

RELACIONES HÍDRICAS EN EXPLANTES FOLIARES DE *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner

HYDRAULIC RELATIONS IN PLANT EXPLANTS OF *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner

Gálvez-López, A. L.¹, Iracheta-Donjuan, L.², Medina-Ovando, I.¹, Aguirre-Medina, J.F.^{3*}

¹Universidad Autónoma de Chiapas. Centro de Biociencias. Carretera Puerto Madero Km 2; Tapachula, Chiapas. C.P. 30700. ²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Laboratorio de Biotecnología. Campo Experimental Rosario Izapa, Km 18 Carretera Tapachula-Cacaohatán. Tuxtla Chico, Chiapas. C.P. 30870. ³Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Entronque carretera costera y Estación Huehuetán. CP 30660.

*Autor para correspondencia: juanf56@prodigy.net.mx

RESUMEN

El café robusta (*Coffea canephora*) ha incrementado su demanda para elaboración de café soluble por contener entre 2-3% más de cafeína. Se han identificado genotipos con mayor rendimiento y se busca su reproducción masiva por medio de embriogénesis somática e identificar su respuesta fisiológica a diferentes desinfectantes mediante la determinación de la capacidad de ajuste osmótico. Se desarrolló un estudio para determinar el grado de ajuste osmótico de explantes foliares de café robusta en el establecimiento aséptico *in vitro*. Se utilizaron explantes foliares de los genotipos de *C. canephora*: INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-15, 97-18 y 97-20, desinfectados con NaClO (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0 %), y Ca(ClO)₂ (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 %), así como, la combinación de ambos. Se determinó el potencial hídrico, osmótico, turgencia, y concentración de iones Cl⁻, Na⁺ y Ca⁺⁺. Los resultados indicaron que los genotipos presentan diferente capacidad de tolerancia a los desinfectantes solos o combinados y en su respuesta a la acumulación de sustancias osmóticamente activas, sobresaliendo INIFAP 95-9 y 97-20 con ajuste osmótico por acumulación de Cl⁻, Na⁺ y Ca⁺⁺, mientras que al combinar NaClO y Ca(ClO)₂, el genotipo INIFAP 95-8, disminuyó el ajuste osmótico al incrementar la concentración de los desinfectantes.

Palabras clave: Café robusta, desinfectantes, concentración de iones Cl⁻, Na⁺ y Ca⁺⁺.

ABSTRACT

The demand for Robusta coffee (*Coffea canephora*) has increased, for the elaboration of soluble coffee, because it contains 2-3% more caffeine. Genotypes with higher yield have been identified and their massive reproduction is sought through somatic embryogenesis and by identifying their physiological response to different disinfectants through the determination of the capacity for osmotic adjustment. A study was developed to determine the degree of osmotic adjustment of foliar explants of Robusta coffee in the aseptic *in vitro* establishment. Foliar explants were used of the following genotypes of *C. canephora*: INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-15, 97-18 and 97-20, disinfected with NaClO (0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 4.0 %), and Ca(ClO)₂ (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 %), as well as the combination of both. The hydric, osmotic potential, turgidity, and concentration of Cl⁻, Na⁺ and Ca⁺⁺ ions was determined. The results indicated that the genotypes present different capacity of tolerance to disinfectants alone or combined, and in their response to the accumulation of osmotically active substances, with INIFAP 95-9 and 97-20 standing out, with an osmotic adjustment from accumulation of Cl⁻, Na⁺ and Ca⁺⁺, while when combining NaClO and Ca(ClO)₂, the INIFAP 95-8 genotype showed the osmotic adjustment.

Keywords: Robusta coffee, disinfectants, concentration of Cl⁻, Na⁺ and Ca⁺⁺ ions.

Agroproductividad: Vol. 9, Núm. 10, octubre, 2016. pp: 26-31.

Recibido: julio, 2015. **Aceptado:** septiembre, 2016.

