Revista Agrosilvicultura y Medioambiente
Volumen 4, Número 2, 2026
Universidad Estatal del Sur de Manabí
ISSN-e: 2960-8139

ARTÍCULO ORIGINAL

La edad del callo determina la producción de embriones somáticos de *Coffea arabica* en biorreactor de inmersión temporal RITA®

Callus age affects the production of *Coffea arabica* somatic embryos in RITA® temporary immersion bioreactor

https://doi.org/10.47230/agrosilvicultura.medioambiente.v4.n2.2026.59-71

Recibido: 23-06-2026 **Aceptado:** 11-10-2026 **Publicado:** 01-11-2026

Sonia Ruiz González[1*]
https://orcid.org/0009-0006-4471-6184

Guadalupe del Carmen Vázquez Hernández[2]
https://orcid.org/0009-0006-6181-064X

Lourdes Adriano Anaya[3]
https://orcid.org/0000-0002-4356-5429

Miguel Salvador-Figueroa[4]
https://orcid.org/0000-0001-6811-3317

Isidro Ovando Medina[5]
https://orcid.org/0000-0002-2548-7527

1. Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas; Chiapas, México.
2. Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas; Chiapas, México.
3. Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas; Chiapas, México.
4. Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas; Chiapas, México.
5. Instituto de Biociencias, Universidad Autónoma de Chiapas; Chiapas, México.

Volumen: 4
Número: 2
Año: 2026
Paginación: 59-71
URL: https://revistas.unesum.edu.ec/agricultura/index.php/ojs/article/view/78
***Correspondencia autor:** isidro.ovando@unach.mx

RESUMEN

El café es uno de los productos agrícolas de mayor comercialización a nivel internacional, especialmente el de las variedades arábicas. Entre los mayores retos que enfrenta la caficultura mundial se encuentra la necesidad de renovación de las plantaciones con material vegetal de alta calidad genética y fitosanitaria, lo cual puede lograrse con mayor facilidad con el uso de la biotecnología vegetal, específicamente la micropropagación por embriogénesis somática. Dicha técnica se ha ensayado y logrado desde hace algunas décadas, sin embargo su eficiencia y calidad depende de la variedad y de las condiciones de cultivo, por lo que se ha seguido investigando y desarrollando protocolos eficaces. En el presente trabajo se estudió el efecto de la edad del callo celular y los parámetros de operación en la producción de embriones somáticos de *Coffea arabica* var. Catuaí en biorreactores de inmersión temporal RITA®. Se diseñó un experimento completamente al azar con arreglo factorial para evaluar la edad del callo (joven vs. envejecido), la frecuencia de inmersión (una vs. dos veces al día) y el tiempo de inmersión en el medio líquido (2 min vs. 4 min), para totalizar ocho tratamientos con tres repeticiones. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre edades del callo (F = 11.267, P = 0.001; callo envejecido = 980.188 embriones / RITA®, callo joven = 116.295 embriones / RITA®) en la producción de estructuras embriogénicas (proembriones y embriones en distintas fases de formación). En el análisis general no hubieron diferencias entre los factores frecuencia y tiempo de inmersión, pero por tratamientos resultó que el tratamiento con callo envejecido cultivado con frecuencia de inmersión de dos veces al día por cuatro minutos fue estadísticamente superior al resto de los tratamientos (F = 11.398, P = 0.000, valor = 1504.461 embriones/RITA®). Cuando se analizaron solo los tratamientos de callo envejecido se encontraron diferencias entre los factores frecuencia y tiempo de inmersión (F = 3.759, P = 0.019), con los valores mayores con inmersiones de dos veces al día y con cuatro minutos por inmersión. La explicación de los resultados se basa en el agotamiento del medio de cultivo y en la adaptación de los tejidos cultivados al estrés oxidativo, considerando que los callos jóvenes y envejecidos difirieron en su contenido de fenoles totales (F = 9.392, P = 0.037; callo envejecido = 32.770 µg EAG/g peso seco, callo joven = 164.722 µg EAG/g peso seco). Este protocolo es altamente eficaz para la variedad estudiada.

Palabras clave: Micropropagación, Embrión somático, Inmersión temporal.

ABSTRACT

Coffee is one of the most internationally commercialized products, especially the arabica varieties. Among the challenges of the global coffee industry is the need to renew plantations with plant material of high genetic and phytosanitary quality, which can be achieved more easily with the use of plant biotechnology, specifically micropropagation by somatic embryogenesis. Such a technology has been tested and successfully implemented for several decades, however, its efficiency and quality depends on the variety and culture conditions, so research and development of effective protocols have continued. This study investigated the effect of callus age and operating parameters on the production of somatic embryos of Coffea arabica var. Catuaí in RITA® temporary immersion bioreactors. A completely randomized experiment with a factorial arrangement was designed to evaluate callus age (young vs. aged), immersion frequency (once vs. twice a day), and immersion time in the liquid medium (2 min vs. 4 min), totaling eight treatments with three replicates. Significant statistical differences were found among callus age (F = 11.267, P = 0.001; aged callus = 980.188 embryos / RITA®, young callus = 116.295 embryos / RITA®) in the production of embryogenic structures (pro-embryos and embryos at different stages of formation). In the general analysis, there were no differences between the immersion frequency and time factors, but by treatments it turned out that the treatment with aged callus cultured with an immersion frequency of twice a day during four minutes was statistically superior to the rest of the treatments (F = 11.398, P = 0.000, value = 1504,461 embryos/RITA®). When only the aged callus treatments were analyzed, differences were found between the immersion frequency and time factors (F = 3.759, P = 0.019), with the highest values with immersions of twice a day and during four minutes per immersion. The explanation of the results is based on the exhaustion of the culture medium and the adaptation of the cultured tissues to oxidative stress, considering that young and aged calluses differed in their total phenol content (F = 9.392, P = 0.037; aged callus = 32,770 µg EAG/g dry weight, young callus = 164,722 µg EAG/g dry weight). This developed protocol is highly effective for the studied coffee variety.

