

Revisión bibliográfica

Estado actual de la conservación de recursos fitogenéticos de caféto (*Coffea* spp.)

Yanelis Castilla-Valdés^{1*} 

¹Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), carretera San José-Tapaste, km 3½, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. CP 32 700

*Autor para correspondencia: yanelis@inca.edu.cu

RESUMEN

El caféto (*Coffea* spp.) es un cultivo agrícola que tiene una relevancia económica y social significativa en numerosos países, incluyendo a Cuba. Se plantea que el 60 % de sus especies se encuentran clasificadas como amenazadas de extinción, por lo que la presente revisión bibliográfica se propuso el objetivo de analizar el estado de la conservación de recursos fitogenéticos de caféto en los últimos años. La deforestación, el cambio climático y las especies invasoras son algunos de los riesgos que se enfrentan en sus sitios de origen. La conservación *ex situ* del germoplasma de caféto mediante semillas no resulta factible por períodos prolongados, debido a la sensibilidad de sus tejidos a la desecación y las bajas temperaturas. Las colecciones de germoplasma en campo se encuentran expuestas a diferentes riesgos, desde su ubicación en condiciones ecológicas que no son las ideales para la supervivencia de todo el material, el envejecimiento de los ejemplares, métodos de cultivo inapropiados y la emergencia de plagas y enfermedades, hasta la ausencia de interés de autoridades locales. Los métodos biotecnológicos de crecimiento mínimo y crioconservación, constituyen opciones promisorias para el mantenimiento a mediano y largo plazos de recursos fitogenéticos de caféto, por lo que resulta trascendental ampliar las investigaciones en este sentido, para lograr que se complementen las diferentes alternativas de conservación de este género tradicional.

Palabras clave: biotecnología vegetal, cambio climático, cultivo *in vitro*, deforestación, extinción de especies, germoplasma

Recibido: 23/11/2020

Aceptado: 26/04/2021

INTRODUCCIÓN

El cafeto (*Coffea* spp.) juega un importante rol económico a nivel mundial, pues representa una de las principales fuentes de ingresos en unos 80 países productores de café ⁽¹⁾. La producción mundial se basa principalmente en dos especies: *Coffea arabica* L., que representa el 60 % y *C. canephora* Pierre con el restante 40 % ⁽²⁾, aunque algunas de las especies no comerciales han sido usadas a nivel local o regional como sustitutas para *C. arabica* L. ⁽³⁾. En el siglo XVIII fue introducida *C. arabica* en Latinoamérica ⁽⁴⁾, donde se produce aproximadamente el 60 % del volumen de exportación internacional de café, como la principal fuente de ingreso de muchos países ⁽⁵⁾. En esta región se destacan, entre otros, Brasil, Colombia, Honduras, México y Perú, como principales productores ⁽⁵⁾. En Cuba, el cafeto constituye una prioridad en el sector de la agricultura, ya que el café es una bebida de consumo habitual por la población, así como un rubro exportable ⁽⁶⁾.

Existen 124 especies de *Coffea* spp. conocidas para la ciencia, que habitan naturalmente en África tropical, las islas del Océano Índico (Madagascar, Islas Comores e Islas Mascareñas), Asia y Australia ⁽⁷⁾. Todas presentan en común la morfología característica de los granos de cafeto ⁽⁸⁾. Además, estas especies muestran caracteres útiles para el mejoramiento genético, como tolerancia climática ⁽⁹⁾, incluyendo tolerancia a la sequía, resistencia a plagas y enfermedades ⁽¹⁰⁾, bajo contenido de cafeína ⁽¹¹⁾ y mejora sensorial ⁽¹²⁾.

Sin embargo, la aplicación de las Categorías y Criterios de la Lista Roja de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (UICN) ⁽¹³⁾ a las especies de *Coffea*, ha arrojado datos alarmantes, en relación con su estado de conservación. El 60 % del total (75 especies) han sido clasificadas como amenazadas de extinción, incluyendo 13 en Peligro Crítico, 40 en Peligro y 22 Vulnerables. 35 especies han sido catalogadas como no amenazadas (Casi Amenazada o Preocupación Menor) y 14 especies han sido consideradas como de Datos Insuficientes ⁽¹⁴⁾.

Por otra parte, ha sido demostrado que solo aproximadamente la mitad (55 %) de todas las especies de cafeto, son mantenidas en colecciones de germoplasma *ex situ*. El 72 % se encuentra, al menos en un área protegida *in situ*; el 18 % no tienen protección *in situ* y se desconoce acerca de la existencia de 13 especies en áreas protegidas (incluyendo 11 especies de Datos Insuficientes). *C. arabica*, *C. eugenioides*, *C. canephora* y *C. liberica* parecen ocupar una posición más segura que otras, ya que están incluidas en, al menos, un área protegida y en colecciones de germoplasma. Sin embargo, no se logra abarcar, adecuadamente, la diversidad genética en ambos ambientes protegidos (*in situ* y *ex situ*). Debido a la rápida deforestación, el cambio climático y la erosión genética, están disminuyendo las opciones para coleccionar material vegetal de *C. arabica* silvestre para su uso, por ejemplo, en el mejoramiento genético ⁽¹⁴⁾, de aquí la importancia de contribuir al estudio de su conservación.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, la presente revisión bibliográfica se propuso el objetivo de analizar el estado de la conservación de recursos fitogenéticos de cafeto (*Coffea* spp) en la última década.

Conservación *in situ*

La conservación de especies vegetales *in situ*, ofrece la posibilidad de mantener una mayor diversidad de especies y genes en un ambiente dinámico, permitiendo que las poblaciones continúen evolucionando. El cafeto silvestre se encuentra creciendo naturalmente como árboles de sotobosque en los bosques tropicales de África, comprendiendo un amplio rango geográfico desde Guinea en África Occidental, a través de África Central hacia África Oriental ⁽¹⁾. Otros centros de diversidad incluyen Madagascar, las Islas Comoras y las Islas Mascareñas en el Océano Índico (La Reunión y Mauricio) y con la inclusión del género *Psilanthus* en *Coffea*, la distribución geográfica se extiende al Asia tropical y Australia ⁽⁷⁾.

Los centros primarios de origen y diversidad de *C. arabica* se localizan en las tierras altas del suroeste de Etiopía, la Meseta de Boma en Sudán del Sur y Monte Marsabit en Kenia ⁽¹⁵⁾. En Etiopía, por ejemplo, uno de los factores clave que influyen en la erosión de la diversidad genética del cafeto es la deforestación ⁽¹⁶⁾. Entre 1971 y 1977, alrededor de 235 400 ha de bosques cerrados y ligeramente perturbados fueron deforestados en las tierras altas de la meseta del suroeste etíope ⁽¹⁷⁾.

