

Physiological response of seeds of three coffee varieties to gamma rays (^{60}Co)

Respuesta fisiológica de semillas de tres variedades de café a rayos gamma (^{60}Co)

José L. Spinoso-Castillo¹; Esteban Escamilla-Prado²; Víctor H. Aguilar-Rincón¹; Victorino Morales-Ramos³; Gabino García-de los Santos¹; Tarsicio Corona-Torres^{1*}

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México, C. P. 56230, MÉXICO.

²Universidad Autónoma Chapingo, Centro Regional Universitario Oriente. Carretera Huatusco-Xalapa km 6, Huatusco, Veracruz, C. P. 94100, MÉXICO.

³Colegio de Postgraduados, Campus Córdoba. Carretera Córdoba-Veracruz km 348, Amatlán de los Reyes, Veracruz, C. P. 94946, MÉXICO.

*Corresponding author: tcoronat@gmail.com, tel. 595 957 53 75.

Abstract

Coffea arabica L. faces serious disease susceptibility problems, favored by the low genetic variability of its commercial cultivars; therefore, it is important to study different sources of variation that are useful in genetic improvement. The objective of this study was to irradiate *C. arabica* seeds of the Geisha, Oro Azteca and Marseillaise varieties with gamma rays to determine the median lethal dose (LD_{50}) and evaluate their physiological response in terms of germination, survival, plant height (PH), stem diameter (SD), height to first leaf pair (HFLP) and leaf area (LA). The Transelektro LGI-01 irradiator was used, with a dose rate of $752.76 \text{ Gy}\cdot\text{h}^{-1}$. The irradiation doses evaluated were 0, 100, 200, 300, 400 and 500 Gy. The experiment was established under a completely randomized factorial design with two factors (variety, with three levels, and irradiation dose, with six levels) and three replicates (225 seeds per replicate). The germination record was made 20 days after sowing. The remaining variables were evaluated 120 days after sowing. The results showed that germination, survival, PH, HFLP, SD and LA were significantly negatively affected by gamma irradiation from the 200 Gy dose in all three varieties. The LD_{50} was 70 Gy for the Geisha variety, 85 Gy for Marsellesa and 90 Gy for Oro Azteca. Doses lower than 100 Gy can be used in breeding programs for *C. arabica*.

Keywords: *Coffea arabica* L., median lethal dose (LD_{50}), physical mutagenesis, ionizing energy, plant breeding.

Resumen

Coffea arabica L. enfrenta serios problemas de susceptibilidad a enfermedades, favorecidos por la poca variabilidad genética de sus cultivares comerciales; por ello, es importante estudiar diferentes fuentes de variación que sean útiles en el mejoramiento genético. El objetivo de este estudio fue irradiar con rayos gamma semillas de *C. arabica* de las variedades Geisha, Oro Azteca y Marsellesa para determinar la dosis letal media (DL_{50}) y evaluar su respuesta fisiológica sobre la germinación, supervivencia, altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT), altura al primer par de hojas (APPH) y área foliar (AF). Se utilizó el irradiador Transelektro LGI-01, con una razón de dosis de $752.76 \text{ Gy}\cdot\text{h}^{-1}$. Las dosis de irradiación evaluadas fueron 0, 100, 200, 300, 400 y 500 Gy. El experimento se estableció bajo un diseño factorial completamente al azar con dos factores (variedad, con tres niveles, y dosis de irradiación, con seis niveles) y tres repeticiones (225 semillas por repetición). El registro de la germinación se hizo a los 20 días después de la siembra. Las variables restantes se evaluaron 120 días después de la siembra. Los resultados mostraron que la germinación, supervivencia, AP, APPH, DT y AF se vieron significativamente afectados de forma negativa por la irradiación gamma a partir de la dosis de 200 Gy en las tres variedades. La DL_{50} fue de 70 Gy para la variedad Geisha, 85 Gy para Marsellesa y 90 Gy para Oro Azteca. Dosis menores a 100 Gy se pueden emplear en programas de fitomejoramiento para *C. arabica*.

Palabras clave: *Coffea arabica* L., dosis letal media (DL_{50}), mutagénesis física, energía ionizante, fitomejoramiento.

Please cite this article as follows (APA 6): Spinoso-Castillo, J. L., Escamilla-Prado, E., Aguilar-Rincón, V. H., Morales-Ramos, V., García-de los Santos, G., & Corona-Torres, T. (2021). Physiological response of seeds of three coffee varieties to gamma rays (^{60}Co). *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 27(2), 101-112. doi: 10.5154/r.rchsh.2020.07.019



Revista Chapingo
Serie Horticultura

Introduction

Coffee is an important crop, and its world production is based on only two species: *Coffea canephora* P. (robusta) and *Coffea arabica* L. (arabica), of which *C. arabica* is the dominant species because of the volume of global production it represents (63 %) and because it is associated with better quality coffee. World production in 2017 and 2018 was approximately 164,810 60-kg bags, where arabica had a 2.2 % increase in production, and robusta, 11.7 % (International Coffee Organization [ICO], 2019).

C. arabica is an allotetraploid ($2n = 4x = 44$) and autogamous species, which was derived from a spontaneous hybridization between two closely related diploid species: *Coffea eugenioides* S. Moore (Yuyama et al., 2016) and *C. canephora* (Lashermes et al., 1999). *C. canephora* ($2n = 2x = 22$) is a diploid and alogamous species harboring high diversity (Musoli et al., 2009). The propagation history of *C. arabica*, combined with its autogamy, has led to narrow genetic diversity within cultivars (Steiger et al., 2002). Likewise, coffee production is limited by several diseases and pests, drought, heat stress, salinity, and climate change (Breitler et al., 2018; dos Santos et al., 2011; Silva et al., 2006). As a result, *C. arabica* breeding programs are focused on overcoming these obstacles with the use of divergent and wild cultivars, but are limited by the wide time ranges required (Sant'Ana et al., 2018; Tran, Ramaraj, Furtado, Slade, & Henry, 2018).

In this context, new methods that generate variability and reduce the development time of new cultivars are required to address the challenges presented by climate change to coffee cultivation. These methods include the use of traditional breeding schemes, genetic engineering, and induced mutations (Dada et al., 2018). Gamma-ray-induced mutation is one of the potentially useful applications in agriculture (Majeed, Muhammad, Ullah, & Ali, 2018). Gamma radiation from radioactive cobalt (^{60}Co) has high penetrating potential; however, it can be used to irradiate whole plants and their sensitive parts (Oladosu et al., 2016).