INTRODUCCIÓN

El café es un cultivo de importancia económica en más de 50 países en el mundo y existen cerca de 100 especies, de las cuales *Coffea arabica* L. y *C. canephora* (Pierre) ex Froehner son las más comerciales (Etienne, 2006). México es un productor por excelencia de *Coffea arábica* L. y las áreas cafetaleras se ubican generalmente en las regiones tropicales y subtropicales con clima cálido húmedo. En la actualidad existe una fuerte demanda por *C. canephora* (Pierre) ex Froehner o café "Robusta", que se ha estudiado en los últimos años debido a que contiene de 2% a 3% más cafeína y lo demanda la industria nacional que elabora café soluble. En México no se satisface la demanda de esta especie (CNOOC, 2010). *C. canephora* es alógama y esta condición dificulta la reproducción a gran escala de los genotipos mejorados mediante los métodos tradicionales. La embriogénesis somática es un procedimiento que admite la reproducción masiva de las especies y durante el mismo, es posible evaluar los materiales de interés con el fin de identificar atributos morfológicos y fisiológicos para mejorar su reproducción. En este caso, es relevante evaluar la tolerancia a sequía, mediante sus relaciones hídricas con base en su capacidad de ajuste osmótico, que consiste en la acumulación activa de solutos en respuesta a un déficit hídrico y la disminución del potencial hídrico celular. La osmoregulación, favorece su crecimiento durante y después del estrés hídrico y es relevante en el éxito del establecimiento aséptico y la inducción y multiplicación del callo embriogénico. Por lo anterior, se evaluó el grado de ajuste osmótico de los explantes foliares durante la fase de establecimiento aséptico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon explantes foliares provenientes de hojas jóvenes de cinco meses de edad de genotipos élite de *C. canephora* (Pierre) ex Froehner, provenientes del programa de mejoramiento genético del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) en Rosario Izapa, Chiapas, que fueron seleccionados por expresar alto rendimiento durante varios años de producción. Se recolectaron explantes de hojas jóvenes de los genotipos INIFAP 95-8, 95-9, 97-10, 97-15, 97-18 y 97-20. Se desinfectaron en concentraciones de NaClO al 0.1, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 y 4.0 %, de Ca(ClO)₂ al 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 % y en la combinación de ambos desinfectantes. Posteriormente se enjuagaron con agua destilada y se secaron con papel absorbente. Se obtuvieron discos de la lámina foliar de un milímetro de espe-

sor y cinco de diámetro con la ayuda de un perforador manual y se colocaron en cámaras psicrométricas (Wescor®, modelo C-52, USA) conectadas a un microvoltímetro (Wescor®, HT-33T, USA), de acuerdo a Chandler y Thorpe (1987). Posteriormente el tejido se congeló por 24 horas para evaluar el potencial osmótico (Ψ_{π}). En las mismas cámaras se registró el Ψ_w en bares con base a la ecuación de regresión, obtenida mediante la calibración de las cámaras con diferentes soluciones de NaCl. El potencial de turgencia (Ψ_p) se calculó al despejar la variable Ψ_p de la fórmula $\Psi_w = \Psi_{\pi} + \Psi_p$. Cada tratamiento contó con tres repeticiones. Se llevó a cabo el análisis químico de las hojas después de ser tratadas con cada uno de los tratamientos de desinfección para determinar los iones, como porcentaje de Cl^- , de Ca^{++} y concentración de Na^+ expresada en mg kg^{-1} . La determinación de Cl^- , fue por el método colorimétrico del Tiocianato de Mercurio (Iwahashi et al., 1982) y la determinación del Ca^{++} y Na^+ por Absorción Atómica (Walinga et al., 1995) (PerkinElmer® AS 3100 USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Relaciones hídricas y contenido de iones

Los potenciales, hídrico, osmótico y de turgencia de cada uno de los genotipos al ser sometidos a las diferentes concentraciones y tipos de desinfectantes se presentan en el Cuadro 1 y las concentraciones de Cl^- , Na^+ y Ca^{++} en la Figura 1. En general, los genotipos presentaron la capacidad de ajustarse osmóticamente en al menos uno de los tratamientos de desinfección con respecto a la concentración más baja de desinfectante, aunque en algunos, en mayor o menor grado de ajuste. Al aplicar las diferentes concentraciones de hipoclorito de sodio, en los genotipos INIFAP 95-9 y 97-20 se presentó el mayor grado de ajuste osmótico con la concentración mayor del desinfectante. Los valores encontrados de potencial osmótico fueron -29.7 y -69.6 bares, respectivamente para ambos genotipos. Estos genotipos presentan una dosis letal media relativamente alta, por lo cual se consideran tolerantes a concentraciones altas de hipoclorito de sodio (López-Gómez et al., 2011). En relación al contenido de iones en estos genotipos se observó que la de Cl^- se mantuvo constante a medida que aumentó la concentración del desinfectante NaClO. Para el genotipo INIFAP 95-9 la acumulación activa de solutos se atribuyó al Ca^{++} , al observarse aumento en la concentración de este ion a medida que aumentó la concentración de NaClO; esta relación no fue observada para el Na^+ en el mismo genotipo. Al respecto, Aguirre-Medina et al. (1999) mencionan que algunas especies presentan