En un intento por conservar los últimos bosques de cafeto en Etiopía y por detener la pérdida de biodiversidad, varias áreas se han incorporado a la Red Mundial de la Biosfera de la UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura) bajo el programa El Hombre y la Biosfera. En 2010, se incorporaron las Reservas de la Biosfera Yayu y Kafa, mientras que en 2012 se unió Bosque Sheka. Estas representan algunos de los últimos fragmentos de selva montana con poblaciones silvestres de *C. arabica*, que subsisten en el planeta ⁽¹⁾. La designación de estas áreas como Reservas de la Biosfera de la UNESCO, es ciertamente un importante paso hacia la implementación de un enfoque activo de conservación de tierras en Etiopía, que cubre más de un millón de hectáreas entre las tres reservas ⁽¹⁸⁾.

A pesar de estos avances, estudios publicados muestran que la superficie que ocupan los bosques de cafeto, incluidos en áreas protegidas, aun es pequeña y se proyecta que el cambio climático tenga una influencia sustancialmente negativa en lugares, donde actualmente habitan los arábicas indígenas en Etiopía y Sudán del Sur. Se han utilizado todas las proyecciones futuras disponibles para las especies, basadas en modelos de circulación general múltiple, escenarios de emisión y escenarios de emigración, para predecir cambios en el grado de aparición, área de ocupación y números de población para *C. arabica* silvestre. Bajo los efectos del cambio climático los resultados mostraron que los números de

población se pudieran reducir un 50 % o más (con algunos modelos mostrando hasta un 80 %) para el 2088, mientras que el área de ocupación pudiera disminuir en un 30 % en muchos casos ⁽¹⁹⁾.

El rango natural de *C. canephora* cubre un área geográfica mucho más amplia, que se extiende desde África Occidental hacia Camerún, República Centroafricana, Congo, la República Democrática del Congo, Uganda y el norte de Tanzania hasta el norte de Angola, aunque generalmente aparece como poblaciones pequeñas, aisladas, con un pequeño número de árboles madre y muy pocas plántulas dispersas por áreas menores de 1 ha ⁽¹⁵⁾.

En el Parque Nacional Kibale, de Uganda, el Proyecto Cafeto Silvestre se planteó utilizar un enfoque único para conservar los recursos genéticos de *C. canephora* mediante un acercamiento basado en el mercado. Este proyecto proponía apoyar la conservación de la naturaleza y las comunidades locales, mediante la comercialización de cosechas sostenibles del cafeto silvestre que crece naturalmente en el parque ⁽²⁰⁾. Aunque no tuvo éxito en ganar acceso a los mercados internacionales de café, las lecciones aprendidas permitieron obtener una guía útil para otros esfuerzos, basados en el mercado, vinculando la conservación de los recursos forestales, las comunidades locales y el comercio internacional ⁽¹⁾.

En Mauricio, una de las Islas Mascareñas situadas en el suroeste del Océano Índico, también existe experiencia en la conservación *in situ* de las tres especies de *Coffea* nativas de ese territorio: *C. mauritiana* Lam., *C. macrocarpa* A. Rich. y *C. myrtifolia* (A.Rich. ex DC.) Leroy. Allí las áreas protegidas (siete Reservas Naturales y un Parque Nacional) han sido establecidas, primeramente, para proteger muestras representativas de la vegetación nativa, de forma tal que conservan solo parte del rango de la diversidad genética de cafeto silvestre, que se ha visto afectada por la drástica reducción de las áreas boscosas y la destrucción de hábitats por especies exóticas invasoras. Adicionalmente, han sido establecidas reservas conocidas como Áreas de Manejo de Conservación para conservar la flora y fauna nativas y sus hábitats de manera integrada. Estas áreas fueron cercadas para evitar animales como venados y cerdos, y de ellas fueron removidas manualmente las plantas exóticas. De esta forma, se ha logrado mejorar significativamente la calidad del bosque y recuperar las comunidades vegetales y animales ⁽²¹⁾.

La erosión del fondo genético *in situ* de *Coffea* spp se ha convertido en una preocupación significativa, debido a las múltiples amenazas a sus hábitats naturales, como la deforestación, invasión por actividades de la agricultura, presiones poblacionales y dificultades económicas de las poblaciones locales que dependen de estos bosques ⁽¹⁵⁾. Los esfuerzos de conservación del germoplasma de cafeto en sus hábitats naturales han sido muy limitados, con ejemplos solo conocidos en Etiopía, Mauricio y Uganda. Muchas áreas, como la región central de Gabón y la República Centroafricana, todavía permanecen inexploradas y queda mucho trabajo por hacer en los puntos calientes de diversidad en Madagascar y África continental, particularmente Tanzania ⁽¹⁵⁾. Por lo tanto, la conservación de estos recursos fitogenéticos

en colecciones *ex situ* como bancos de germoplasma en el campo, se vuelve imperativa, como alternativa o estrategia de respaldo para las medidas de conservación *in situ* ⁽¹⁵⁾.

Conservación *ex situ*

Conservación en bancos de germoplasma en el campo

Los bancos de germoplasma en el campo que mantienen significativas colecciones de *C. arabica* se localizan en África (Camerún, Costa de Marfil, Etiopía, Kenya y Tanzania), Madagascar, India y en América (Brasil, Colombia y Costa Rica). Las colecciones de campo en Camerún, Costa de Marfil, India y Madagascar también mantienen una buena representación de *C. canephora*. Una gran parte de las especies de cafeto silvestre no cultivadas, se conservan en bancos de germoplasma en Madagascar, que mantiene unas 50 especies y Costa de Marfil, con unas 30 especies de cafeto africano ⁽²²⁾.

En jardines botánicos de 50 países también son conservadas unas 445 accesiones de cafeto que provienen de 26 especies y algunos híbridos interespecíficos. *C. arabica*, *C. canephora* y *C. liberica* aportan el 81 % de estas accesiones en jardines botánicos ⁽¹⁾. De las 73 accesiones con designación de especies, once son conservadas solo en un jardín botánico y cuatro de estas especies no han sido mantenidas en ninguna otra colección. De esta forma, los jardines botánicos pueden ser reservorios de especies únicas o de un nivel de diversidad de variedades, que necesita ser considerado como parte del sistema global para la conservación *ex situ* de cafeto ⁽¹⁾.