Keywords: Micropropagation, Somatic embryo, Temporary immersion.



Creative Commons Attribution 4.0 International (CC BY 4.0)

Introducción

El café (***Coffea spp.***) es uno de los productos agrícolas de mayor comercialización a nivel internacional y es la bebida más consumida en el mundo con más de dos mil millones de tazas al día (Pancsira, 2022). La cadena productiva del café inicia en las áreas rurales tropicales y culmina en los mercados globales, por lo que tiene un impacto significativo en la vida y la economía de millones de personas (Jezeer et al., 2019). El género Coffea está compuesto por más de 124 especies de árboles leñosos perennes que difieren en tamaño, morfología y condiciones de adaptación (Guyot et al., 2020), aunque solo dos especies, ***C. arabica y C. canephora***, predominan en el comercio mundial, con 70 % y 30 % de la producción, respectivamente (McCook, 2024).

Las variedades de arábica son las más apreciadas en calidad por los consumidores, mientras que ***C. canephora*** o Robusta es de importancia industrial para obtener café instantáneo (Oviedo-Rodríguez et al., 2025). En cualquiera de los dos casos, la caficultura enfrenta problemas como la disminución de la producción debida al envejecimiento de las plantaciones, condiciones climáticas cambiantes, pérdida de la fertilidad del suelo y la diseminación de plagas y enfermedades (McCook, 2024).

El cafeto tiene un tiempo de vida aproximado de 25 años, alcanza su máxima producción alrededor del séptimo año, siendo necesario renovar las plantaciones entre los 15 y 20 años de edad, sin embargo, una gran proporción de las fincas cafetaleras están envejecidas y tienen bajos rendimientos (Díaz-Gutiérrez, 2019). Aunque existen métodos de poda y manejo agronómico para alargar la producción del cafetal (Rendón, 2020), uno de los mayores retos de la cafeticultura mundial es la renovación de las plantaciones con material vegetal de alta calidad genética y fitosanitaria, para lo cual se requiere propagar masivamente genotipos seleccionados por métodos que sean técnicamente viables y económicamente factibles.

El café arábica se puede propagar por semillas, ya que son autopolinizables (autogamia) y tienen baja variación genética en la descendencia (Montagnon et al., 2025). Sin embargo, la propagación sexual tiene la desventaja de que se diseminan plagas y enfermedades a las nuevas plantaciones (De Souza et al., 2025), además es lenta la propagación de variedades mejoradas. Por otra parte, la propagación asexual o por esquejes e injertos, aunque asegura la homogeneidad genética tiene la misma desventaja de no asegurar la fitosanidad de las plántulas (Melese y Kolech, 2021). Ambos sistemas de propagación convencionales no han sido capaces de satisfacer la creciente demanda de plantas necesarias para la renovación de las plantaciones. Ante estos desafíos, las técnicas biotecnológicas se han convertido en una alternativa prometedora, específicamente la micropropagación por embriogénesis somática (Aga y Khillare, 2017; Ávila-Víctor et al., 2023), la cual permite la producción de plantas de genotipos seleccionados a gran escala, en cualquier época del año y en poco espacio, garantizando alta calidad fitosanitaria. En ese sentido, Menéndez et al. (2010) encontraron que el desempeño inicial de plantas de ***C. arabica*** obtenidas por embriogénesis somática fue superior al de plantas derivadas de semillas. Dicha técnica se ha ensayado y logrado desde hace algunas décadas, sin embargo, su eficiencia y calidad depende de la variedad y de las condiciones de cultivo, por lo que se ha seguido investigando y desarrollando protocolos eficaces. Los sistemas de inmersión temporal han demostrado ser más eficaces que los métodos convencionales de cultivo ***in vitro***, ya que permiten un contacto intermitente entre los explantes y el medio de cultivo, permitiendo trabajar con una mayor densidad de material, reduciendo así el tiempo de transferencia y los costos operativos (Etienne y Berthouly, 2002). Además,

facilitan el drenaje del exceso de solución y mantienen los explantes húmedos, mejorando la oxigenación del medio y promoviendo un ambiente gaseoso controlado en cada inmersión (Afreen, 2008). Entre los sistemas más utilizados se encuentran los biorreactores de inmersión temporal (BIT®) y el Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®), los cuales, al estar automatizados, reducen aún más los costos de mano de obra y permiten la propagación masiva (Berthouly y Etienne, 2005; Jiménez, 2005; Afreen, 2008). Hay muchos otros factores que influyen en la producción de embriones somáticos, aunque el tejido a cultivar es un factor clave (Williams y Maheswaran, 1986), toda vez que es el donador de células que eventualmente se convertirán en embriones mediante la expresión de la totipotencia celular (Sivanesan et al., 2022).

En el presente trabajo se estudió el efecto de la edad del callo celular y los parámetros de operación en la producción de embriones somáticos de ***Coffea arabica*** var. Catuaí en biorreactores de inmersión temporal RITA®.