Cuadro 1. Potencial hídrico, Osmótico y de Turgencia (Bares) de explantes foliares de genotipos de *Coffea canephora* P. var. Robusta después de desinfectarlos con NaClO, Ca(ClO)₂ y la combinación de ambos desinfectantes a diferentes concentraciones.

Ψ	Desinfectante	%	Genotipos					
			95-8	95-9	97-10	97-15	97-18	97-20
Ψ _w	NaClO	0.3	-8.99±2.3 [†]	-10.35±1.6	-6.65±1.2	-6.77±2.2	-8.13±1.5	-11.96±1.7
		1.25	-6.28 ±2.6	-7.14±0.3	-11.59±3.4	-6.77±0.5	-9.98±2.0	-11.71±1.6
		2.25	-10.23±3.5	-10.11±2.9	-11.84±3.5	-9.74±1.1	-11.59±1.6	-10.48±1.9
		3.25	-7.63±1.5	-8.99±0.3	-12.95±5.4	-8.13±2.1	-9.61±2.7	-11.34±1.8
	Ca(ClO) ₂	3.5	-7.63±0.4	-9.61±4.9	-10.35±1.3	-10.35±5.2	-11.22±3.5	-10.97±1.2
		5.5	-7.39±0.5	-8.50±4.4	-13.44±1.2	-9.36±5.0	-7.14±0.7	-10.35±0.8
		7.5	-10.35±2.8	-10.11±5.1	-12.58±1.2	-6.28±3.6	-8.01±0.5	-14.18±4.7
		9.5	-9.24±0.9	-11.47±6.4	-10.85±1.6	-8.6 2±4.7	-9.98±3.0	-10.60±0.8
	NaClO+Ca(ClO) ₂	0.3+3.5	-9.12±1.1	-7.76±1.3	-8.50±0.6	-10.85±1.6	-7.14±1.0	-12.7±10.6
		1.25+5.5	-8.01±1.5	-11.22±3.8	-8.75±0.4	-11.22±1.6	-7.26±1.2	-8.87±6.2
		2.25+7.5	-8.50±1.7	-9.88±1.4	-13.20±4.2	-9.24±1.7	-9.61±2.6	-11.09±8.3
		3.25+9.5	-9.61±1.6	-14.55±1.7	-8.62±0.7	-6.40±1.2	-11.59±1.5	-10.48±9.9
Ψ _π	NaClO	0.3	-17.24±2.4	-16.49±1.3	-17.83±1.5	-18.35±8.4	-49.83±8.0	-44.30±6.2
		1.25	-12.32±2.8	-15.78±1.8	-21.9±10.5	-11.28±1.8	-68.2±45.0	-32.9±12.5
		2.25	-15.13±2.7	-21.04±3.8	-17.15±1.6	-20.58±6.3	-38.0±15.6	-44.7±17.5
		3.25	-16.4±1.0	-29.72±6.2	-19.83±2.8	-17.81±3.3	-52.3±13.3	-69.6±27.3
	Ca(ClO) ₂	3.5	-13.26±1.5	-18.49±1.9	-17.24±2.9	-19.50±1.3	-35.81±5.2	-28.8±15.1
		5.5	-19.09±1.4	-15.98±0.8	-20.98±6.8	-24.84±5.9	-37.2±14.9	-31.20±8.4
		7.5	-27.15±9.3	-17.12±1.2	-20.08±7.1	-19.64±3.2	-44.7±34.5	-37.04±6.2
		9.5	-20.94±7.8	-18.88±4.6	-19.86±7.1	-18.28±2.2	-34.3±13.1	-41.2±11.4
	NaClO+Ca(ClO) ₂	0.3+3.5	-21.96±7.0	-20.20±3.1	-15.17±3.9	-22.21±2.6	-64.1±41.8	-64.2±35.1
		1.25+5.5	-30.30±8.0	-15.90±1.6	-23.16±4.9	-42.5±11.8	-59.0±44.7	-48.8±22.9
		2.25+7.5	-40.94±37.6	-33.0±15.4	-36.0±16.7	-24.41±1.8	-56.5±13.7	-50.6±15.2
		3.25+9.5	-116.8±2.3	-16.63±2.7	-27.71±4.4	-18.75±3.7	-111.7±9.4	-75.6±45.2
Ψ _p	NaClO	0.3	8.24±1.8	6.13±1.4	11.18±0.2	11.57±5.6	41.70±4.5	32.33±5.9
		1.25	6.04±0.4	8.63±1.8	10.34±5.1	4.50±2.2	58.28±3.1	21.2±12.1
		2.25	4.90±0.0	10.93±2.6	5.31±2.5	10.84±5.9	26.43±0.7	34.3±16.4
		3.25	8.76±2.5	20.72±7.3	6.38±5.6	9.67±0.8	42.73±6.6	58.3±11.7
	Ca(ClO) ₂	3.5	5.62±1.0	8.78±0.6	6.88±2.1	9.14±2.0	24.59±4.0	17.9±12.6
		5.5	11.70±1.8	7.47±0.1	7.53±6.0	15.47±1.5	30.10±4.5	20.85±6.4
		7.5	16.80±4.8	7.01±1.9	7.50±5.7	13.36±2.1	36.7±32.4	22.86±1.4
		9.5	11.69±5.0	7.41±6.0	9.00±2.9	9.65±2.4	24.3±10.0	30.61±0.5
	NaClO+Ca(ClO) ₂	0.3+3.5	12.83±0.2	12.43±1.9	6.67±3.9	11.36±1.3	57.0±43.0	51.5±30.4
		1.25+5.5	22.29±2.2	4.68±3.4	14.41±2.5	31.31±0.0	51.7±36.4	40.0±20.8
		2.25+7.5	32.43±28.7	23.03±12.7	22.8±17.4	15.16±2.9	46.8±15.3	39.5±15.0
		3.25+9.5	107.27±1.2	2.07±1.1	19.08±1.5	12.35±2.0	100.1±7.8	65.2±60.8