A lo largo de los años, han ocurrido pérdidas sustanciales de genotipos de cafeto en varios bancos de germoplasma, que han resultado en la pérdida de accesiones enteras. Tomando como ejemplo la colección del CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) en Costa Rica, uno de los principales retos enfrentados incluye el envejecimiento de los árboles (la mayoría fueron establecidos en los años 70, aunque hay colecciones que se iniciaron en la década del 40 del pasado siglo). También influyen las condiciones climáticas y la elevación sub-óptimas, la necesidad de variadas prácticas culturales debido a la naturaleza diversa de las colecciones, con genotipos cultivados y silvestres que difieren en sus necesidades de sombra, poda, fertilizantes, así como falta de financiamiento y otros recursos. Se considera que unas 53 accesiones se han perdido a lo largo de los años debido al envejecimiento y al efecto de plagas y enfermedades ^(1,22).

Cuba no constituye un país de origen del cafeto, por lo que la conservación *in situ* no tiene lugar; en cambio, existen áreas dedicadas a su conservación *ex situ*, como las pertenecientes a la Estación Central de Investigaciones de Café y Cacao (ECICC), localizada en la provincia de Santiago de Cuba, donde se conservan 1597 accesiones ⁽¹⁾.

Las colecciones de germoplasma de café en campo se encuentran expuestas a diferentes riesgos, desde eventos climáticos extremos hasta la ausencia de prioridad de autoridades locales ⁽¹⁾. Frecuentemente se encuentran localizadas en condiciones ecológicas que no son las ideales para su mantenimiento o para la supervivencia de todo el material, ocasionando erosión genética ⁽²¹⁾. Otras causas de esta son la pérdida de árboles como consecuencia del envejecimiento, métodos de cultivo inapropiados, así como la emergencia de plagas y enfermedades ⁽²³⁾. Algunas de las medidas de prevención tomadas contra el estrés biótico y abiótico incluyen el monitoreo frecuente de las colecciones, la adecuada irrigación, la aplicación de fertilizantes, el sombreado, la protección química y el manejo integrado de plagas y enfermedades ⁽¹⁾. De todo ello, se pone de manifiesto la necesidad de aplicar otras alternativas a la conservación en campo de recursos fitogenéticos de café.

Almacenamiento de semillas de café

Sobre la base de sus características durante el almacenamiento, las semillas de café han sido clasificadas como intermedias, ya que toleran determinado nivel de desecación, pero no sobreviven la desecación total, ni los efectos combinados de la desecación y las bajas temperaturas ⁽²⁴⁾. Se conoce que la viabilidad de las semillas de *C. arabica* decrece rápidamente luego de cuatro a seis meses a temperatura ambiente ⁽²⁵⁾.

Aunque la vía más común para producir plántulas de café es la semilla botánica, la pérdida de germinación durante el almacenamiento es una limitación para la conservación y propagación de este género ⁽²⁶⁾. De aquí la necesidad del estudio de formas alternativas de conservación *ex situ*, como la aplicación de métodos biotecnológicos a la preservación de recursos fitogenéticos del café.

Métodos biotecnológicos

Conservación *in vitro*

Entre las múltiples aplicaciones del cultivo *in vitro* se encuentra la conservación *in vitro*, valiosa opción para la preservación de germoplasma de especies con semillas de corta viabilidad como el café. Los métodos de crecimiento mínimo permiten llevar a cabo este objetivo ⁽²⁷⁾.

Los métodos de crecimiento mínimo consisten en reducir la velocidad de crecimiento de las plantas, basados en la disminución de la división celular y el metabolismo, lo cual se logra mediante la alteración de las condiciones óptimas de cultivo. Es posible variar la composición del medio de cultivo o modificar el ambiente de crecimiento (temperatura, intensidad luminosa, disponibilidad de oxígeno) ⁽²⁸⁾. De esta manera, resulta factible conservar las plantas a corto o mediano plazos, lo que permite una reducción en la frecuencia de los subcultivos y un incremento en la longevidad *in vitro* del material vegetal, así como un mínimo riesgo de cambios genéticos ^(27,29).

Para la conservación *in vitro* de cafeto se han estudiado diferentes variantes de crecimiento mínimo ⁽³⁰⁾, como las variaciones en la temperatura de cultivo, en combinación con la disminución del contenido de oxígeno ^(31,32), la modificación en la concentración de la fuente de carbono ^(33,34) y la adición de reguladores osmóticos del crecimiento ⁽³⁵⁾. La más utilizada ha sido la modificación de la concentración de reguladores del crecimiento en el medio de cultivo ⁽³⁶⁻³⁸⁾. En la última década se han realizado otras contribuciones a estos temas, como se detallará a continuación.

Para la conservación *in vitro* de germoplasma de *C. arabica* cv S. 795 se desarrolló un protocolo consistente en inocular los embriones cigóticos en medio MS ⁽³⁹⁾, suplementado con sacarosa (3,0 %) y diferentes concentraciones de ácido abscísico (ABA) (0; 0,1; 0,5 y 1,0 mg L⁻¹). Se mantuvieron a una temperatura de 25±1 °C y fotoperíodo de 16 h, durante doce meses. Para la germinación, los embriones se subcultivaron en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de kinetina (KIN) o ácido giberélico (AG₃) (0; 0,1; 0,5; 1,0 y 5,0 mg L⁻¹) y a los 45 días se realizó su evaluación ⁽⁴⁰⁾. Los resultados mostraron que los embriones cigóticos colocados en medio de cultivo con las diferentes concentraciones de ABA, exhibieron respuestas de maduración variables.

En el control, los embriones germinaron después de una semana y el brote y la raíz se desarrollaron más largos, en comparación con los medios con bajas concentraciones, donde se indujo una germinación muy lenta. Cuando se cultivaron los embriones en concentraciones de ABA más elevadas, se observó su alargamiento, seguido de un cambio de color de blanco a verde oscuro en un intervalo de dos semanas. Estos embriones alcanzaron la madurez completa y permanecieron inactivos, sin desarrollo de brotes y raíces ⁽⁴⁰⁾.

De las diversas concentraciones de KIN, el tratamiento de 0,1 mg L⁻¹ fue más efectivo para el desarrollo de plántulas, con una longitud máxima de brote y la raíz más larga con numerosas raíces laterales, en comparación con las concentraciones más elevadas de KIN, que provocaron la completa inhibición del desarrollo de este órgano. La adición de AG₃ a 0,1 y 0,5 mg L⁻¹ incrementó la longitud del brote, en comparación con el control, mientras que un aumento en la concentración de AG₃ no tuvo este efecto. Estos resultados mostraron que la KIN fue más adecuada que el AG₃ para desarrollar plántulas vigorosas ⁽⁴⁰⁾.