Materiales y métodos

Material biológico

Se utilizaron plantas de ***C. arabica*** var. Catuaí de ocho años de edad, de 1.70 m de altura, aparentemente sanas, libres de plagas y enfermedades, cultivadas bajo condiciones de jardín en un andosol, sin fertilización mineral y con riego solo en las épocas de estiaje, ubicadas en el municipio de Tapachula, Chiapas, México (14.86869, -92.31139; 80 msnm). Se cortaron hojas de la parte media de la planta, de color verde brillante, textura lisa y aspecto ceroso, con una longitud promedio 8.0 cm y ancho de 3.0 cm (Figura 2A).

Desinfección y extracción de explantes

Las hojas enteras se lavaron con detergente comercial y agua corriente, posteriormente, en condiciones de campana de flujo laminar, se sumergieron por 10 min en una solución antioxidante-antifúngica estéril (30 g L^{-1} de sacarosa, 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico, 150 mg L-1 de ácido cítrico y 0.30 g L^{-1} de nistatina), siguiendo la metodología de López-Gómez et al. (2010), con modificaciones; posteriormente, se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio (Cloralex®) al 6 % por 15 min con agitación constante, seguido de tres enjuagues en agua destilada estéril. Los explantes consistieron en secciones cuadradas de 1 cm por lado extraídas de la parte central de la hoja incluyendo la vena central (Figura 2B).

Inducción a la callogénesis

Se sembraron los explantes con el envés hacia arriba en cajas de Petri de 90 mm conteniendo medio de cultivo semisólido de Murashige y Skoog (1962) suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 5.2 g L^{-1} de Phytagel® y las fitohormonas ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D; 0.5 mg L^{-1}) y 6-bencilaminopurina (BAP; 1.12 mg L^{-1}). Siguiendo el protocolo de López-Gómez et al. (2010), los cultivos se incubaron en oscuridad a 28 °C durante cuatro semanas. Los callos celulares obtenidos se dividieron en dos grupos: A) callos “jóvenes”, los cuales fueron sub-cultivados, durante seis meses, cada cuatro semanas con refrescamiento de medio; B) callos “envejecidos”, los cuales no se cambiaron de medio de cultivo durante seis meses.

Caracterización de los callos celulares

A los dos tipos de callo celular se les hicieron observaciones macro y microscópicas para describir su morfología, textura, coloración, humedad y contenido de fenoles totales. Esta última medición se hizo mediante el método de Folin-Ciocalteu, siguiendo el protocolo descrito por Pourmorad et al. (2006), con modificaciones en los volúmenes utilizados de metanol en la muestra. En resumen: se pesó 1 g de callo, se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se desmenuzó y se añadió 2 mL de solución extractora metanol: agua (1:1) acidificada a pH 2.0 con HCl. Los matraces se agitaron

por 12 h; esta extracción se repitió una vez más. La mezcla se filtró y centrifugó, y el sobrenadante (100 µL) se hizo reaccionar con 100 µL de metanol, 1000 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu y 800 µL de Na_2CO_3 1 M. La mezcla se incubó durante 15 minutos en oscuridad y se midió su absorbancia a 765 nm. Una curva patrón de ácido gálico (0 a 50 µg mL^{-1}) se procesó de manera similar a las muestras. Los resultados se calcularon con base en la ecuación de la recta resultante, tomando en cuenta la humedad de las muestras y se expresó como equivalentes de ácido gálico (µg EAG/g peso seco).

Expresión de la embriogénesis

Tanto los callos jóvenes como los envejecidos se transfirieron en fragmentos de 0.5 g a cajas de Petri conteniendo medio de cultivo de Murashige-Skoog (1962) suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa, 5.2 g L^{-1} de Phytagel® y libre de reguladores del crecimiento vegetal. Los cultivos se incubaron en oscuridad a 28 °C durante cuatro semanas.

Sistema de inmersión temporal

Se utilizaron biorreactores RITA® (Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada; Vitropic®, Francia), los cuales están diseñados para la inmersión periódica de tejidos, en medio líquido, seguidos de drenaje y exponiendo los tejidos vegetales a un ambiente gaseoso estéril (Perozo y Vílchez, 2025). Los filtros consistieron en frascos de vidrio empacados con algodón quirúrgico, acoplados a dos tubos de cobre con un diámetro interno de 6.35 mm. El primer tubo, de 13 cm de longitud, fue dispuesto para conducir el aire hacia la parte inferior del recipiente, mientras que el segundo, de 5 cm, funcionó como salida de aire. Los filtros fueron sellados herméticamente utilizando tapones de goma No. 11 y No. 10, respectivamente. La conexión entre frascos se realizó mediante mangueras de PVC flexibles transparentes, con un diámetro interno de 4.7 mm, unidas a través de conectores de cobre. La inmersión de los explantes se logró mediante la presión positiva generada por una bomba de aire (Sunny®), la cual forzó el ascenso del medio hacia la parte superior del biorreactor, permitiendo el contacto temporal con los callos. Finalizado el tiempo de inmersión, al disminuir la presión, el medio descendió por gravedad; este proceso estuvo controlado por temporizadores digitales (Steren®) programados. El sistema se muestra en la Figura 1.

Figura 1.

Sistema de inmersión temporal RITA® con modificaciones en el ingreso/salida de aire



Determinación del efecto de la edad del callo y los parámetros del biorreactor

Se diseñó un experimento completamente al azar con arreglo factorial 2^3 para evaluar la edad del callo (joven vs. envejecido), la frecuencia de inmersión (una vs. dos veces al día) y el tiempo de inmersión en el medio líquido (2 min vs. 4 min), para totalizar ocho tratamientos con tres repeticiones. Cada biorreactor se alimentó con 250 mL de medio líquido Murashige y Skoog (1962), suplementado con 30 g L^{-1} de sacarosa y libre de fitohormonas; bajo condiciones de asepsia se inoculó con 1 g de callo celular a cada biorreactor (Figura 2 F). Los biorreactores se incubaron a 28 °C durante cuatro semanas bajo fotoperiodo de 12 h luz (3000 lux).