In economically important crops (*Oryza sativa*, *Zea mays* L., *Solanum tuberosum* and *Phaseolus vulgaris* L.), Singh and Datta (2010) note that one of the important physical agents is gamma radiation, which is used to improve agronomic traits and productivity. In these cases, seeds are commonly used to generate mutations because they can tolerate this physical condition (Amir et al., 2018). Kiong, Ling, Lai, Hussein, and Harun (2008) observed that seed germination rate depends on the level of chromosomal damage caused by increasing irradiation doses.

Introducción

El café es un cultivo importante, y su producción mundial se sustenta en solo dos especies: *Coffea canephora* P. (robusta) y *Coffea arabica* L. (arabica), de las cuales *C. arabica* es la especie dominante por el volumen de producción global que representa (63 %) y porque se asocia con café de mejor calidad. La producción mundial en 2017 y 2018 fue de aproximadamente 164.81 M de sacos de 60 kg de capacidad, en donde arabica tuvo un aumento en su producción de 2.2 %, y robusta, un 11.7 % (International Coffee Organization [ICO], 2019).

C. arabica es una especie alotetraploide ($2n = 4x = 44$) y autógena, que se derivó de una hibridación espontánea entre dos especies diploides estrechamente relacionadas: *Coffea eugenioides* S. Moore (Yuyama et al., 2016) y *C. canephora* (Lashermes et al., 1999). *C. canephora* ($2n = 2x = 22$) es una especie diploide y alógama que alberga una gran diversidad (Musoli et al., 2009). El historial de propagación de *C. arabica*, combinado con su autogamia, ha llevado a una estrecha diversidad genética entre cultivares (Steiger et al., 2002). Asimismo, la producción de café está limitada por varias enfermedades y plagas, sequía, estrés por calor, salinidad y cambio climático (Breitler et al., 2018; dos Santos et al., 2011; Silva et al., 2006). Como consecuencia, los programas de fitomejoramiento de *C. arabica* están enfocados en superar estos obstáculos con el uso de cultivares divergentes y silvestres, pero tienen como limitante los amplios rangos de tiempo requeridos (Sant'Ana et al., 2018; Tran, Ramaraj, Furtado, Slade, & Henry, 2018).

En este contexto, se requieren nuevos métodos que generen variabilidad y que reduzcan el tiempo de desarrollo de nuevos cultivares para abordar los desafíos que presenta el cambio climático al cultivo de café. Dichos métodos incluyen el uso de esquemas tradicionales de fitomejoramiento, ingeniería genética y mutaciones inducidas (Dada et al., 2018). La mutación inducida con rayos gamma es una de las aplicaciones potencialmente útil en la agricultura (Majeed, Muhammad, Ullah, & Ali, 2018). La irradiación gamma del cobalto radioactivo (^{60}Co) tiene un alto potencial de penetración; sin embargo, puede ser utilizada para irradiar plantas enteras y partes sensibles (Oladosu et al., 2016).

En cultivos económicamente importantes (*Oryza sativa*, *Zea mays* L., *Solanum tuberosum* y *Phaseolus vulgaris* L.), Singh y Datta (2010) mencionan que uno de los agentes físicos importantes es la radiación gamma, lo cual se utiliza para mejorar caracteres agronómicos y la productividad. En estos casos, se usan comúnmente las

Although mutation induction techniques for plant breeding are successfully applied in a wide range of crops, their use is less frequent in coffee (Dada et al., 2018). Therefore, the objective of this study was to irradiate *C. arabica* seeds of the Geisha, Oro Azteca and Marsellesa varieties with gamma rays to determine the median lethal dose (LD_{50}) and evaluate their physiological response in terms of germination, survival, plant height (PH), stem diameter (SD), height to first leaf pair (HFLP) and leaf area (LA).

Materials and methods

Plant material, experiment location and experimental design

Seeds of three *C. arabica* varieties (Geisha, Oro Azteca and Marsellesa) were obtained from the National Coffee Germplasm Bank operated by the Universidad Autónoma Chapingo's (UACH) Centro Regional Universitario Oriente (CRUO), located in Huatusco, Veracruz, Mexico ($19^{\circ} 10' 27''$ N and $96^{\circ} 57' 50''$ W, at 1,345 m a. s. l.). Seed irradiation was performed at the Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) located in Salazar, State of Mexico, Mexico. The irradiator used was the Transelektro LGI-01, with a dose rate of $752.76 \text{ Gy}\cdot\text{h}^{-1}$. The ^{60}Co gamma ray doses used were 0, 100, 200, 300, 400 and 500 Gy, on 700 seeds of each variety harvested in the 2017-2018 cycle, which had 10 % moisture. The control seeds of each genetic material were not irradiated.

The irradiated seeds were established in a glass-covered greenhouse with a steel structure and lateral ventilation on May 15 and 16, 2018, in Montecillo, Texcoco, State of Mexico. The average temperature was 29.0°C and relative humidity was 27.10 %. The seeds were sown manually in wooden beds ($1.5 \times 3 \times .25$ m) with soil. Furrows were established at distances of 5 cm between rows and 1.5 cm between seeds. The beds were checked regularly for water requirements.

The experiment was established according to a completely randomized factorial design with two factors (variety, with three levels, and irradiation dose, with six levels), resulting in 18 treatments with three replicates (225 seeds per replicate).

Evaluated parameters

To determine the effect of the treatments, the variables evaluated were: germination (%), survival (%) and morphological variables of each variety. Data recording for germination was carried out 20 days after sowing (das). Survival and the rest of the variables were determined at 120 das. For the morphological variables, 10 plants were randomly selected per experimental

semillas para generar mutaciones debido a que pueden tolerar esta condición física (Amir et al., 2018). Kiong, Ling, Lai, Hussein, y Harun (2008) observaron que la tasa de germinación de las semillas depende del nivel de daño cromosómico causado por el aumento de las dosis de irradiación.

Aunque las técnicas de inducción de mutaciones para fitomejoramiento se aplican con éxito en una amplia gama de cultivos, su uso es menos frecuente en café (Dada et al., 2018). Por ello, el objetivo de este estudio fue irradiar con rayos gamma semillas de *C. arabica* de las variedades Geisha, Oro Azteca y Marsellesa, para determinar la dosis letal media (DL_{50}) y evaluar su respuesta fisiológica sobre la germinación, supervivencia, altura de planta (AP), diámetro de tallo (DT), altura al primer par de hojas (APPH) y área foliar (AF).