Un estudio realizado por investigadoras cubanas, se propuso determinar el efecto de la disminución del contenido mineral del medio de cultivo en la respuesta de plantas de cafeto (*C. arabica*) conservadas *in vitro* por un período entre dos y seis meses. Las plantas, obtenidas *in vitro* previamente, se cultivaron en medio MS modificado, con tratamientos consistentes en la reducción al 75, 50 y 25 % de sus macro y microelementos. Fueron evaluados la supervivencia, el número de pares de hojas, la abscisión foliar y el porcentaje de plantas con raíces. En el tratamiento de MS al 50 %, los porcentajes de supervivencia variaron entre el 85 y 100 % y con respecto al resto de los tratamientos, se obtuvieron valores intermedios de pares de hojas y de abscisión foliar. A pesar de la carencia de nutrientes, las plantas desarrollaron

raíces que les permitieron sobrevivir en estas condiciones, por lo que con este tratamiento se considera factible conservar hasta seis meses las plantas *in vitro* de café (41).

Crioconservación

La crioconservación, el almacenamiento de material biológico preferentemente a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C), es una alternativa a la conservación *ex situ* de germoplasma, que permite mantener los recursos genéticos vegetales a largo plazo, de manera segura y rentable, con requisitos mínimos de espacio, y mantenimiento de rutina (42). Además, la crioconservación elimina la necesidad de una renovación regular de la colección, lo que reduce el riesgo de erosión genética causada por plagas, enfermedades, condiciones climáticas, contaminación y variaciones genéticas (43).

Se han realizado varios estudios en el campo de la crioconservación de café (30), utilizando diferentes métodos y tipos de explantes: ápices (44), embriones somáticos y callos embriogénicos (45-49), embriones cigóticos (50-53), semillas (47,50,54-58) y se han obtenido resultados diversos. La tendencia de las investigaciones se dirige, principalmente, hacia la crioconservación de semillas y embriones cigóticos, campo liderado en la actualidad por científicos brasileños.

Crioconservación de semillas

La evaluación de la calidad fisiológica de semillas de *C. arabica* crioconservadas por inmersión directa en nitrógeno líquido, posterior a su desecación rápida o lenta, ha sido objeto de estudio recientemente. Las semillas de los cultivares Arara, Catiguá, Catuaí Amarelo y Mundo Novo se sometieron a la desecación rápida con la utilización de sílica gel, y lenta con la utilización de una solución saturada de NaCl (75 % de humedad relativa), hasta que alcanzaron un contenido de humedad del 20 % (base seca) en ambas variantes. Se sumergieron en nitrógeno líquido durante 24 horas y luego se recalentaron en baño de María a 40 °C, durante dos minutos. La calidad fisiológica de las semillas después de la crioconservación se evaluó mediante pruebas de germinación, tetrazolio y pruebas de vigor. Se determinó que aun con diferentes niveles de tolerancia, las semillas de estos cultivares pueden ser sometidas a la crioconservación, siendo el Catuaí amarillo el más tolerante y Arara el más sensible, independientemente de la velocidad de desecación. El secado rápido en sílica gel hasta el 20 % del contenido de humedad, seguido de la inmersión directa en nitrógeno líquido, permite obtener mayores porcentajes de plántulas normales, hojas cotiledonares expandidas y masa seca y, por tanto, favorece la crioconservación de las semillas de café (59).

Otra investigación se propuso como objetivo determinar el contenido de agua, la velocidad de enfriamiento y la temperatura final más adecuada para la crioconservación de semillas de *C. arabica*. Estas se desecaron con sílica gel hasta contenidos de agua de 5, 10, 15, 20, 30 y 40 % (base húmeda), se sometieron a tratamientos de enfriamiento lento a velocidades de -1, -3 y -5 °C min⁻¹ a temperaturas

finales de -40 , -50 y -60 °C y luego se sumergieron directamente en nitrógeno líquido (NL). Después del almacenamiento, las semillas se volvieron a calentar a 40 °C durante dos minutos. La tasa de supervivencia y la viabilidad de las semillas y los embriones se evaluaron mediante las pruebas de tetrazolio y germinación. Los resultados de la prueba de tetrazolio indican que los embriones extraídos de semillas crioconservadas son menos sensibles a la crioconservación que las semillas enteras. En general, el contenido de agua de 20% y el uso de embriones cigóticos condujeron a la tasa de supervivencia más alta de las semillas de café, dependiendo de la velocidad de enfriamiento y la temperatura final de pre-enfriamiento ⁽⁶⁰⁾.

Para semillas de *C. canephora* desecadas en sílica gel hasta un contenido de agua de $0,25\text{ g g}^{-1}$, han sido utilizados tratamientos de enfriamiento lento idénticos a los citados anteriormente ⁽⁶⁰⁾. El mejor resultado de estos tratamientos fue comparado con el enfriamiento rápido, en el cual las semillas se sumergieron directamente en nitrógeno líquido y se evaluaron las alteraciones fisiológicas y bioquímicas que ocurren en estas después de la crioconservación. La desecación hasta $0,25\text{ g g}^{-1}$ del contenido de agua, no afecta la viabilidad de las semillas de *C. canephora* y estas responden mejor a la crioconservación, mediante un enfriamiento rápido, en comparación con el enfriamiento lento. Las enzimas catalasa y esterasa son buenos marcadores bioquímicos para las semillas de café crioconservadas y su actividad es mayor en las de mejor calidad fisiológica ⁽⁶¹⁾.

También se han investigado las condiciones físicas y fisiológicas ideales para la crioconservación de semillas de *C. canephora*, para reducir la mortalidad causada por la formación de cristales de hielo intracelulares y evitar el daño celular causado por la desecación excesiva. Las semillas se sometieron a desecación rápida en sílica gel, y lenta en solución saturada de NaCl hasta contenidos de humedad de $0,20$; $0,25$ y $0,28\text{ g g}^{-1}$ (base seca), seguida de inmersión directa en nitrógeno líquido para su congelación rápida. Se realizaron análisis fisiológicos y bioquímicos para evaluar la calidad de estos explantes antes y después de la crioconservación. El secado rápido a valores cercanos a $0,20\text{ g g}^{-1}$ no causa una reducción en la calidad fisiológica, mientras que el contenido de humedad de $0,25\text{ g g}^{-1}$ produce una mayor supervivencia de las semillas, después de la crioconservación. La velocidad de desecación afecta la calidad fisiológica luego de la crioconservación, puesto que el secado rápido en sílica gel es más favorable que el secado lento, en una solución saturada de NaCl. La actividad de las enzimas catalasa, esterasa, transaminasa oxaloacética glutámica y polifenol oxidasa representa un indicador de la calidad de semillas de *C. canephora* sometidas a crioconservación ⁽⁶²⁾.