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas evaluadas fueron: contenido de fenoles total en callo, número de embriones (considerando estructuras embrionarias en distintas etapas: globular, corazón, torpedo y/o cotiledonar), contenido de humedad de la biomasa (g) y oxidación visual de la biomasa (en una escala porcentual de 0, 25, 50, 75 y 100 % del área de color café oscuro). Las variables procesaron mediante análisis de varianza (ANOVA), seguido de pruebas de medias de Tukey ($P<0.05$), utilizando el paquete estadístico XLSTAT© v. 2024.

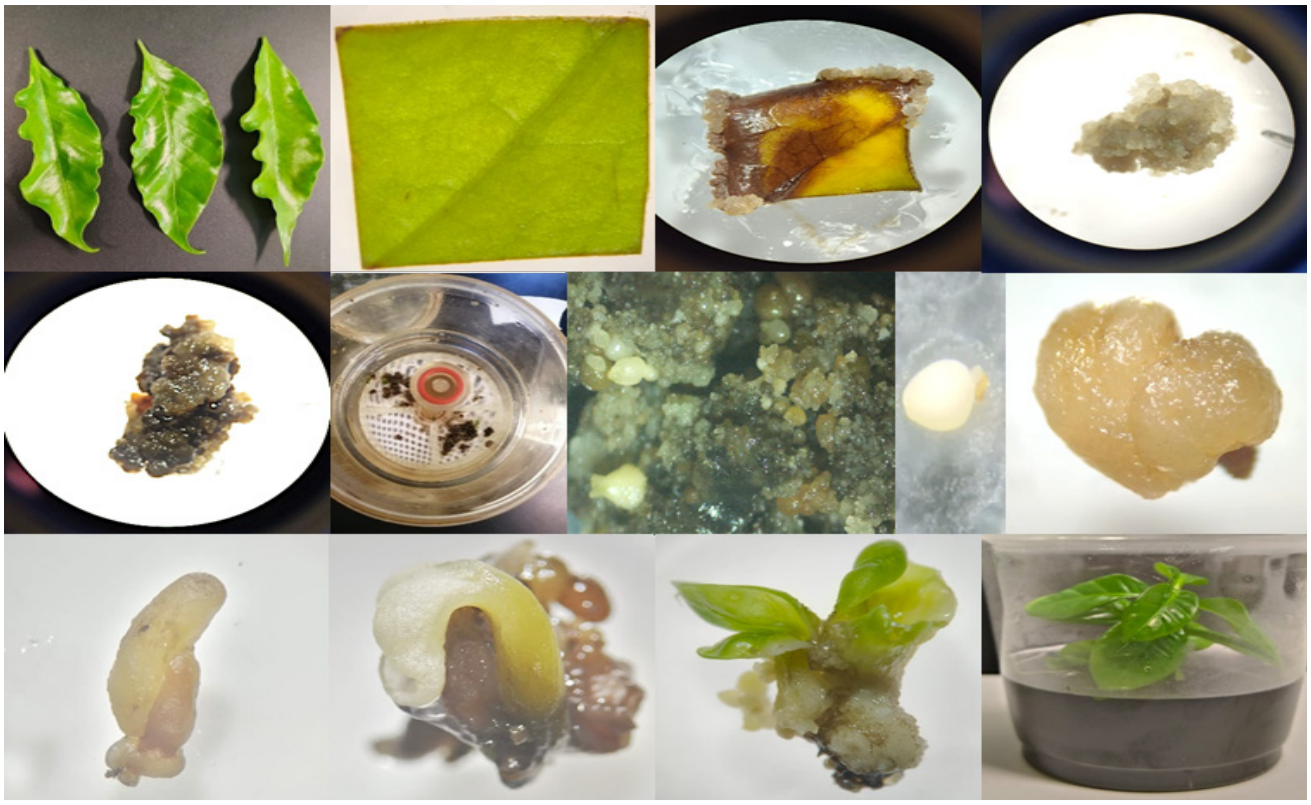
Resultados

Descripción del proceso de embriogénesis somática

La formación de callo celular se inició ocho días después de la siembra, exclusivamente a partir de las orillas y de heridas y cortes realizados durante la extracción del explante (Figura 2C). Al momento del primer subcultivo fue posible separar el tejido calloso de la hoja remanente, ya que se formó aproximadamente 100 mg de biomasa de callo. En lo sucesivo, el callo se duplicó en biomasa durante cada subcultivo (callo joven, Figura 2D). En el caso de los callos envejecidos (Figura 2E), sin recambio de medio de cultivo, la biomasa aumentó en aproximadamente 10 veces. Los callos jóvenes presentaron textura mixta, en partes friables suaves (aspecto azucarado que se disgregaba al tacto) y partes duras y organizadas, con una coloración clara a amarillenta, con células heterogéneas en forma (desde isodiamétricas hasta alargadas, con tamaños entre 30 y 200 µm). Los callos envejecidos presentaron morfología compacta y organizada, coloración café oscuro, pardo y partes completamente negras, con células mayormente isodiamétricas, con tamaños entre 50 y 100 µm y con indicios de organización. Al finalizar el cultivo en biorreactor, ambos tipos de callos dieron origen a múltiples estructuras embrionarias en distintas etapas (globular, corazón, torpedo y cotiledonar), encontrándose, incluso, embriones color verde pálido (Figura 2G-K). En ambos tipos de callo los embriones resultantes tuvieron crecimiento heterogéneo y asincrónico, aunque difirieron en las cantidades regeneradas. Cuando los embriones cotiledonares se cambiaron a medio semisólido sin hormonas y bajo iluminación germinaron hasta convertirse en plántulas, las cuales desarrollaron hojas verdaderas y raíces que les permitieron adaptarse a condiciones ex vitro (Figura 2L-M). La secuencia puede observarse en la Figura 2.