Materiales y métodos

Material vegetal, ubicación del experimento y diseño experimental

Se utilizaron semillas de tres variedades de *C. arabica* (Geisha, Oro Azteca y Marsellesa), las cuales se obtuvieron del Banco Nacional de Germoplasma de Café de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en el Centro Regional Universitario Oriente (CRUO), ubicado en Huatusco, Veracruz, México ($19^{\circ} 10' 27''$ latitud norte y $96^{\circ} 57' 50''$ longitud oeste, a 1,345 m s. n. m.). La irradiación de la semilla se realizó en el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ) ubicado en Salazar, Estado de México, México. El irradiator utilizado fue el Transelektro LGI-01, con una razón de dosis de $752.76 \text{ Gy}\cdot\text{h}^{-1}$. Las dosis de rayos gamma de ^{60}Co empleadas fueron 0, 100, 200, 300, 400 y 500 Gy, sobre 700 semillas de cada variedad cosechadas en el ciclo 2017-2018, las cuales presentaban una humedad de 10 %. Las semillas testigo de cada material genético no se irradiaron.

Las semillas irradiadas se establecieron en un invernadero con cubierta de vidrio y estructura de acero con ventilación lateral los días 15 y 16 de mayo de 2018, en Montecillo, Texcoco, Estado de México. La temperatura promedio fue de 29.0°C y la humedad relativa de 27.10 %. La siembra de las semillas se realizó de forma manual en camas de madera ($1.5 \times 3 \times .25$ m) con tierra. Se trazaron surcos a distancias de 5 cm entre líneas y 1.5 cm entre semillas. Las camas se revisaron regularmente por requerimientos hídricos.

El experimento se estableció conforme a un diseño factorial completamente al azar con dos factores (variedad, con tres niveles, y dosis de irradiación, con seis niveles), lo cual resultó en 18 tratamientos con tres repeticiones (225 semillas por repetición).

unit, in which PH (cm), HFLP (cm), SD (mm; at 1 cm distance between the base of the root and the first leaf of the plant) and LA (cm²; with the ImageJ program) were measured.

Statistical analysis

The statistical model used was $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$; where Y_{ijk} is the value of the response variable corresponding to replicate k of level i of A (variety) to level j of B (dose [Gy]), μ is the overall mean, A_i is the effect of level i of A , B_j is the effect of level j of B , AB_{ij} is the $A \times B$ interaction (corresponding to level i of A and level j of B) and ε_{ijk} is the experimental error corresponding to replicate k of level i of A to level j of B . Using SAS version 9.4 statistical software (SAS Institute, 2002), an analysis of variance was performed for each variable and treatment means were compared using Tukey's test ($P \leq 0.05$). The data obtained from the survival percentage were used to determine the median lethal dose (LD₅₀) of each variety, which was estimated using a simple linear regression model.

Results and discussion

Germination and plant survival percentage

The three varieties showed a negative effect on germination starting at the 100 Gy dose (Figure 1). A 60 % decrease in germination was observed for the Geisha variety with respect to its control, as well as a significant decrease starting at doses of 200 and 400 Gy for the Oro Azteca and Marsellesa varieties, respectively. These results agree with those reported by Quintana et al. (2019), who observed a drastic decrease in the germination of Tipica variety coffee seeds at doses of 100 and 150 Gy. In other species, Kumar, Nepolean, and Gopalan (2003) showed that *Phaseolus lunatus* seed germination decreased with increasing gamma irradiation in a range of 200-1,000 Gy. Cheema and Atta (2003) showed that the seed germination of three different varieties of *Oryza sativa* decreased with an increasing irradiation dose. Therefore, exposure to high doses of gamma radiation often inhibits the germination of gymnosperm and angiosperm seeds (Thapa, 2004).

The survival percentage was significantly affected ($P \leq 0.05$) by the gamma radiation (Figure 2). There was a significant decrease starting at the 100 Gy dose in all three varieties compared to their respective controls. A similar trend was described by Ramírez, González, Camejo, Zaldívar, and Fernández (2006), who observed that doses higher than 200 Gy decreased the survival percentage of *S. lycopersicum* L. seedlings. These authors observed that, although radicle emission and cotyledon emergence occurred

Parámetros evaluados

Para determinar el efecto de los tratamientos, las variables evaluadas fueron: germinación (%), supervivencia (%) y variables morfológicas de cada variedad. El registro de datos para la germinación se realizó a los 20 días después de la siembra (dds). La supervivencia y el resto de las variables se determinaron a los 120 dds. Para las variables morfológicas, se seleccionaron 10 plantas al azar por unidad experimental, en las cuales se midió AP (cm), APPH (cm), DT (mm; a 1 cm de distancia entre la base de la raíz y la primera hoja de la planta) y AF (cm²; con el programa ImageJ).

Análisis estadístico

El modelo estadístico empleado fue $Y_{ijk} = \mu + A_i + B_j + AB_{ij} + \varepsilon_{ijk}$; donde Y_{ijk} es el valor de la variable respuesta correspondiente a la repetición k del nivel i de A (variedad) al nivel j de B (dosis [Gy]), μ es la media general, A_i es el efecto del nivel i de A , B_j es el efecto del nivel j de B , AB_{ij} es la interacción $A \times B$ (correspondiente al nivel i de A y nivel j de B) y ε_{ijk} es el error experimental correspondiente a la repetición k del nivel i de A al nivel j de B . Mediante el paquete estadístico SAS versión 9.4 (SAS Institute, 2002), se realizó un análisis de varianza para cada variable y la comparación de medias de los tratamientos mediante la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$). Los datos obtenidos del porcentaje de supervivencia se utilizaron para determinar la dosis letal media (DL₅₀) de las variedades, la cual se estimó mediante un modelo de regresión lineal simple.

Resultados y discusión

Porcentaje de germinación y supervivencia de las plantas

Las tres variedades mostraron un efecto negativo en la germinación a partir de la dosis de 100 Gy (Figura 1). Se observó un decremento de 60 % en la germinación de la variedad Geisha con respecto a su testigo, así como una disminución significativa a partir de las dosis de 200 y 400 Gy para las variedades Oro Azteca y Marsellesa, respectivamente. Estos resultados concuerdan con los reportados por Quintana et al. (2019), quienes observaron una disminución drástica en la germinación de semillas de café variedad Típica con las dosis de 100 y 150 Gy. En otras especies, Kumar, Nepolean, y Gopalan (2003) demostraron que la germinación de semillas de *Phaseolus lunatus* disminuyó con el aumento de la irradiación gamma en un rango de 200-1,000 Gy. Cheema y Atta (2003) demostraron que la germinación de semillas de tres variedades diferentes de *Oryza sativa* redujo con el aumento de la dosis de irradiación. Por lo tanto, la exposición a dosis altas de radiación