[†] Error estándar promedio de tres repeticiones por tratamiento.

la capacidad de acumular sustancias durante un estado de estrés hídrico, las cuales son constituyentes normales de las células.

En el genotipo INIFAP 97-20, la acumulación activa de solutos se atribuyó al Na⁺. En este caso se presentó au-

mento en la concentración de dicho ion en proporción a la concentración de NaClO. El comportamiento anterior sugiere que la tolerancia de este genotipo al NaClO puede relacionarse con la toma del ion presente en la solución desinfectante para crecer en esta condición de estrés. El genotipo INIFAP 97-10 no presentó variaciones

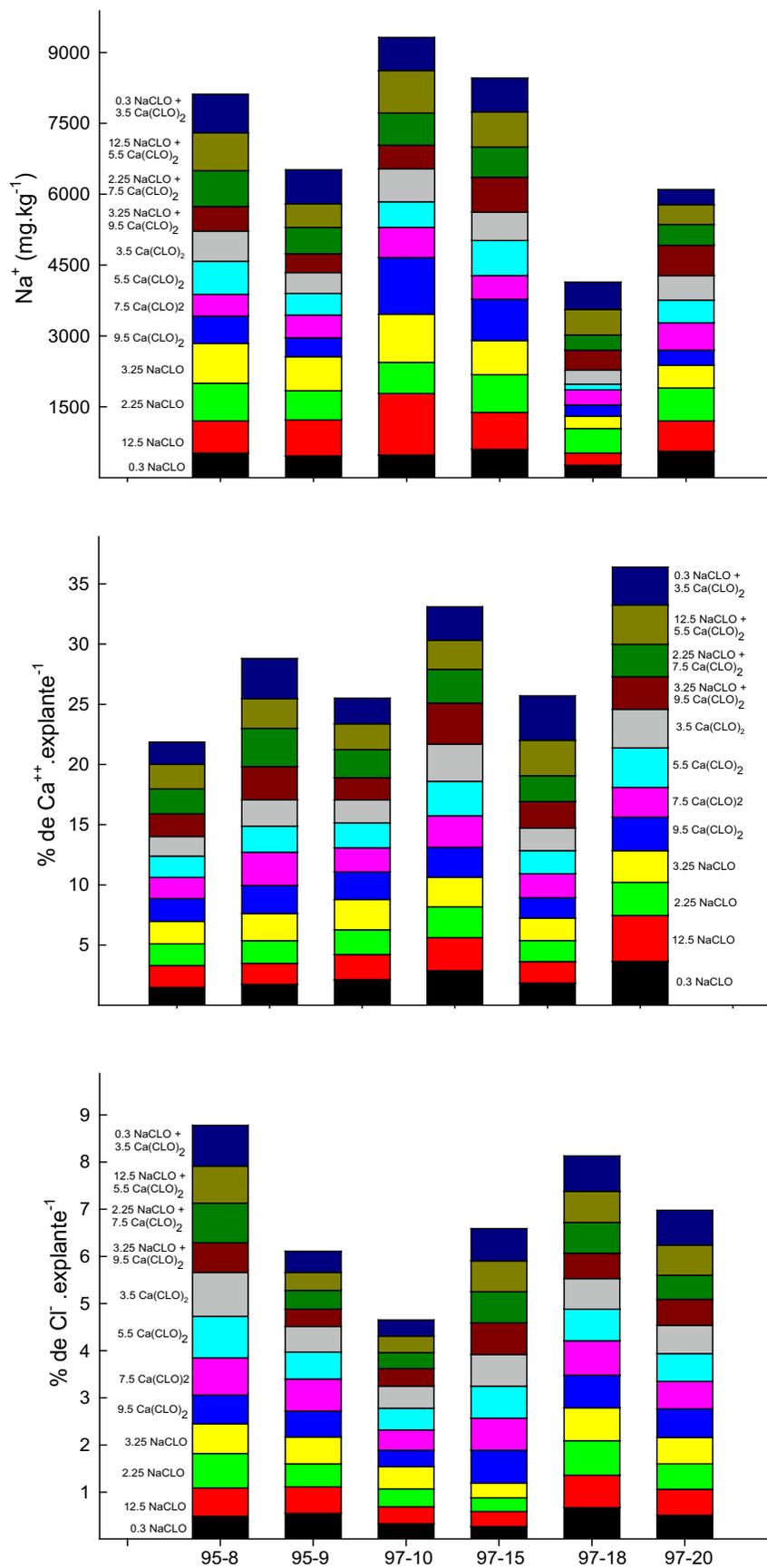


Figura 1. Porcentaje de iones Cl⁻, Ca⁺⁺ y mg kg⁻¹ de Na⁺ en explantes foliares de *Coffea canephora* P. después de ser desinfectados con NaClO, Ca(ClO)₂ solos y combinados.

ascendentes en relación con el incremento de la concentración de NaClO aplicado, en cambio con el genotipo INIFAP 97-18, la acumulación fue alta, independientemente de la concentración aplicada. No se presentó tendencia clara en cuanto a la concentración de Cl⁻, Na⁺ y Ca⁺⁺ que indique acumulación de estos iones en relación al aumento de la concentración de NaClO. En el resto de los genotipos (INIFAP 95-8 y 97-15) la mayor turgencia y acumulación de solutos se presentó a concentraciones de 0.3% y 2.25 % de NaClO respectivamente, si