Figura 2.

Secuencia del proceso de embriogénesis somática en Coffea arabica var. Catuaí. Hojas jóvenes (A), explante de 1 cm² con el envés hacia arriba (B), formación de callo en las orillas del explante a las cuatro semanas (C), callo joven friable con tonos claros (D), callo envejecido con tonos pardos y oscuros en medio de expresión sin hormonas (E). Diferenciación de masas celulares en biorreactor de inmersión temporal (F). Diferenciación celular (G), en fase de embrión globular (H), corazón (I), torpedo (J). Fase de germinación a plántula (K) y (L). Plántula en medio de enraizamiento (M)

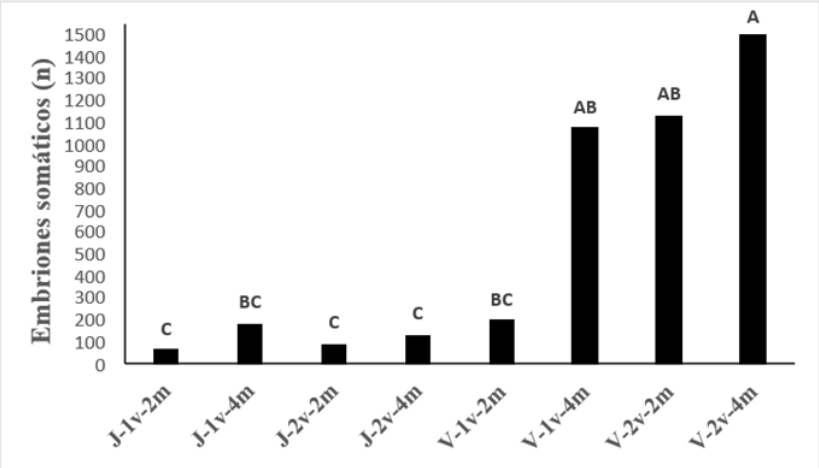


Efecto de los tratamientos sobre la producción de embriones somáticos, contenido de humedad y oxidación del callo

El análisis de varianza evidenció diferencias altamente significativas (F= 11.398, P = 0.000) entre los ocho tratamientos evaluados en la variable número de embriones somáticos por biorreactor RITA®, con el tratamiento consistente en callo envejecido cultivado con dos inmersiones al día durante cuatro minutos el que presentó la media más alta (1504.4 embriones, Tukey < 0.05, DMS = 953.4), aunque fue estadísticamente similar a los otros tratamientos de callo envejecido, excepto al que solo recibió una inmersión por dos minutos (Figura 3).

Figura 3.

Número de embriones somáticos de Coffea arabica var. Catuaí como efecto de los tratamientos en biorreactor de inmersión temporal RITA®, donde J: callo joven, V: callo envejecido, 1v: inmersión una vez al día, 2v: inmersión dos veces al día, 2m: dos minutos, 4m: 4 minutos. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Tukey < 0.05, DMS = 953.4)



Respecto al contenido de humedad del callo celular (rango = 84.6 % - 91.2 %), no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos (F = 1.579, P = 0.212, Cuadro 1). Por su parte, en la variable oxidación de los callos (rango = 25 % - 55 %) se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos (F = 3.736, P = 0.014), siendo el tratamiento consistente en callo envejecido cultivado con una inmersión al día por cuatro minutos el que presentó menor porcentaje de oxidación (25%) (Tukey < 0.05, DMS = 24.9), como puede verse en la Tabla 1.

Tabla 1.

Contenido de humedad y oxidación del callo de Coffea arabica var. Catuaí como efecto de los tratamientos en biorreactor de inmersión temporal RITA® durante la embriogénesis somática, donde J: callo joven, V: callo envejecido, 1v: inmersión una vez al día, 2v: inmersión dos veces al día, 2m: dos minutos, 4m: 4 minutos. Letras distintas por cada columna indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Tukey < 0.05, DMS = 24.9)

Tratamiento	Contenido de humedad del callo (%)	Oxidación del callo (%)
J-1v-2m	91.2 A	55.0 A
J-1v-4m	87.2 A	36.6 ABC
J-2v-2m	89.5 A	37.3 ABC
J-2v-4m	90.6 A	35.0 ABC
V-1v-2m	89.7 A	30.0 BC
V-1v-4m	84.6 A	25.0 C
V-2v-2m	85.6 A	37.5 ABC
V-2v-4m	89.5 A	50.0 AB

Efecto de los factores edad del callo y parámetros del biorreactor

Los factores evaluados en este estudio presentaron diferencias estadísticas altamente significativas en la variable número de embriones somáticos por biorreactor (ANOVA: F = 11.267, P = 0.001), pero no en la oxidación del callo (ANOVA: F = 0.681, P = 0.574) ni en el contenido de humedad del callo (ANOVA: F = 1.040, P = 0.396).

La edad del callo fue el factor determinante en la cantidad de embriones somáticos producidos por biorreactor RITA®, siendo el nivel consistente en callo envejecido el que presentó la media más alta (980.1 embriones, Tukey < 0.05, DMS = 373.6, Figura 4a).