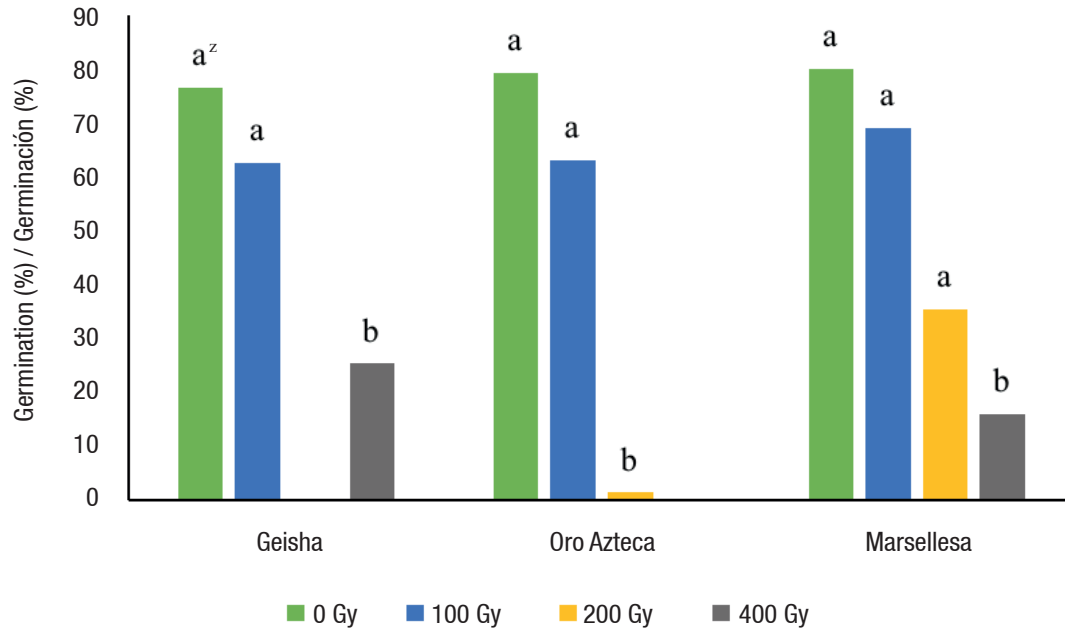


Figure 1. Effect of gamma radiation (⁶⁰Co) on the germination percentage of the Geisha, Oro Azteca and Marsellesa varieties of *C. arabica*. ^zBars with the same letter do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 1. Efecto de la radiación gamma (⁶⁰Co) sobre el porcentaje de germinación de las variedades Geisha, Oro Azteca y Marsellesa de *C. arabica*. ^zBarras con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

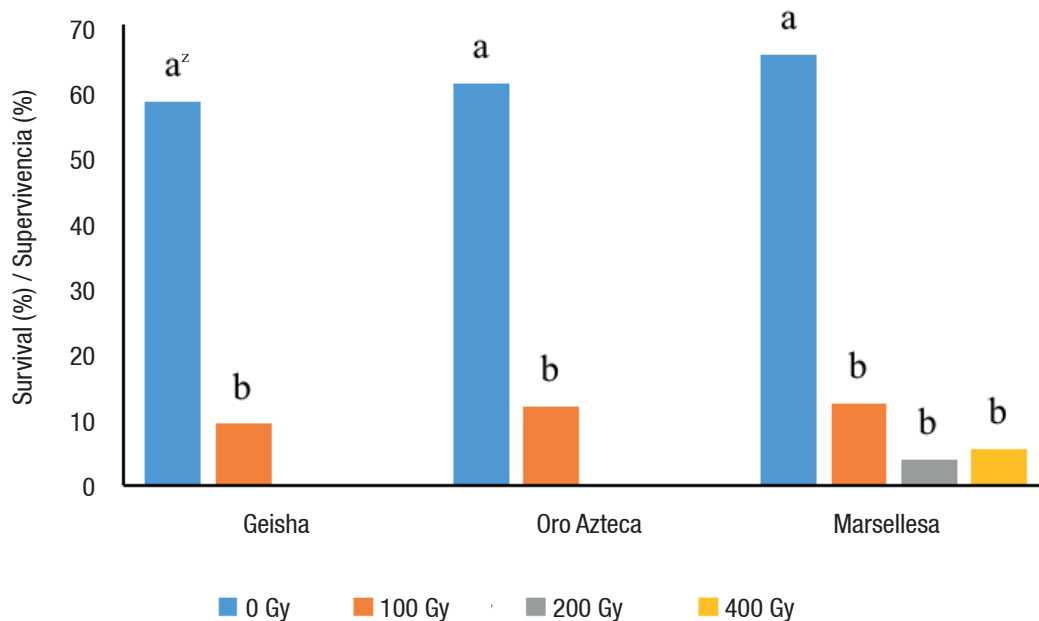


Figure 2. Effect of gamma radiation (⁶⁰Co) on the survival percentage of the Geisha, Oro Azteca and Marseillaise varieties of *C. arabica*. ^zBars with the same letter do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

Figura 2. Efecto de la radiación gamma (⁶⁰Co) sobre el porcentaje de supervivencia de las variedades Geisha, Oro Azteca y Marsellesa de *C. arabica*. ^zBarras con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

a few days after germination and with slow growth, the seedlings finally died. Similarly, it was shown that with doses of 600 Gy in *Jatropha curcas* L. seeds, plant survival decreased significantly (Songsri, Suriharn, Sanitchon, Srisawangwong, & Kesmla, 2011).

A general indicator defining the range of mean ionizing radiation (IR) doses is a short-term activation period preceding the onset of inhibition of physiological processes. Mean IR doses range from 20 to 100 Gy (irradiation of seeds) or from 5 to 50-70 Gy (irradiation of plant vegetative parts); therefore, doses above these levels are called high (Gudkov, Grinberga, Sukhova, & Vodeneeva, 2019). Broadly speaking, mutagenic agents used to induce hereditary changes are divided into physical and chemical groups, of which IRs are the most widely used physical mutagens, and their ionizing components within the electromagnetic spectrum include cosmic rays, gamma rays (γ) and X rays. Because of this, gamma rays are the most commonly used physical mutagens, which are emitted in the decay process of the cobalt (^{60}Co) or cesium (^{137}Cs) radioisotopes (Mba, 2013).

In the present study, the use of different doses of gamma radiation with ^{60}Co showed that *C. arabica* seeds of the Geisha, Oro Azteca and Marsellesa varieties are very susceptible to the effects of this mutagenic agent at high doses. For the Geisha and Oro Azteca varieties, the effect was lethal starting at a dose of 200 Gy. The decrease in germination and the almost zero survival at high doses of radiation can be attributed to alterations at the cellular level (caused at the physiological or biochemical level), including damage to chromosomes.