Las semillas de café (*C. arabica*), han sido sometidas a diferentes tipos de desecación y almacenadas en cámara fría y en crioconservación, con el propósito de estudiar el desarrollo posterior de las plántulas. Las semillas se sometieron a cuatro tratamientos de desecación en un secador estacionario hasta que

alcanzaron el 12 % y el 32 % de humedad y en solución salina saturada y silica gel, hasta alcanzar el 17 % de humedad. Las que tenían 12 % y 32 % de humedad se almacenaron en una cámara fría y seca (a 10 °C y 45 % de humedad relativa) y las que tenían 17 % de humedad, en cámaras criogénicas (-196 °C), durante un período de seis meses, al cabo del cual se sembraron en bolsas de plástico en un vivero. Las plántulas de semillas desecadas en silica gel presentaron resultados de desarrollo vegetativo similares a los de las plántulas producidas a partir de semillas con 32 % de humedad y almacenadas durante seis meses. Se considera que el uso de semillas de *C. arabica* desecadas en silica gel y crioconservadas, constituye una alternativa viable para la producción de plántulas vigorosas ⁽⁶³⁾ y un método más simple que el resto de los ensayos en este estudio.

Crioconservación de embriones

Otros explantes utilizados con frecuencia para la crioconservación de recursos fitogenéticos de café, son los embriones cigóticos y somáticos. En el caso de *C. arabica* L. cv. Catuaí Vermelho IAC 144, se han probado diferentes tiempos de desecación en silica gel para los embriones cigóticos (0; 15; 30; 60; 120; 240 min) y los embriones somáticos (0; 60; 120 min). Aunque se obtuvo un elevado porcentaje de germinación (98 %) de los embriones cigóticos a los 120 min de desecación, solo el 41 % de las plántulas regeneradas fueron consideradas normales. En cambio, para los embriones somáticos resultó imposible aplicar el tratamiento de crioconservación, ya que no se obtuvo germinación debido a la sensibilidad de estos explantes a la deshidratación ⁽⁶⁴⁾.

El método de vitrificación también ha sido utilizado para desarrollar un protocolo de crioconservación de embriones cigóticos de *C. arabica* L. cv. "Catuaí Vermelho" - IAC 144. Para ello, los embriones se sumergieron en PVS 2 ⁽⁶⁵⁾ (Plant Vitrification Solution o Solución de Vitrificación de Plantas) (compuesta por 30 % de glicerol, 15 % de etilenglicol, 15 % de dimetilsulfóxido y 0,4 M de sacarosa, en medio MS líquido), en distintos momentos (0, 10, 25, 50, 100 y 250 min) y a dos temperaturas (0 y 25 °C). Para la descongelación se evaluaron diferentes tiempos en baño de María: 1, 3, 5 min o directamente en solución de recuperación. Se realizó un estudio anatómico en embriones almacenados con o sin el uso de PVS 2, y no almacenados. Se determinó que la inmersión en solución crioprotectora, durante 100 min a 0 °C permite la crioconservación de los embriones, que pueden ser descongelados directamente en la solución de recuperación después del almacenamiento en nitrógeno líquido. Se observó que PVS 2 redujo el contenido interno de agua en las células, lo que permitió la reanudación posterior del crecimiento de los embriones cigóticos ⁽⁶⁶⁾.

Investigadoras cubanas del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), en colaboración con científicos del Gosling Research Institute for Plant Preservation (GRIPP), perteneciente a la Universidad de Guelph en Canadá, determinaron la efectividad de dos métodos derivados de la vitrificación, en la crioconservación de

embriones cigóticos de *C. arabica*, con la utilización de PVS 3⁽⁶⁷⁾ (50 % glicerol + 50 % sacarosa p/v), con resultados promisorios para la conservación de recursos fitogenéticos de café por esta vía⁽⁶⁸⁾.

CONCLUSIONES

Lograr la complementariedad de los diferentes tipos de conservación: *in situ* (donde proceda) y *ex situ*, mediante la preservación en campo y la utilización de los métodos biotecnológicos de crecimiento mínimo y crioconservación, constituye un importante reto a vencer a nivel global en el futuro próximo, con vistas a la protección de los recursos fitogenéticos de café.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bramel P, Krishnan S, Horna D, Lainoff B, Montagnon C. Global conservation strategy for coffee genetic resources. Crop Trust and World Coffee Research [Internet]. 2017;72. Available from: https://worldcoffeeresearch.org/media/documents/Coffee_Strategy_Low_Res.pdf
2. International Coffee Organization - What's New [Internet]. [cited 2/11/2021]. Available from: <https://www.ico.org/>
3. Wellman FL. Coffee: botany, cultivation, and utilization. Coffee: Botany, Cultivation, and Utilization. [Internet]. 1961; Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19640305741>
4. Aguilar ME, Ortiz JL, Mesén F, Jiménez LD, Altmann F. Café Arabica *Coffea arabica* L. In: Jain SM, Gupta P, editores. Step Wise Protocols for Somatic Embryogenesis of Important Woody Plants: Volume II [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2018 [cited 2/11/2021]. p. 39-62. (Forestry Sciences). doi:10.1007/978-3-319-79087-9_3
5. International Coffee Organization - Historical Data on the Global Coffee Trade [Internet]. [cited 2/11/2021]. Available from: https://www.ico.org/new_historical.asp?section=Statistics
6. González Vega ME, Rosales Jenqui P, Castilla Valdés Y, Lacerra Espino JÁ, Ferrer Viva M. Efecto del Bioenraiz[®] como estimulante de la germinación y el desarrollo de plántulas de café (*Coffea arabica* L.). Cultivos Tropicales [Internet]. 2015;36(1):73-9. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362015000100009
7. Davis AP, Tosh J, Ruch N, Fay MF. Growing coffee: Psilanthus (Rubiaceae) subsumed on the basis of molecular and morphological data; implications for the size, morphology, distribution and evolutionary history of Coffea. Botanical Journal of the Linnean Society [Internet]. 2011;167(4):357-77. Available from: <https://academic.oup.com/botlinnean/article/167/4/357/2418595?login=true>