bien ambos genotipos presentaron tendencia a aumentar la concentración de solutos (iones Cl⁻, Na⁺ y Ca⁺⁺) conforme se elevó la concentración de desinfectantes, tales valores no indicaron claridad en el ajuste osmótico. Lo anterior coincide con lo registrado en estudios de dosis letal media de desinfectantes (López-Gómez *et al.*, 2011), ya que los genotipos, a excepción del INIFAP 97-10, se consideran como sensibles a moderadamente sensibles al hipoclorito de sodio. Al respecto, Parra *et al.* (1999) mencionan que uno de los procesos fisiológicos más sensibles al estrés hídrico es el crecimiento celular que induce a la senescencia (oxidación) prematura causado por la reducción de la turgencia celular, el cierre estomático y el aumento de la concentración de ácido abscísico. Al someter los genotipos a las diferentes concentraciones de hipoclorito de calcio Ca(ClO)₂ se pudo observar que la turgencia celular se mantuvo con valores positivos en todos los genotipos, e incluso en algunos de ellos aumentó. Tal comportamiento lo presentó el genotipo INIFAP 97-20, en el cual, al aumentar la concentración de Ca(ClO)₂ se incrementó el potencial de turgencia. Es probable que esta capacidad no esté asociada a la acumulación de iones, tales como el Cl⁻, Na⁺ y Ca⁺⁺, más bien, a la síntesis de sustancias como ácidos orgánicos, aminoácidos y azúcares (Wang y Stutte, 1992; Wang *et*