The impact of IR on a plant depends on the species, variety, developmental stage and physiological state of the plant (Kim et al., 2011). When doses received by plants exceed the indicated limits, their growth and development are inhibited (Gudkov et al., 2019). IR can also damage DNA indirectly through the products of radiolysis, causing a cascade of reactive molecules. Reactive oxygen species (ROS) resulting from water radiolysis produce negative effects at high doses, as unusual concentrations of ROS are produced in cells, which causes the alteration of the cellular redox balance (Caplin & Willey, 2018). The production or overproduction of $\bullet\text{OH}$ and other ROS immediately triggers defense systems against oxidative stress by modulating the activities of detoxifying enzymes (e.g. peroxidases, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, and glutathione reductase) (Esnault, Legue, & Chenal, 2010). These radicals do not kill cells, but instead produce genetic abnormalities (Koyama et al., 1998).

gamma suele inhibir la germinación de semillas de gimnospermas y angiospermas (Thapa, 2004).

El porcentaje de supervivencia se vio significativamente afectado ($P \leq 0.05$) por la radiación gamma (Figura 2). Hubo una disminución significativa a partir de la dosis de 100 Gy en las tres variedades en comparación con sus respectivos testigos. Una tendencia similar fue descrita por Ramírez, González, Camejo, Zaldívar, y Fernández (2006), quienes observaron que dosis mayores a 200 Gy disminuyeron el porcentaje de supervivencia de plántulas de *S. lycopersicum* L. Estos autores observaron que, aunque se produjo emisión de la radícula y aparición de los cotiledones, a los pocos días de germinadas y con crecimiento lento, las plántulas finalmente murieron. Del mismo modo, se demostró que con dosis de 600 Gy en semillas de *Jatropha curcas* L., la supervivencia de las plantas disminuyó significativamente (Songsri, Suriharn, Sanitchon, Srisawangwong, & Kesmla, 2011).

Un indicador general que define el rango de dosis medias de radiaciones ionizantes (RI) es un período de activación a corto plazo que precede al inicio de la inhibición de los procesos fisiológicos. Las dosis medias de RI varían de 20 a 100 Gy (irradiación de semillas) o de 5 a 50-70 Gy (irradiación de partes vegetativas de las plantas); por lo tanto, dosis por encima de estos niveles se denominan altas (Gudkov, Grinberga, Sukhova, & Vodeneeva, 2019). En términos generales, los agentes mutagénicos utilizados para inducir cambios hereditarios se dividen en físicos y químicos, de los cuales, las RI constituyen los mutágenos físicos más utilizados, y sus componentes ionizantes dentro del espectro electromagnético incluyen a los rayos cósmicos, rayos gamma (γ) y rayos X. Debido a esto, los rayos gamma se usan comúnmente como mutágenos físicos, los cuales se emiten por el proceso de descomposición de los radioisótopos de cobalto (^{60}Co) o cesio (^{137}Cs) (Mba, 2013).

En el presente estudio, el uso de diferentes dosis de radiación gamma con ^{60}Co mostró que las semillas de *C. arabica* de las variedades Geisha, Oro Azteca y Marsellesa son muy susceptibles a los efectos de este agente mutagénico en dosis altas. Para las variedades Geisha y Oro Azteca, a partir de la dosis de 200 Gy el efecto fue letal. La disminución de la germinación y la casi nula supervivencia en las dosis altas de radiación se puede atribuir a alteraciones a nivel celular (causadas a nivel fisiológico o bioquímico), incluyendo daños en cromosomas.

El impacto de la RI en una planta depende de la especie, la variedad, la etapa de desarrollo y el estado fisiológico de la planta (Kim et al., 2011). Cuando las

Plant height, height to first leaf pair and stem diameter

In the factorial analysis of variance, statistical significance was detected in the variety and dose factors, where at least one level of each factor had a significant effect on the variables PH and SD (Table 1). PH in the Marseillaise variety was significantly affected ($P \leq 0.05$) by gamma irradiation with the 100 Gy dose, although this variety was the only one that presented a response to the 400 Gy dose (Table 2). In the HFLP

dosis recibidas por las plantas exceden los límites indicados, su crecimiento y desarrollo se inhiben (Gudkov et al., 2019). La RI también puede dañar el ADN indirectamente a través de los productos de la radiólisis, lo cual provoca una cascada de moléculas reactivas. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) resultantes de la radiólisis del agua producen efectos negativos a altas dosis, ya que se producen concentraciones inusuales de ROS en las células, lo cual provoca la alteración del equilibrio redox celular (Caplin & Willey, 2018). La producción o sobreproducción de $\bullet\text{OH}$ y otras ROS

Table 1. Mean squares of the analysis of variance of the morphological variables of the three varieties of *Coffea arabica*. Cuadro 1. Cuadrados medios del análisis de varianza de las variables morfológicas de las tres variedades de *Coffea arabica*.

SV/ FV	DF/ GL	HFLP (cm)/ APPH (cm)	PH (cm)/ AP (cm)	SD (mm)/ DT (mm)	LA (cm ²)/ AF (cm ²)
Variety/Variedad	2	0.05	6.66*	0.00	3.10
Dose (Gy)/Dosis (Gy)	5	1.52*	10.6**	0.14*	2.48
Interaction/Interacción	10	0.40	0.73	0.02	1.83
Error	36	0.46	1.76	0.03	6.45
Total	53				
CV (%)		16.24	20.51	11.07	47.16

SV = source of variation; DF = degrees of freedom; HFLP = height to first leaf pair; PH = plant height; SD = stem diameter; LA = leaf area; CV = coefficient of variation. *, ** = significant at $P \leq 0.05$ and $P \leq 0.01$, respectively.

FV = fuente de variación; GL = grados de libertad; APPH = altura al primer par de hojas; AP = altura de planta; DT = diámetro de tallo; AF = área foliar; CV = coeficiente de variación. *, ** = significativo con $P \leq 0.05$ y $P \leq 0.01$, respectivamente.

Table 2. Response of *Coffea arabica* seeds of the Geisha, Oro Azteca and Marsellesa varieties to different doses of gamma radiation (⁶⁰Co). Cuadro 2. Respuesta de semillas de *Coffea arabica* de las variedades Geisha, Oro Azteca y Marsellesa a diferentes dosis de radiación gamma (⁶⁰Co).

