

# 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<sup>1\*</sup>, Federico Antonio Gutiérrez-Miceli<sup>1</sup>, María Celina Luján-Hidalgo<sup>1</sup>, Leslie Alondra Serrano-Gómez<sup>1</sup>, Benigno Ruiz-Sesma<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 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.

<sup>2</sup> Centro de Bachillerato Tecnológico Agropecuario No. 80. Carretera Federal Mérida - Chetumal Vía Corta km 108, Chunchuhub, 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

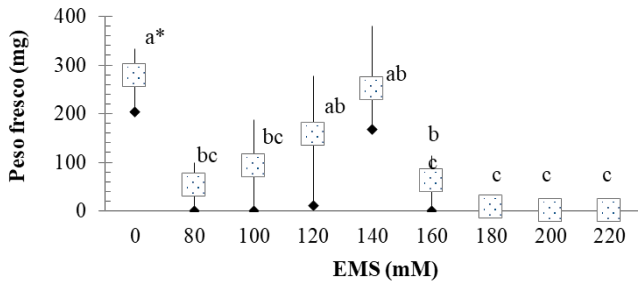
Recibido: 17 de febrero de 2023

Aceptado: 30 de abril de 2023

Publicado: 1 de septiembre de 2023





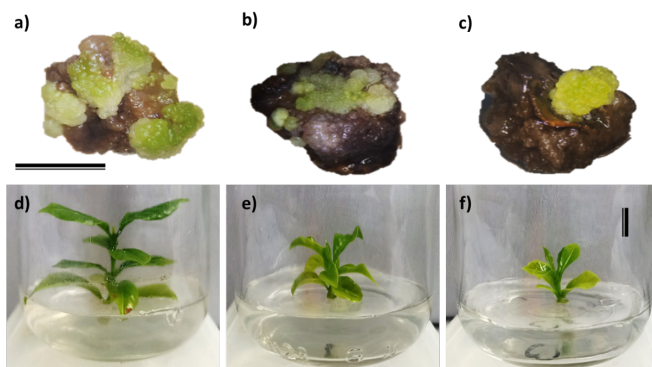


**Figura 2.** Masa fresca en callos de *C. arabica* expuestos a diferentes concentraciones de EMS. \*Diferente literal indica diferencias significativas (Tukey  $P < 0.05$ ).

**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*.

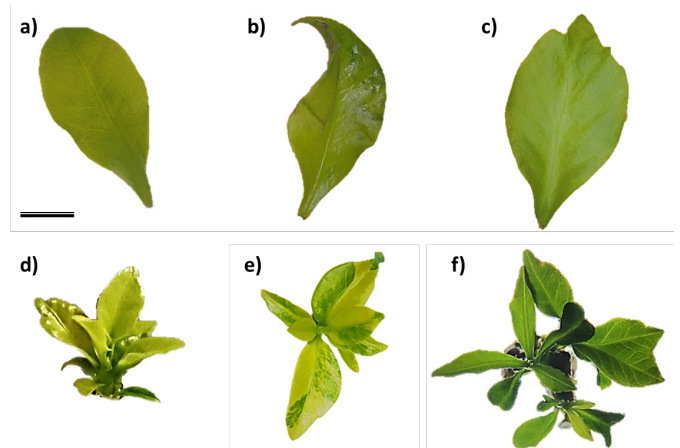
**Table 1.** Morphometric parameters modified by EMS in *Coffea arabica* plants.

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

<sup>1</sup>Concentración de EMS evaluada. <sup>2</sup>Diferencia mínima significativa.

<sup>3</sup>Largo de la hoja. <sup>4</sup>Ancho 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.



- 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.biodiversityinternational.org/fileadmin/user\\_upload/online\\_library/publications/pdfs/365.pdf](https://www.biodiversityinternational.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](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](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](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>.