al., 1995), o bien, por modificaciones en la elasticidad de la pared celular (Silva-Robledo *et al.*, 2007). En los genotipos INIFAP 95-8, 97-15 y 97-18 a medida que aumentó el potencial de turgencia, el potencial osmótico disminuyó. Sin embargo, en el genotipo INIFAP 97-15 el mantenimiento del potencial de turgencia no fue debido a la disminución del potencial osmótico al no expresarse ajuste osmótico definido. En este mismo genotipo, se observó aumento en la concentración de Ca^{++} , con relación a la concentración de $Ca(ClO)_2$, sin embargo, la falta de tolerancia a este desinfectante no indujo ajuste osmótico por la acumulación del mismo. A diferencia del genotipo INIFAP 97-15, en las variedades INIFAP 95-8 y 97-18, la capacidad de ajuste osmótico por acumulación activa de solutos se presentó con la aplicación de la concentración promedio de 7.5% de $Ca(ClO)_2$ y cuando se aplicó 9.5% se observa un ligero descenso del mismo. Lo anterior sugiere que el ajuste osmótico observado en estos genotipos está relacionado con la absorción y acumulación activa del Ca^{++} (Figura 2).

En el caso del genotipo INIFAP 97-10 no se observaron diferencias entre los valores de los potenciales hídricos, osmótico y de turgencia por efecto de las diferentes concentraciones de $Ca(ClO)_2$, esto pudo atribuirse a que es altamente tolerante al desinfectante (López-Gómez *et al.*, 2010). Esta misma tolerancia fue observada al determinar la concentración de iones, al permitir incluso, disminuir la concentración del Ca^{++} a medida que se aumenta la concentración de $Ca(ClO)_2$. Lo anterior implica que este último genotipo presenta un mecanismo diferente de tolerancia

a este desinfectante en comparación al resto de los genotipos. De acuerdo a Ludlow (1989), la capacidad de modificar morfológica como fisiológicamente las estructuras celulares para disminuir los efectos del estrés,

dependerán de la tolerancia de los tejidos al déficit hídrico. La combinación de $NaClO$ y $Ca(ClO)_2$ no tuvo efecto diferencial en cuanto a los valores del potencial hídrico en la mayoría de los genotipos, sin embargo, el genotipo INIFAP 95-8, registró tendencia a disminuir el ajuste osmótico a medida que se aumentó la concentración de los desinfectantes. Asimismo, aumentó la acumulación de Na^+ y Ca^{++} proporcionalmente a la concentración de $NaClO$ y $Ca(ClO)_2$. En el caso de INIFAP 97-10 y 97-15, no se presentó ajuste osmótico. La acumulación activa de solutos se registró sólo a bajas concentraciones de ambos desinfectantes [no mayores a 2.25 % $NaClO$ +7.5 % $Ca(ClO)_2$ y 1.25 % $NaClO$ +5.5 % $Ca(ClO)_2$ respectivamente]. En general la concentración de Na^+ y Ca^{++} , fluctuó con respecto a la concentración de $NaClO$ y $Ca(ClO)_2$, sin mostrar una tendencia clara de aumento o disminución. En las variantes INIFAP 97-18 y 97-20 esta capacidad de ajuste osmótico se observó con altas concentraciones de la combinación de hipoclorito de sodio y calcio (mayores a 3.25 % $NaClO$ +9.5 % $Ca(ClO)_2$), y sus relaciones hídricas tuvieron cierta relación con la concentración de Na^+ y Ca^{++} , es decir, la mayor concentración se registró con las altas concentraciones de ambos desinfectantes. En

cambio en INIFAP 95-9 no se expresó con claridad el ajuste osmótico por la acumulación activa de solutos.



Figura 2. Explantes y plántulas de *Coffea canephora* (Pierre) ex Froehner.