Por su parte, los parámetros de operación de los biorreactores RITA® no fueron determinantes en la producción de embriones somáticos, ya que tanto la frecuencia de inmersión diaria (P= 0.123), como el tiempo de inmersión (P = 0.102) tuvieron niveles con resultados estadísticamente similares (Figuras 4b y 4c). Sin embargo, cuando se analizaron solo las unidades experimentales consistentes en callo envejecido, se encontró que existen diferencias significativas (F = 11.713, P = 0.019) entre los parámetros de cultivo, con una mayor cantidad de embriones cuando se sumergen los callos en medio de cultivo dos veces al día (1319.6 embriones) por cuatro minutos (1290.7 embriones), como puede verse en la Tabla 2.

Figura 4.

Número de embriones somáticos de Coffea arabica var. Catuaí como efecto de los factores edad del callo (a), frecuencia de inmersión por día (b) y tiempo de inmersión (c) en biorreactor de inmersión temporal RITA®. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadística entre niveles de cada factor

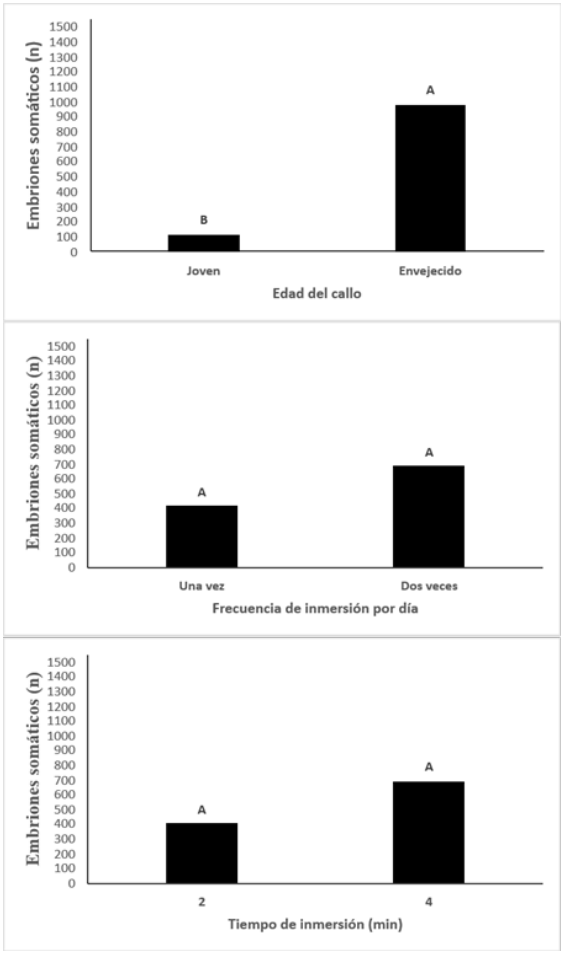


Tabla 2.

Efecto factorial (parámetros de operación del biorreactor de inmersión temporal RITA®) durante la embriogénesis somática de Coffea arabica var. Catuaí a partir de callo celular envejecido. Letras distintas por cada columna, dentro de cada factor, indican diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos (Tukey < 0.05, DMS = 605.5)

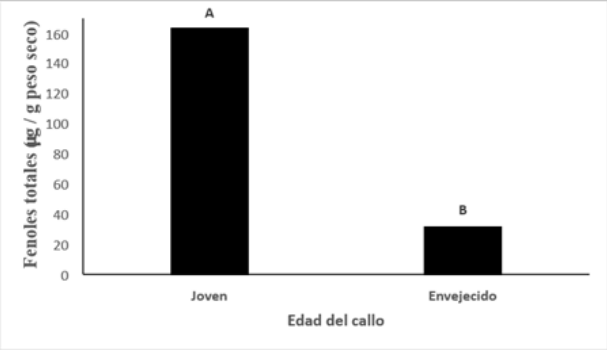
Factor	Nivel	Embriones somáticos (n)
Frecuencia de inmersión	Una vez al día	640.7 B
	Dos veces al día	1319.6 A
Tiempo de inmersión	2 min	669.6 B
	4 min	1290.7 A

Fenoles totales en callos celulares

El estudio de los callos celulares al inicio del cultivo en biorreactor mostró que los callos jóvenes derivados de hojas de café producen significativamente más fenoles totales que los callos que han pasado por un proceso de envejecimiento (F = 9.392, P = 0.037), como puede verse en la Figura 5.

Figura 5.

Contenido de fenoles totales como equivalentes de ácido gálico en callos celulares de Coffea arabica var. Catuaí. Letras distintas sobre las barras indican diferencia estadística entre niveles de cada factor (Tukey < 0.05, DMS =119.5)



Discusión

El hallazgo principal de este estudio fue que la edad del callo determina la producción de embriones somáticos en biorreactores de inmmersión temporal, ya que, tanto en el análisis por tratamientos, como por factores, se puede ver que los callos "envejecidos" por seis meses bajo condiciones de oscuridad y sin refrescamiento del medio dan origen de ocho a 22 veces más estructuras embrionarias en comparación con los callos "jóvenes" subcultivados cada cuatro semanas. Lo anterior puede tener múltiples causas, las cuales incluyen cambios en la fisiología celular debidos al agotamiento de los nutrientes, las fitohormonas y otros componentes del medio de cultivo. En ese sentido, se ha encontrado que los medios nutritivos, como el Murashige-Skoog "agotados" por el cultivo de tejidos vegetales y que normalmente se desechan como subproductos contienen distintos promotores del crecimiento vegetal y pueden utilizarse como bioestimulantes (Cannata et al., 2024), por

lo que el medio de cultivo "agotado" por los callos envejecidos pudo jugar el papel de bioestimulante de la embriogénesis previo a su cultivo en los biorreactores.