Varieties/ Variedades	Dose (Gy)/ Dosis (Gy)	PH (cm)/ AP (cm)	HFLP (cm)/ APPH (cm)	SD (mm)/ DT (mm)	LA (cm ²)/ AF (cm ²)
Geisha	0	7.09 ± 1.17 a ²	4.27 ± 0.52 a	1.58 ± 0.20 ab	5.40 ± 3.04 a
	100	5.83 ± 1.04 ab	4.26 ± 0.92 a	1.66 ± 0.33 a	4.99 ± 2.40 a
	400	0.00	0.00	0.00	0.00
Oro Azteca	0	6.59 ± 1.38 a	4.35 ± 0.70 a	1.58 ± 0.10 ab	5.88 ± 2.80 a
	100	5.93 ± 1.18 ab	3.71 ± 0.50 a	1.58 ± 0.15 ab	4.99 ± 2.01 a
	200	0.00	0.00	0.00	0.00
Marsellesa	0	6.56 ± 1.45 ab	4.32 ± 0.73 a	1.54 ± 0.16 ab	5.21 ± 1.82 a
	100	5.32 ± 1.32 b	3.97 ± 0.89 a	1.66 ± 0.21 a	5.30 ± 2.61 a
	200	0.00	0.00	0.00	0.00
	400	6.30 ± 1.27 ab	4.2 ± 0.43 a	1.38 ± 0.22 ab	4.40 ± 1.30 a
P-value/P-valor					
Variety/Variedad		0.0259	0.9012	0.7571	0.6190
Dose/Dosis		0.0033	0.0437	0.0114	0.6810
Variety x dose/ Variedad x dosis		0.6619	0.4300	0.3984	0.7530

HFLP = height to first leaf pair; PH = plant height; SD = stem diameter; LA = leaf area. Means of three replicates ± standard deviation. ²Means with the same letter within each column do not differ statistically (Tukey, $P \leq 0.05$).

APPH = altura al primer par de hojas; AP = altura de planta; DT = diámetro de tallo; AF = área foliar. Medias de tres repeticiones ± desviación estándar. ²Medias con la misma letra dentro de cada columna no difieren estadísticamente (Tukey, $P \leq 0.05$).

and LA variables, no significant differences were found between variety and dose with respect to the control.

The results obtained coincide with those reported by Quintana et al. (2019), who observed a significant decrease in PH and SD in Típica variety coffee plants irradiated with 100 Gy. On the other hand, Dada et al. (2018) demonstrated that in *C. arabica* plants of the Mundo Novo, Kents and Geisha varieties, irradiated with 25 Gy, there was a significant reduction in PH, and in the Kents variety the effect was lethal. Marcu, Damian, Cosma, and Cristea (2013) report that in seeds of *Zea mays* L., with doses of 200 Gy, there was a decrease in shoot and root length. Likewise, in seeds of *Glycine max* L. Merrill, Alikamanoglu, Yaycili, and Sen (2011) observed that plant length decreased with doses of 200 Gy.

Leaf area and determination of LD₅₀

The three varieties analyzed showed no significant differences in LA with any of the gamma radiation treatments (Table 2). In seeds of *Phaseolus vulgaris* L., Arena, de Micco, and de Maio (2014) report that LA decreases with high doses. In Típica variety coffee plants, Quintana et al. (2019) observed a significant reduction in leaf length and width starting at the 100 Gy dose. Dada et al. (2018) showed that in coffee plants of the Mundo Novo, Kents and Geisha varieties, irradiated with 25 Gy, there was a significant decrease in number of leaves.

In coffee, gamma irradiation has been used mainly to kill insects in stored beans (Ahmad, Tharappan, & Bongirwar, 2003). Therefore, in experiments with seeds, the LD₅₀ should be estimated beforehand and an appropriate range of exposure to gamma irradiation should be established. The LD₅₀ corresponds to the amount of absorbed radiation with which 50 % of the population that has been exposed survives; in this range, the appearance of useful mutations in genetic improvement programs is favored (Morela, González, & Castro, 2002).

Bolívar-González, Valdez-Melara, and Gatica-Arias (2018) conducted research related to the generation of genetic variability in coffee by chemical mutagenesis in embryogenic suspension cultures of *C. arabica* var. Catuaí, incubated at different doses of sodium azide (NaN₃) and ethylmethanesulfonate (EMS). These authors showed that the LD₅₀ for NaN₃ was 5 mM for 15 min and for EMS it was 185.2 mM for 120 min. They also observed a significant reduction in cell viability as the concentration of NaN₃ and EMS increased.

In the present study, the LD₅₀ for survival of *C. arabica* var. Geisha plants was estimated at 70 Gy, for Marsellesa it was 85 Gy and for Oro Azteca it was 90 Gy. Due to the

desencadena, inmediatamente, sistemas de defensa contra el estrés oxidativo al modular las actividades de las enzimas desintoxicantes (por ejemplo: peroxidasa, ascorbato peroxidasa, superóxido dismutasa y glutatión reductasa) (Esnault, Legue, & Chenal, 2010). Estos radicales no matan las células, sino que producen anomalías genéticas (Koyama et al., 1998).

Altura de planta, altura al primer par de hojas y diámetro de tallo

En el análisis de varianza factorial se detectó significancia estadística en los factores variedad y dosis, donde al menos un nivel de cada factor tuvo un efecto significativo en las variables AP y DT (Cuadro 1). La AP, en la variedad Marsellesa, se vio afectada significativamente ($P \leq 0.05$) por la irradiación gamma con la dosis de 100 Gy, aunque esta variedad fue la única que presentó respuesta a la dosis de 400 Gy (Cuadro 2). En las variables APPH y AF no se encontraron diferencias significativas entre variedad y dosis con respecto al testigo.

Los resultados obtenidos coinciden con los reportados por Quintana et al. (2019), quienes observaron una disminución significativa en la AP y DT en plantas de café de la variedad Típica irradiadas con 100 Gy. Por otro lado, Dada et al. (2018) demostraron que en plantas de *C. arabica* de las variedades Mundo Novo, Kents y Geisha, irradiadas con 25 Gy, hubo una reducción significativa en la AP, y en variedad Kents el efecto fue letal. Marcu, Damian, Cosma, y Cristea (2013) reportan que en semillas de *Zea mays* L., con dosis de 200 Gy, hubo decremento en la longitud de brotes y raíces. Asimismo, en semillas de *Glycine max* L. Merrill, Alikamanoglu, Yaycili, y Sen (2011) observaron que con dosis de 200 Gy disminuyó la longitud de la planta.

Área foliar y determinación de DL₅₀

Las tres variedades analizadas no mostraron diferencias significativas en el AF con ninguno de los tratamientos de radiación gamma (Cuadro 2). En semillas de *Phaseolus vulgaris* L., Arena, de Micco, y de Maio (2014) reportan que con dosis altas disminuye el AF. En plantas de café de la variedad Típica, Quintana et al. (2019) observaron una reducción significativa en el largo y ancho de la hoja a partir de la dosis de 100 Gy. Dada et al. (2018) demostraron que en plantas de café de las variedades Mundo Novo, Kents y Geisha, irradiadas con 25 Gy, hubo un decremento significativo en el número de hojas.