8. Davis AP, Bridson D, Rakotonasolo F, Keating RC, Hollowell VC, Croat T. A reexamination of *Coffea subgenus* Baracoffea and comments on the morphology and classification of *Coffea* and *Psilanthus* (Rubiaceae-Coffeae). *Monographs in Systematic Botany*. 2005;104:399.
9. Davis AP, Govaerts R, Bridson DM, Stoffelen P. An annotated taxonomic conspectus of the genus *Coffea* (Rubiaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* [Internet]. 2006;152(4):465-512. Available from: <https://academic.oup.com/botlinnean/article/152/4/465/2420564?login=true>
10. Silva M do C, Várzea V, Guerra-Guimarães L, Azinheira HG, Fernandez D, Petitot A-S, et al. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian journal of plant physiology* [Internet]. 2006;18(1):119-47. Available from: <https://www.scielo.br/j/bjpp/a/dTHqD9SqgdJtq9wHCf9Hp6R/abstract/?lang=en>
11. Hamon P, Grover CE, Davis AP, Rakotomalala J-J, Raharimalala NE, Albert VA, et al. Genotyping-by-sequencing provides the first well-resolved phylogeny for coffee (*Coffea*) and insights into the evolution of caffeine content in its species: GBS coffee phylogeny and the evolution of caffeine content. *Molecular phylogenetics and evolution* [Internet]. 2017;109:351-61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1055790317301288>
12. Cheney RH. *Coffee : a monograph of the economic species of the genus Coffea L.* [Internet]. New York : New York University Press,; 1925. 270 p. doi:10.5962/bhl.title.66317
13. The IUCN Red List of Threatened Species [Internet]. IUCN Red List of Threatened Species. [cited 2/11/2021]. Available from: <https://www.iucnredlist.org/en>
14. Davis AP, Chadburn H, Moat J, O'Sullivan R, Hargreaves S, Lughadha EN. High extinction risk for wild coffee species and implications for coffee sector sustainability. *Science Advances* [Internet]. 2019;5(1):eaav3473. Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/sciadv.aav3473>
15. Krishnan S. Current status of coffee genetic resources and implications for conservation. *CAB Reviews* [Internet]. 2013;8(16):1-9. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Sarada-Krishnan-3/publication/265160327_Current_status_of_coffee_genetic_resources_and_implications_for_conservation/links/540088710cf2bba34c1a36cc/Current-status-of-coffee-genetic-resources-and-implications-for-conservation.pdf
16. Labouisse J-P, Bellachew B, Kotecha S, Bertrand B. Current status of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources in Ethiopia: implications for conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* [Internet]. 2008;55(7):1079. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10722-008-9361-7>
17. Gole TW, Denich M, Teketay D, Vlek PLG. Human impacts on the *Coffea arabica* gene pool in Ethiopia and the need for its *in situ*. conservation? in JMM Engels, V. Ramanatha Rao, AHD Brown and MT Jackson (eds), *Managing Plant Genetic Diversity*. Rome: International Plant Genetic Resources

- Institute (IPGRI) [Internet]. 2002; Available from:
<https://www.cabi.org/cabebooks/ebook/20023003589>
18. Aerts R, Geeraert L, Berecha G, Hundera K, Muys B, De Kort H, et al. Conserving wild Arabica coffee: Emerging threats and opportunities. *Agriculture, Ecosystems & Environment* [Internet]. 2017;237:75-9. Available from:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167880916306053>
19. Moat J, Gole TW, Davis AP. Least Concern to Endangered: Applying climate change projections profoundly influences the extinction risk assessment for wild Arabica coffee. *Global change biology* [Internet]. 2019;25(2):390-403. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/gcb.14341>
20. Lilieholm RJ, Weatherly WP. Kibale forest wild coffee: challenges to market-based conservation in Africa. *Conservation Biology* [Internet]. 2010;24(4):924-30. Available from:
<https://conbio.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1523-1739.2010.01527.x>
21. Dulloo ME, Guarino L, Engelmann F, Maxted N, Newbury JH, Attore F, et al. Complementary conservation strategies for the genus *Coffea*: A case study of Mascarene *Coffea* species. *Genetic Resources and Crop Evolution* [Internet]. 1998;45(6):565-79. Available from:
https://www.researchgate.net/profile/Mohammad-Dulloo/publication/226464325_Complementary_conservation_strategies_for_the_genus_Coffea_A_case_study_of_Mascarene_Coffea_species/links/54e3b41c0cf2b2314f5e8e0d/Complementary-conservation-strategies-for-the-genus-Coffea-A-case-study-of-Mascarene-Coffea-species.pdf
22. Vega FE, Ebert AW, Ming R. Coffee germplasm resources, genomics, and breeding [Internet]. 2008. Available from: <https://worldveg.tind.io/record/22062/>
23. Anthony F, Dussert S, Dulloo E. Coffee genetic resources. Complementary strategies for ex situ conservation of coffee [Internet]. 2007;12-22. Available from:
<https://core.ac.uk/download/pdf/39840068.pdf#page=23>
24. Hong TD, Ellis RH. Optimum air-dry seed storage environments for arabica coffee. *Seed Science and Technology* [Internet]. 1992;20(3):547-60. Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=CAFE.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=005738>
25. Eira MT, Silva EA, De Castro RD, Dussert S, Walters C, Bewley JD, et al. Coffee seed physiology. *Brazilian Journal of Plant Physiology* [Internet]. 2006;18(1):149-63. Available from:
<https://www.scielo.br/j/bjpp/a/zZgRS3Mbwg8KjW8R9bn9X3L/?lang=en>
26. Aleman E, Aguiler C, Olmedo J, Vega M, Boix Y, Dubois A. Effect of electromagnetic field on mineral content and chemical group during in vitro establishment and multiplication phases of coffee