La embriogénesis somática indirecta implica varias etapas, pero sobresalen por su importancia en la morfogénesis dos de ellas, la inducción de la callogénesis con auxinas sintéticas como el 2,4-D y la expresión de la embriogénesis retirando las auxinas mediante un subcultivo en medio fresco sin hormonas o con un ligero estímulo de citoquinina. En ese contexto, es posible que los callos envejecidos, al estar mucho tiempo en las mismas cajas de Petri sin recambio a medio fresco, hayan metabolizado la totalidad de la auxina (0.5 mg L^{-1} de 2,4-D) y reaccionado como si hubiesen entrado a la etapa de expresión de la embriogénesis. Lo anterior se basa en la existencia de estudios como el de Santos-Costa et al. (2020), quienes analizaron las cantidades de 2,4-D residual en medios de cultivo Murashige-Skoog semisólido que inicialmente contenían 0.5 g L^{-1} cultivados con callos de albahaca, encontrando que después de tres meses el 2,4-D fue indetectable.

Por otra parte, hay evidencia de que los callos celulares de ***Coffea spp.*** requieren de la presencia de especies reactivas de oxígeno (EROs) para activar el mecanismo embriogénico, por lo que los callos viejos, con menor contenido de fenoles, produjeron masas embriogénicas abundantemente en comparación con los callos jóvenes que estuvieron más protegidos de los efectos del estrés oxidativo por contener mayor cantidad de fenoles totales. Es posible que después de varios meses de cultivo ininterrumpido los tejidos callosos se hayan ido adaptando al estrés oxidativo y que disminuyeron gradualmente la producción de fenoles, lo que probablemente haya disparado el programa embriogénico como estrategia reproductiva y de adaptación para la sobrevivencia.

Es importante mencionar que Folin-Ciocaltiaeu es un método que detecta fenoles libres, es decir, aquellos que no han reaccionado con sus oxidantes, por lo anterior, es posible que los callos más oscuros, como los envejecidos, contuvieron pocos fenoles libres porque la mayor cantidad de fenoles ya habían reaccionado con EROs durante el proceso de envejecimiento.

También se ha reportado que la embriogénesis somática en especies leñosas como el café puede requerir períodos prolongados (hasta 12 meses o más) para alcanzar un estado óptimo de competencia embriogénica (Van y Berthouly, 1996; De-la-Peña et al., 2015). Durante este tiempo, es posible que se produjera de manera natural una selección in vitro (Widoretno et al., 2012) de subpoblaciones celulares más competentes, con características morfológicas y metabólicas favorables, lo que pudo haber permitido que los callos viejos tuvieran una menor cantidad de fenoles que los callos jóvenes y se pudieran diferenciar. Por tanto, estos resultados sugieren que el uso de callos embriogénicos envejecidos, cuando se mantienen en condiciones adecuadas, puede ser una estrategia efectiva para incrementar la producción de embriones somáticos en café.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la oxidación de los callos entre los distintos tratamientos aplicados ($F = 3.736$, $P = 0.014$), lo que sugiere que las condiciones de cultivo influyen de manera importante en este parámetro. Específicamente, el tratamiento que presentó la menor oxidación fue el correspondiente a callos envejecidos sometidos a una inmersión diaria de cuatro minutos. Sin embargo, al comparar directamente callos jóvenes y envejecidos, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de oxidación ni en el contenido de humedad. Esto podría indicar que, si bien existen diferencias en la actividad celular asociadas a la edad del callo, otros factores fisiológicos como el equilibrio hídrico y los mecanismos antioxidantes se mantienen relativamente constantes entre ambos tipos de tejido en el contexto expe-

rimental evaluado. Esta estabilidad sugiere que la edad del callo, por sí sola, no determina de forma directa la susceptibilidad a la oxidación o a la pérdida de agua, sino que estas respuestas pueden estar moduladas por la interacción con factores externos como el tratamiento de inmersión.

Conclusión

Los callos celulares de *Coffea arabica* var. Catuaí envejecidos por seis meses sin recambio de medio de cultivo produjeron significativamente más estructuras embriogénicas somáticas (proembriones y embriones en distintas fases de formación) que los callos que se subcultivan cada cuatro semanas, especialmente cuando se producen en biorreactor de inmersión temporal RITA® con frecuencia de inmersiones de dos veces al día durante cuatro minutos por inmersión.

Bibliografía

Afreen, F. (2008). Biorreactor de inmersión temporal. En S. D. Gupta y Y. Ibaraki (Eds.). Ingeniería de cultivo de tejidos vegetales. Springer. (6), 187–201.

Aga, E., y Khillare, Y. (2017). In vitro multiplication of Coffea arabica L. from leaf explants through indirect somatic embryogenesis. International Journal of Botany Studies, 2(1), 17–22.

Ávila-Víctor, C. M., Ordaz-Chaparro, V. M., Arjona-Suárez, E. D. J., Iracheta-Donjuan, L., Gómez-Merino, F. C., y Robledo-Paz, A. (2023). Propagación masiva in vitro de plantas de café (Coffea arabica L. var. Colombia) mediante embriogénesis somática indirecta. Plantas, 12(6), 1237.