La tendencia de aumentar la concentración de Na^+ , no fue suficiente para el mantenimiento de la turgencia celular a altas concentraciones de ambos desinfectantes. Entre los genotipos se presentó respuesta diferencial a la capacidad de ajuste osmótico al ser sometidos a determinados tipos de desinfectantes. A la vez, la desinfección de los explantes es un proceso que puede dañar a los tejidos (oxidación), mediante la inducción de estrés hídrico como resultado de la solución desinfectante. La respuesta diferente entre algunos genotipos a los desinfectantes puede estar asociada a cambios en la elasticidad de la pared celular (Silva-Robledo et al., 2007) y no necesariamente a una acumulación de solutos osmóticamente activos.

CONCLUSIONES

Existe diferente capacidad de tolerancia de los genotipos de café robusta a los desinfectantes solos o combinados y en su respuesta a la acumulación de sustancias osmóticamente activas. Los genotipos INIFAP 95-9 y 97-20 presentaron ajuste osmótico, por acumulación de Cl^- , Na^+ y Ca^{++} , al desinfectarlos tanto por hipoclorito de sodio (NaClO), como por hipoclorito de calcio [$\text{Ca}(\text{ClO})_2$]. El genotipo INIFAP 95-8, lo presentó con la combinación de ambos desinfectantes [NaClO y $\text{Ca}(\text{ClO})_2$] y disminuyó el ajuste osmótico al aumentar la concentración de los desinfectantes.

LITERATURA CITADA

- Aguirre-Medina J.F., Kohashi-Shibata J., Trejo C.L., Acosta-Gallegos J. 1999. Respuesta fisiológica del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) a la sequía, en un sistema de raíz dividida. *Agronomía Mesoamericana*. 10(1) : 31-36
- Chandler S.F., Thorpe T.A. 1987. Proline accumulation and sodium sulfate tolerance in callus cultures of *Brassica napus* L. cv. Wesfar. *Plant Cell Report*. 6:176-179
- CNOC. 2010. Sobre el consumo de café soluble (Instantáneo) y el café robusta en México. 4p. Disponible en: <http://www.infocafes.com/descargas/biblioteca/120.pdf>. Consultada 7 de agosto 2013.
- Etienne H. 2006. Somatic embryogenesis protocol: Coffe (*Coffea arabica* L. *C. canephora* P.). In: Protocol for somatic embryogenesis in woody plants. Jain S M, Guta P K (eds). Springer. The Netherlands, p. 167-179.
- Iwahashi M., Tachibana Y., Ohta Y. 1982. Accumulation of calcium, magnesium, potassium and sodium with growth of individuals leaves, petioles and stems of cucumber plants. *Soil Sci Plant Nutr*. 28:441-449.
- López-Gómez P., Iracheta-Donjuan L., Castellanos-Juárez A., Méndez-López I., Sandoval-Esquivel M., Aguirre-Medina J.F., Ojeda-Zacarias M. del C., Gutiérrez-Díez A. 2010. Influencia de explantes y medio de cultivo en la embriogénesis somática en hojas de café. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 33 (3): 205-213.
- López-Gómez P., Iracheta-Donjuan L., Castellanos-Juárez M., Méndez-López I., Aguirre-Medina J.F., Gutiérrez-Díez A., Ojeda Zacarías M. del C., Pérez-Pérez B.R. 2011. Variación en la tolerancia a desinfectantes de genotipos élite de *Coffea* spp. cultivados *in vitro*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. Vol. 2 (5): 645-657.
- Ludlow M.M. 1989. Strategies in response to water stress. In: Kreeb H K, Ritcher H And Hickley T M Edrs. Structural and functional response to environmental stresses: Water shortage. The Hague, Netherlands: SPB. Academic Press. pp. 269-281.
- Parra R.A., Rodríguez J.L., González V.A. 1999. Transpiración, potencial hídrico y prolinea en Zarzamora bajo déficit hídrico. *Terra*. 17(2): 125-130
- Silva-Robledo H., Ortiz-Lizana M., Acevedo-Hinojosa E. 2007. Relaciones hídricas y ajuste osmótico en trigo. *Agrociencia* 41: 23-34.
- Walinga I., Van Der Lee J.J., Houba V.J.G., Van Vark W., Novo-Zamsky I. 1995. Plant analysis manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 253
- Wang Z., Stutte G.W. 1992. The role of carbohydrates in active osmotic adjustment in apple under water stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci*. 117: 816-823
- Wang Z., Quebedeaux B., Stutte G.W. 1995. Osmotic adjustment: Effect of water stress on carbohydrates in leaves, stems and roots of apple. *Aust. J. Plant Physiol*. 22:747-754.