- seedling. Rev. Cubana Quim [Internet]. 2016;28(2):692-702. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S2224-54212016000200012&script=sci_abstract&tlng=en
27. García-Águila L, de Feria M, Acosta K. Aspectos básicos de la conservación *in vitro* de germoplasma vegetal. Biotecnología Vegetal [Internet]. 2007;7(2). Available from: <https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/359>
28. González-Arno MT, Dolce N, González-Benito ME, Martínez CRC, Cruz-Cruz CA. Approaches for *in vitro* conservation of woody plants germplasm. In: Biodiversity and Conservation of Woody Plants [Internet]. Springer; 2017. p. 355-419. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-66426-2_13
29. Morales MMB. Conservación *in vitro*: una perspectiva para el manejo de los Recursos Fitogenéticos. Revista de Investigación Agraria y Ambiental [Internet]. 2015;6(1):67-82. Available from: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/riaa/article/view/1264>
30. Castilla Valdés Y. Conservación de recursos fitogenéticos de cafeto (*Coffea* spp.) por métodos biotecnológicos: una alternativa para su preservación. Cultivos Tropicales [Internet]. 2012;33(4):29-39. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0258-59362012000400004&script=sci_arttext&tlng=pt
31. Jouve L, Engelmann F, Charrier A. Effets de l'hypoxie et de la temperature sur la conservation *in vitro* de pousses feuillées de *Coffea arabica* L. Café, Cacao, Thé (France) v. 35 (3) p. 205-210 [Internet]. 1991; Available from: https://www.researchgate.net/profile/Jouve-Laurent/publication/32979019_Effets_de_l'hypoxie_et_de_la_temperature_sur_la_conservation_in_vitro_de_pousses_feuillees_de_Coffea_arabica_L/links/02e7e51c0146eab293000000/Effets-de-lhypoxie-et-de-la-temperature-sur-la-conservation-in-vitro-de-pousses-feuillees-de-Coffea-arabica-L.pdf
32. Nassar AH. Slow growth storage of encapsulated germplasm of *Coffea arabica* L. Int J Agric Biol [Internet]. 2003;5:517-20. Available from: http://www.fspublishers.org/published_papers/68819_...pdf
33. Bertrand-Desbrunais A, Noirot M, Charrier A. Slow growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture [Internet]. 1992;31(2):105-10. Available from: https://www.researchgate.net/publication/226595441_Slow_growth_in_vitro_conservation_of_coffee_Coffea_spp
34. Jouve L, Engelmann F, Noirot M, Charrier A. Evaluation of biochemical markers (sugar, proline, malonaldehyde and ethylene) for cold sensitivity in microcuttings of two coffee species. Plant Science [Internet]. 1993;91(1):109-16. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0168945293901945>
35. González ME, Castilla Y, Hernández MM, Hernández A. Factibilidad del cultivo *in vitro* en la conservación de recursos fitogenéticos de cafeto. Revista Agrotecnia de Cuba [Internet]. 2007;31:4-7. Available from: <https://www.grupoagricoladecuba.gag.cu/media/Agrotecnia/pdf/2007/Revista2/19.pdf>

36. Kartha KK, Mroginski LA, Pahl K, Leung NL. Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by in vitro culture of shoot apical meristems. Plant Science Letters [Internet]. 1981;22(4):301-7. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0304421181900754>
37. Bertrand-Desbrunais A, Noirot M, Charrier A. Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture [Internet]. 1991;27(3):333-9. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Andre-Charrier/publication/225984801_Minimal_growth_in_vitro_conservation_of_coffee_Coffea_spp/links/541a9e030cf203f155ae3e10/Minimal-growth-in-vitro-conservation-of-coffee-Coffea-spp.pdf
38. Naidu MM, Sreenath HL. *In vitro* culture of coffee zygotic embryos for germplasm preservation. Plant cell, tissue and organ culture [Internet]. 1998;55(3):227-30. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1023/A:1006194405702>
39. Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia plantarum [Internet]. 1962;15(3):473-97. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
40. Sangeetha N, Sankar R, Mercy S, Kumari AHS, Kavitha M, Ganesh D. *In vitro* conservation of zygotic embryos of *Coffea arabica* L. Journal of Plantation Crops [Internet]. 2010;38(1):82-6. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20113073585>
41. Castilla-Valdés Y, González-Vega ME, Espinosa-Torres L. Conservación *in vitro* de cafeto (*Coffea arabica* L.) mediante la disminución de sales minerales en el medio de cultivo. Cultivos Tropicales [Internet]. 2020;41(1). Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362020000100004
42. González-Arno MT, Engelmann F. Consideraciones teóricas y prácticas para la crioconservación de germoplasma vegetal. en América Latina y el Caribe [Internet]. 2013;37. Available from: https://www.researchgate.net/profile/Maria-Gonzalez-Arno/publication/280638888_Consideraciones_teoricas_y_practicas_para_la_crioconservacion_de_germoplasma_vegetal/links/5613f6ac08ae4ce3cc636447/Consideraciones-teoricas-y-practicas-para-la-crioconservacion-de-germoplasma-vegetal.pdf
43. Popova E, Shukla M, Kim HH, Saxena PK. Plant cryopreservation for biotechnology and breeding. In: Advances in plant breeding strategies: breeding, biotechnology and molecular Tools [Internet]. Springer; 2015. p. 63-93. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-22521-0_3
44. Mari S, Engelmann F, Chabrillange N, Huet C, Michaux-Ferrière N. Histo-cytological study of apices of coffee (*Coffea racemosa* and *C. sessiliflora*) in vitro plantlets during their cryopreservation

using the encapsulation-dehydration technique Coffee genetic resources and breeding: recent scientific papers [Internet]. ORSTOM, Montpellier (Francia). Laboratoire de Ressources Génétiques et ...; 1994. Available from: <https://iifir.org/en/fridoc/histo-cytological-study-of-apices-of-coffee-coffea-racemosa-and-c-104173>

45. Bertrand-Desbrunais A, Fabre J, Engelmann F, Dereuddre J, Charrier A. Reprise de l'embryogenèse adventive à partir d'embryons somatiques de caféier (*Coffea arabica* L.) après leur congélation dans l'azote liquide. Bulletin de la Société Botanique de France. Actualités Botaniques [Internet]. 1989;136(3-4):195-195. Available from: https://www.researchgate.net/profile/F-Engelmann/publication/32983244_Reprise_de_l'embryogenese_adventive_a_partir_d'embryons_somatiques_de_cafeier_Coffea_arabica_L_apres_leur_congelation_dans_l'azote_liquide/links/55e436b808ae2fac47215327/Reprise-de-lembr-yogenese-adventive-a-partir-dembryons-somatiques-de-cafeier-Coffea-arabica-L-apres-leur-congelation-dans-lazote-liquide.pdf

46. Mycock DJ, Wesley-Smith J, Berjak P. Cryopreservation of somatic embryos of four species with and without cryoprotectant pre-treatment. Annals of Botany [Internet]. 1995;75(4):331-6. Available from: <https://academic.oup.com/aob/article-abstract/75/4/331/166928>

47. Martínez M, González-Arno MT, Urra C, Rojas R, Cuba M. Estudios preliminares sobre la crioconservación de callos embriogénicos y semilla botánica de *Coffea arabica* variedad 9722. Cultivos Tropicales [Internet]. 1995;16(3):74-6. Available from: <https://ftp.inca.edu.cu/revista/1995/3/CT16317.pdf>

48. Tessereau H, Florin B, Meschine MC, Thierry C, Pétiard V. Cryopreservation of somatic embryos: a tool for germplasm storage and commercial delivery of selected plants. Annals of Botany [Internet]. 1994;74(5):547-55. Available from: <https://academic.oup.com/aob/article-abstract/74/5/547/2587365>