En café, la irradiación gamma se ha utilizado principalmente para eliminar insectos en granos almacenados (Ahmad, Tharappan, & Bongirwar, 2003). Por lo tanto, en experimentos con semillas se debe estimar, previamente, la DL₅₀ y establecer un rango

above, gamma irradiation doses between 70 and 100 Gy can induce genetic variation in *C. arabica*. Therefore, this study represents an advance in the development of protocols to generate and genetically improve arabica coffee varieties so that they are resistant to different types of abiotic stress, as well as tolerant to pests and diseases, especially coffee leaf rust caused by the pathogen *Hemileia vastatrix*.

Conclusions

Gamma irradiation with ^{60}Co had a direct negative effect on the growth and development of *C. arabica* seedlings in the Geisha, Oro Azteca and Marseillaise varieties. Due to the high radiosensitivity of *C. arabica* to gamma irradiation with ^{60}Co , for future research the dose range should be less than 100 Gy. Radiation with doses between 70 and 100 Gy can be used in *C. arabica* breeding programs to promote mutations that favor the obtaining of economically important variants.

End of English version

References / Referencias

- Ahmad, R., Tharappan, B., & Bongirwar, D. R. (2003). Impact of gamma irradiation on the monsooning of coffee beans. *Journal of Stored Products Research*, 39(2), 149-157. doi: 10.1016/S0022-474X(01)00043-1
- Alikamanoglu, S., Yaycili, O., & Sen, A. (2011). Effect of gamma radiation on growth factors, biochemical parameters, and accumulation of trace elements in soybean plants (*Glycine max* L. Merrill). *Biological Trace Element Research*, 141, 283-293. doi: 10.1007/s12011-010-8709-y
- Amir, K., Hussain, S., Shuaib, M., Hussain, F., Urooj, Z., Khan, W. M., Zeb, U., Ali, K., Zeb, M. A., & Hussain, F. (2018). Effect of gamma irradiation on OKRA (*Abelmoschus esculentus* L.). *Acta Ecologica Sinica*, 38(5), 368-373. doi: 10.1016/j.chnaes.2018.02.002
- Arena, C., de Micco, V., & de Maio, A. (2014). Growth alteration and leaf biochemical responses in *Phaseolus vulgaris* exposed to different doses of ionising radiation. *Plant Biology*, 16(1), 194-202. doi: 10.1111/plb.12076
- Bolívar-González, A., Valdez-Melara, M., & Gatica-Arias, A. (2018). Responses of Arabica coffee (*Coffea arabica* L. var. Catuaí) cell suspensions to chemically induced mutagenesis and salinity stress under *in vitro* culture conditions. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 54, 576-589. doi: 10.1007/s11627-018-9918-x
- Breitler, J. C., Dechamp, E., Campa, C., Zebal-Rodrigues, L. A., Guyot, R., Marracini, P., & Etienne, H. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 134, 383-394. doi: 10.1007/s11240-018-1429-2
- Caplin, N., & Willey, N. (2018). Ionizing radiation, higher plants, and radioprotection: from acute high doses to chronic

adecuado de exposición a la radiación gamma. La DL_{50} corresponde a la cantidad de radiación absorbida con la cual sobrevive 50 % de la población que ha sido expuesta; en este rango, se favorece la aparición de mutaciones útiles en los programas de mejoramiento genético (Morela, González, & Castro, 2002).

Bolívar-González, Valdez-Melara, y Gatica-Arias (2018) realizaron una investigación relacionada con la generación de variabilidad genética en café por mutagénesis química en cultivos de suspensión embriogénica de *C. arabica* var. Catuaí, incubados a diferentes dosis de azida de sodio (NaN_3) y etilmetanosulfonato (EMS). Estos autores demostraron que la DL_{50} para NaN_3 fue de 5 mM durante 15 min y para el EMS fue de 185.2 mM durante 120 min. También observaron una reducción significativa de la viabilidad celular a medida que aumentaba la concentración de NaN_3 y EMS.

En el presente estudio, la DL_{50} para supervivencia de plantas de *C. arabica* var. Geisha se estimó en 70 Gy, para Marsellesa fue de 85 Gy y para Oro Azteca fue de 90 Gy. En razón de lo anterior, dosis de irradiación gamma entre 70 y 100 Gy pueden inducir variación genética en *C. arabica*. Por lo tanto, este estudio es un avance en el desarrollo de protocolos para generar y mejorar genéticamente las variedades de café arábica para que sean resistentes a diferentes tipos de estrés abiótico, así como para tolerancia a plagas y enfermedades, en especial para la roya naranja (*Hemileia vastatrix*) de la hoja del café.

Conclusiones

La irradiación gamma con ^{60}Co ejerció un efecto negativo directo sobre el crecimiento y desarrollo de plántulas de *C. arabica* en las variedades Geisha, Oro Azteca y Marsellesa. Debido a la alta radiosensibilidad de *C. arabica* a la irradiación gamma con ^{60}Co , para futuras investigaciones el rango de dosis debe ser menor a 100 Gy. La radiación con dosis entre 70 y 100 Gy se puede emplear en programas de mejoramiento de *C. arabica*, con el fin de promover mutaciones que favorezcan la obtención de variantes de importancia económica.

Fin de la versión en español

- low doses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 847. doi: 10.3389/fpls.2018.00847
- Cheema, A. A., & Atta, B. (2003). Radiosensitivity studies in *Basmati rice*. *Pakistan Journal of Botany*, 35(2), 197-207. Retrieved from [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/35\(2\)/PJB35\(2\)197.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/35(2)/PJB35(2)197.pdf)
- Dada, K. E., Anagbogbu, C. F., Forster, B. P., Muiyiwa, A. A., Adenuga, O. O., Olaniyi, O. O., & Bado, S. (2018). Biological effect of