Berthouly, M., y Etienne, H. (2005). Temporary immersion system: A new concept for use liquid medium in mass propagation. En T. Hvoslef-Eide (Ed.), Liquid systems for in vitro mass propagation. Springer, Dordrecht. Pp. 165–195.

Cannata, C., Basile, F., La Bella, E., Arciello, S., Abreu, A. C., Fernández, I., Leonardi, C., y Mauro, R. P. (2024). Exhausted plant cell culture media as potential biostimulants to enhance plant growth and nitrogen use efficiency in tomatoes under optimal and reduced nitrogen supply. Journal of Plant Nutrition and Soil Science.

De-la-Peña, C., Nic-Can, G. I., Galaz-Ávalos, R. M., Avilez-Montalvo, R., y Loyola-Vargas, V. M. (2015). The role of chromatin modifications in somatic embryogenesis in plants. Frontiers in Plant Science, 6, 635.

De Souza, M. P. P., Cipriano, M. A. P., Braghini, M. T., De Sousa, L. P., Mondego, J. M. C., Patrício, F. R. A., y Da Silveira, A. P. D. (2025). Beneficial bacteria improve seedling growth and nutrition and promote biological control of coffee diseases. Journal of Applied Microbiology, lxaf050. 3, 136.

Díaz-Gutiérrez, C. (2019). Financial profitability in the renewal of coffee plantations, in Los Santos, Costa Rica. Revista Tecnología en Marcha, 32(1), 179–192.

Etienne, H., y Berthouly, M. (2002). Sistemas de inmersión temporal en la micropropagación de plantas. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 69, 215–231.

Guyot, R., Hamon, P., Couturon, E., Raharimalala, N., Rakotomalala, J. J., Lakkanna, S., Sabatier, S., Affouard, A., y Bonnet, P. (2020). WCSdb: A database of wild Coffea species. Database, 2020, 1–6.

Jezeer, R. E., Santos, M. J., Verweij, P. A., Boot, R. G., y Clough, Y. (2019). Benefits for multiple ecosystem services in Peruvian coffee agroforestry systems without reducing yield. Ecosystem Services, 40, 101033.

Jiménez, E. (2005). Mass propagation of tropical crops. En A. Hvoslef-Eide y W. Preil (Eds.), Liquid culture systems for in vitro plant propagation. Springer. Pp. 197–211.

López-Gómez, P., Iracheta-Donjuan, L., Castellanos-Juárez, M., Méndez-López, I., Sandoval-Esquivez, A., Aguirre-Medina, J. F., y Gutiérrez-Díez, A. (2010). Influencia del explante y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. Revista Fitotecnia Mexicana, 33(3), 205–213.

McCook, S. (2024). Coffee. En J. Whayne (Ed.), The Oxford handbook of agricultural history. Oxford University Press. Pp. 343–360.

Melese, Y. Y., y Kolech, S. A. (2021). Coffee (Coffea arabica L.): Methods, objectives, and future strategies of breeding in Ethiopia. Sustainability, 13(19), 10814.

Menéndez, A., Etienne, D., Bertrand, B., Georget, F., y Etienne, H. (2010). A comparative analysis of the development and quality of nursery plants derived from somatic embryogenesis and from seedlings for large-scale propagation of coffee (Coffea arabica L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 102, 297–307.

Montagnon, C., Sheibani, F., y Bertrand, B. (2025). The history and genetic diversity of cultivated Coffea arabica. Advances in Botanical Research, 114, 1–28.

Murashige, T., y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum, 15, 473–497.

Oviedo-Rodríguez, C., Jansen, K., y Vellema, S. (2025). Contested coffees: Arabica, robusta, and the narrative of high-quality coffee in Mexico. The Journal of Development Studies, 1–18.

Pancsira, J. (2022). International coffee trade: A literature review. Journal of Agricultural Informatics, 13(1).

Perozo, J. A. V., y de Vílchez, N. R. A. (2025). Estudio del tiempo y la frecuencia de inmersión en la multiplicación in vitro de Paulownia elongata S.Y. Hu. Revista de la Universidad del Zulia, 16(45), 110–119.

Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., y Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology, 5(11).

Rendón, J. R. (2020). Podas y ciclos de renovación: Obtenga una caficultura joven y productiva. Memorias Seminario Científico Cenicafé, 71(1), e71122.

Santos-Costa, C. P., Direito, I. C. N., y Victório, C. P. (2020). Residual 2,4-D in plant tissue culture discarded media: A neglected source of environmental pollution. Brazilian Journal of Development, 6(5), 30046–30059.

Sivanesan, I., Nayeem, S., Venkidasamy, B., Kuppuraj, S. P., Rn, C., y Samynathan, R. (2022). Genetic and epigenetic modes of the regulation of somatic embryogenesis: A review. Biologia Futura, 73(3), 259–277.

Van Boxtel, J., y Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves: Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 44, 7–17.

Widoretno, W., Arumingtyas, E. L., Basuki, N., y Soegianto, A. (2012). Drought resistant selection on soybean somaclonal variants. Agrivita Journal of Agricultural Science, 34(1), 22–27.

Williams, E. G., y Maheswaran, G. (1986). Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Annals of Botany, 57(4), 443–462. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aob.a087127

Cómo citar: Ruiz González, S., Vázquez Hernández, G. del C., Adriano Anaya, L., Salvador-Figueroa, M., & Ovando Medina, I. (2026). La edad del callo determina la producción de embriones somáticos de Coffea arabica en biorreactor de inmersión temporal RITA® . Agrosilvicultura Y Medioambiente, 4(2), 59–71. https://doi.org/10.47230/agrosilvicultura.medioambiente.v4.n2.2026.59-71