49. Hatanaka T, Yasuda T, Yamaguchi T, Sakai A. Direct regrowth of encapsulated somatic embryos of coffee (*Coffea canephora*) after cooling in liquid nitrogen. Cryo-Letters (RU) v. 15 (1) p. 47-52 [Internet]. 1994; Available from: <https://iifir.org/en/fridoc/direct-regrowth-of-encapsulated-somatic-embryos-of-coffee-coffea-98610>

50. Normah MN, Vengadasalam M. Effects of moisture content on cryopreservation of Coffea and Vigna seeds and embryos. Cryo Letters (Suiza) v. 13 (3) p. 199-208 [Internet]. 1992; Available from: [http://www.sidalc.net/cgi-](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=045366)

[bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=045366](http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=045366)

51. Abdelnour-Esquivel A, Villalobos V, Engelmann F. Cryopreservation of zygotic embryos of Coffea spp. CryoLetters [Internet]. 1992;13(5):297-302. Available from: <https://core.ac.uk/download/pdf/39860212.pdf>

52. Martínez M, González-Arno MT, Urra C, Rojas R, Cuba M. Estudios preliminares para la crioconservación de embriones cigóticos de *Coffea arabica* variedad 9722. Comunicación corta.

- Cultivos Tropicales (Cuba) v. 17 (1) p. 79-81 [Internet]. 1996; Available from: <http://www.sidalc.net/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=orton.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mn=047171>
53. Castilla Y, Dussert S, González ME, Engelmann F. Crioconservación de embriones cigóticos de *Coffea canephora* mediante vitrificación: primeras aproximaciones. In: Memorias del VIII Congreso Internacional de Biotecnología Vegetal, Bioveg [Internet]. 2011. Available from: https://www.researchgate.net/publication/282769616_Crioconservacion_de_embryones_cigoticos_de_Coffea_canephora_mediante_vitrificacion_primeras_aproximaciones
54. Becwar MR, Stanwood PC, Leonhardt KW. Dehydration effects on freezing characteristics and survival in liquid nitrogen of desiccation-tolerant and desiccation-sensitive seeds. Journal of the American Society for Horticultural Science [Internet]. 1983;108(4):613-8. Available from: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19830317155>
55. Dussert S, Chabrillange N, Engelmann F, Anthony F, Hamon S. Cryopreservation of coffee (*Coffea arabica* L) seeds: importance of the precooling temperature. Cryo-Letters [Internet]. 1997;18(5):269-76. Available from: https://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_6/b_fdi_47-48/010011490.pdf
56. Dussert S, Chabrillange N, Vasquer N, Engelmann F, Anthony F, Guyot A, et al. Beneficial effect of post-thawing osmoconditioning on the recovery of cryopreserved coffee (*Coffea arabica* L.) seeds. Cryo letters [Internet]. 2000;21(1):47-52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12148064/>
57. Vasquez N, Salazar K, Anthony F, Chabrillange N, Engelmann F, Dussert S. Variability in response of seeds to liquid nitrogen exposure in wild coffee (*Coffea arabica* L.). Seed Science and Technology [Internet]. 2005;33(2):293-301. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ista/sst/2005/00000033/00000002/art00003>
58. Dussert S, Chabrillange N, Rocquelin G, Engelmann F, Lopez M, Hamon S. Tolerance of coffee (*Coffea* spp.) seeds to ultra-low temperature exposure in relation to calorimetric properties of tissue water, lipid composition, and cooling procedure. Physiologia Plantarum [Internet]. 2001;112(4):495-504. doi:10.1034/j.1399-3054.2001.1120406.x
59. Coelho SVB, Rosa S, Fernandes JS. Cryopreservation of coffee seeds: A simplified method. Seed Science and Technology [Internet]. 2017;45(3):638-49. Available from: <https://www.ingentaconnect.com/content/ista/sst/2017/00000045/00000003/art00010>
60. Figueiredo MA de, Coelho SVB, Rosa SDVF da, Vilela AL, Silva LC. Exploratory studies for cryopreservation of *Coffea arabica* L. seeds. Journal of Seed Science [Internet]. 2017;39:150-8.

- Available from: <https://www.scielo.br/j/jss/a/XYFbP89j9D8GmNXdgMMFL3J/?lang=en&format=html>
61. Coelho SVB, Rosa SDVF da, Fantazzini TB, Baute JL, Silva LC. Cryopreservation in *Coffea canephora* Pierre seeds: Slow and fast cooling. *Ciência e Agrotecnologia* [Internet]. 2018;42(6):588-97. Available from: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/QSbWQWb4J4mvHQT6vSp9NPD/abstract/?lang=en>
62. Coelho SVB, Sttelada Rosa DVF, Fantazzini TB, Silva LC. Cryopreservation of *Coffea canephora* Pierre ex A. Froehner seeds: importance of drying rate and moisture content. *Australian Journal of Crop Science* [Internet]. 2019;13(8):1335-42. Available from: <https://search.informit.org/doi/abs/10.3316/informit.755572688870935>
63. Ricaldoni MA, Rosa SDVF da, Figueiredo MA de, Carvalho MA de F, Fantazzini TB. Avaliação de parâmetros de desenvolvimento de mudas de *Coffea arabica* L. originadas de sementes criopreservadas. 2019; Available from: <http://tot.dti.ufv.br/handle/123456789/12611>
64. Pinto M de S, Paiva R, Silva DPC da, Santos PAA, Freitas RT de, Silva LC. Cryopreservation of coffee zygotic embryos: dehydration and osmotic rehydration. *Ciência e Agrotecnologia* [Internet]. 2016;40:380-9. Available from: <https://www.scielo.br/j/cagro/a/XD48FV5D7xrSfXmt34kNMxj/abstract/?lang=en>
65. Sakai A, Kobayashi S, Oiyama I. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb. var. *brasiliensis* Tanaka) by vitrification. *Plant Cell Reports* [Internet]. 1990;9(1):30-3. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00232130>
66. de FREITAS RT, Paiva R, Sales TS, da SILVA DPC, de SOUZA AC. Cryopreservation of *Coffea arabica* L. zygotic embryos by vitrification. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* [Internet]. 2016;44(2):445-51. Available from: <https://www.notulaeobotanicae.ro/index.php/nbha/article/view/10553>
67. Nishizawa S, Sakai A, Amano Y, Matsuzawa T. Cryopreservation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) embryogenic suspension cells and subsequent plant regeneration by vitrification. *Plant Science* [Internet]. 1993;91(1):67-73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0168945293901897>
68. Valdés YC, Shukla MR, Vega MEG, Saxena PK. Improved Conservation of Coffee (*Coffea arabica* L.) Germplasm via Micropropagation and Cryopreservation. *Agronomy* [Internet]. 2021;11(9):1861. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4395/11/9/1861>