- gamma irradiation on vegetative propagation of *Coffea arabica* L. *African Journal of Plant Science*, 12(6), 122-128. doi: 10.5897/AJPS2016.1504
- dos Santos, T. B., Budzinski, I. G. F., Marur, C. J., Petkowicz, C. L. O., Pereira, L. F. P., & Vieira, L. G. E. (2011). Expression of three galactinol synthase isoforms in *Coffea arabica* L. and accumulation of raffinose and stachyose in response to abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry*, 49(4), 441-448. doi: 10.1016/j.plaphy.2011.01.023
- Esnault, M. A., Legue, F., & Chenal, C. (2010). Ionizing radiation: advances in plant response. *Environmental and Experimental Botany*, 68(3), 231-237. doi: 10.1016/j.envexpbot.2010.01.007
- Gudkov, S. V., Grinberga, M. A., Sukhova, V., & Vodeneeva, V. (2019) Effect of ionizing radiation on physiological and molecular processes in plants. *Journal of Environmental Radioactivity*, 202, 8-24. doi: 10.1016/j.jenvrad.2019.02.001
- International Coffee Organization (ICO). (2019). *Total production by all exporting countries*. Retrieved from <http://www.ico.org/historical/1990%20onwards/PDF/1a-total-production.pdf>
- Kim, J. H., Moon, Y. R., Lee, M. H., Kim, J. H., Wi, S. G., Park, B. J., Kim, C. S., & Chung, B. Y. (2011). Photosynthetic capacity of *Arabidopsis* plants at the reproductive stage tolerates gamma irradiation. *Journal of Radiation Research*, 52(4), 441-449. doi: 10.1269/jrr10157
- Kiong, P., Ling, A., Lai, A. G., Hussein, S., & Harun, A. R. (2008). Physiological responses of *Orthosiphon stamineus* plantlets to gamma irradiation. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 2(2). Retrieved from <http://www.aensi.org/.../135-149.pdf>
- Koyama, S., Kodama, S., Suzuki, K., Matsumoto, T., Miyazaki, T., & Wanatabe, M. (1998). Radiation-induced long-lived radicals which cause mutation and transformation. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 421(1), 45-54. doi: 10.1016/s0027-5107(98)00153-5
- Kumar, D. S., Nepolean, T., & Gopalan, A. (2003). Effectiveness and efficiency of the mutagens; gamma rays and ethylmethane sulphonate on umabean (*Phaseolus lunatus* L.). *Indian Journal of Agricultural Research*, 37(2), 115-119. Retrieved from <https://www.arccjournals.com/journal/indian-journal-of-agricultural-research/ARCC2932>
- Lashermes, P., Combes, M. C., Robert, J., Trouslot, P., D'Hont, A., Anthony, F., & Charrier, A. (1999). Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Molecular and General Genetics*, 261, 259-266. doi: 10.1007/s004380050965
- Majeed, A., Muhammad, Z., Ullah, R., & Ali, H. (2018). Gamma irradiation I: effect on germination and general growth characteristics of plants—a review. *Pakistan Journal of Botany*, 50(6), 2449-2453. Retrieved from https://www.researchgate.net/publication/326015830_Gamma_irradiation_i_Effect_on_germination_and_general_growth_characteristics_of_plants-a_review
- Marcu, D., Damian, G., Cosma, C., & Cristea, V. (2013). Gamma radiation effects on seed germination, growth and pigment content, and ESR study of induced free radicals in maize (*Zea mays*). *Journal of Biological Physics*, 39(4), 625-634. doi: 10.1007/s10867-013-9322-z
- Mba, C. (2013). Induced mutations unleash the potentials of plant genetic resources for food and agriculture. *Agronomy*, 3(1), 200-231. doi: 10.3390/agronomy3010200
- Morela, F., González, V., & Castro, L. (2002). Efecto de la radiación Gamma sobre la diferenciación de plantas de caña de azúcar a partir de callos. *Agronomía Tropical*, 52(3), 311-323. Retrieved from http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0002-192X2002000300004
- Musoli, P., Cubry, P., Aluka, P., Billot, C., Dufour, M., de Bellis, F., Pot, D., Bieysse, D., Charrier, A., & Leroy, T. (2009). Genetic differentiation of wild and cultivated populations: diversity of *Coffea canephora* Pierre in Uganda. *Genome*, 52(7), 34-46. doi: 10.1139/G09-037
- Oladosu, Y., Rafii, M. Y., Abdullah, N., Hussin, G., Ramli, A., Rahim, H. A., Miah, G., & Usman, M. (2016). Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 30(1), 1-16. doi: 10.1080/13102818.2015.1087333
- Quintana, V., Alvarado, L., Saravia, D., Borjas, R., Castro-Cepero, V., Julca-Otiniano, A., & Gómez, L. (2019). Gamma radiosensitivity of coffee (*Coffea arabica* L. var. Typica). *Peruvian Journal of Agronomy*, 3(2), 74-80. doi: 10.21704/pja.v3i2.1317
- Ramírez, R., González, L. M., Camejo, Y., Zaldívar, N., & Fernández, Y. (2006). Estudio de radiosensibilidad y selección del rango de dosis estimulantes de rayos X en cuatro variedades de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Cultivos Tropicales*, 27(1), 63-67. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/1932/193215885012.pdf>
- Sant'Ana, G. C., Pereira, L. F., Pot, D., Ivamoto, S. T., Domingues, D. S., Ferreira, R. V., ... Leroy, T. (2018). Genome-wide association study reveals candidate genes influencing lipids and diterpenes contents in *Coffea arabica* L. *Scientific Reports*, 8, 465. doi: 10.1038/s41598-017-18800-1
- SAS Institute Inc. (2002). *User's guide of Statistical Analysis System*. Cary, USA: Author.
- Silva, M. C., Várzea, V., Guerra-Guimarães, L., Azinheira, H. G., Fernandez, D., Petitot, A. S., Bertrand, B., Lashermes, P., & Nicole, M. (2006). Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 119-147. doi: 10.1590/S1677-04202006000100010
- Singh, B., & Datta, P. S. (2010). Effect of low dose gamma irradiation on plant and grain nutrition of wheat. *Radiation Physics and Chemistry*, 79(8), 819-825. doi: 10.1016/j.radphyschem.2010.03.011
- Songsri, P., Suriharn, B., Sanitchon, J., Srisawangwong, S., & Kesmla, T. (2011). Effects of Gamma Radiation on Germination and Growth Characteristics of Physic Nut (*Jatropha curcas* L.). *Journal of Biological Sciences*, 11(3), 268-274. doi: 10.3923/jbs.2011.268.274
- Steiger, D. L., Nagai, C., Moore, P. H., Morden, C. W., Osgood, R. V., & Ming, R. (2002). AFLP analysis of genetic diversity

- within and among *Coffea arabica* varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3), 209-215. doi: 10.1007/s00122-002-0939-8
- Thapa, C. B. (2004). Effect of acute exposure of gamma rays on seed germination of *Pinus kesiya* Gord and *P. wallichiana* A.B. Jacks. *Our Nature*, 2(1), 13-17. doi: 10.3126/on.v2i1.318
- Tran, H. T., Ramaraj, T., Furtado, A., Slade, L. L., & Henry, R. J. (2018). Use of a draft genome of coffee (*Coffea arabica*) to identify SNPs associated with caffeine content. *Plant Biotechnology Journal*, 16(10), 1756-1766. doi: 10.1111/pbi.12912
- Yuyama, P. M., Reis, O., Ivamoto, S. T., Domingues, D. S., Carazzolle, M. F., Pereira, G. A., Charmetant, P., Leroy, T., & Pereira, L. F. (2016). Transcriptome analysis in *Coffea eugenioides*, an Arabica coffee ancestor, reveals differentially expressed genes in leaves and fruits. *Molecular Genetics and Genomics*, 291, 323-336. doi: 10.1007/s00438-015-1111-x

