible en En: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>.
- Suprasanna, P., Mirajkar, S. J., and Bhagwat, S. G. 2015. Induced Mutations and Crop Improvement. In: Bahadur, B., Venkat Rajam, M., Sahijram, L., Krishnamurthy, K. (eds) *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, Nueva Delhi. pp 593-617. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_23.
- World Coffee Research. Las variedades de café arabica. 10940 SW Barnes Rd #334 Portland, OR 97225. 75 pp. [Consultado 23 enero 2023] 2019. Disponible en: <https://varieties.worldcoffeeresearch.org/>.
- Zhang, N., Wang, S., Zhang, X., Dong, Z., Chen, F. and Cui, D. 2016. Transcriptome analysis of the Chinese bread wheat cultivar Yunong 201 and its ethyl methanesulfonate mutant line. *Gene*. 575(2): 285-293. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.002>.