



EFECTO DE REGULADORES DE CRECIMIENTO EN LA FORMACIÓN DE EMBRIONES SOMÁTICOS DEL HÍBRIDO DE CAFÉ VELASCO-5

EFFECT OF GROWTH REGULATORS ON THE FORMATION OF SOMATIC EMBRYOS OF THE VELASCO-5 COFFEE HYBRID

D. VILTRES-BARBÁN*, F. MARTÍNEZ-SUÁREZ, Y. RAMOS-ROSALES, Y. GALÁN-MORENO, M. E. GONZÁLEZ-VEGA

Unidad Científico Tecnológica de Base Estación Experimental Agro-Forestal Tercer Frente, Santiago de Cuba, Cuba.

**Autor para correspondencia: dayamibarbanviltres@gmail.com*

RESUMEN

El empleo de reguladores del crecimiento vegetal convencionales, como las auxinas y las citoquininas sintéticas, es fundamental en la embriogénesis somática de café, ya que su combinación estimula la dediferenciación y rediferenciación celular a partir de tejidos vegetales. Evaluamos el efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento vegetal en la formación de embriones somáticos del híbrido de café Velasco-5. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Estación Experimental Agro-Forestal Tercer Frente, Santiago de Cuba, durante en el período comprendido entre marzo a julio de 2021. Se evaluaron diferentes concentraciones de ácido naftalenacético (ANA) (0,1; 1,0 y 1,5 mg L⁻¹) y kinetina (0,5; 1,0 y 1,5 mg L⁻¹) en la formación de embriones somáticos. Con todas las combinaciones evaluadas de ANA y Kinetina se observó la formación de embriones somáticos del híbrido de café Velasco-5; sin embargo, el mayor porcentaje se obtuvo con la combinación ANA (0,1 mg L⁻¹) y kinetina (0,5 mg L⁻¹). La correcta dosificación de reguladores del crecimiento permite optimizar la producción de plántulas genéticamente uniformes, lo que es clave para mejorar la productividad y la resistencia de los cultivos.

Palabras clave: ácido naftalenacético, Kinetina, embriogénesis somática

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica biotecnológica que consiste en mantener plantas o sus componentes en condiciones ambientales controladas, libres de microorganismos asociados, con nutrición heterotrófica y en recipientes de plástico o vidrio. Esta técnica ha sido ampliamente utilizada en diversos aspectos del desarrollo agrícola y la investigación vegetal (Suárez Padrón, 2020). Su aplicación ha permitido avances significativos en la propagación y mejora de especies de interés agronómico.

ABSTRACT

The use of conventional plant growth regulators, such as auxins and synthetic cytokinins, is essential in the somatic embryogenesis of coffee, since their combination stimulates cell dedifferentiation and redifferentiation from plant tissues. We evaluated the effect of different combinations of plant growth regulators on the formation of somatic embryos of the Velasco-5 coffee hybrid. The research was carried out at the Plant Biotechnology Laboratory of the Tercer Frente Agro-Forestal Experimental Station, Santiago de Cuba, during the period from March to July 2021. Different concentrations of naphthaleneacetic acid (NAA) (0.1, 1.0, and 1.5 mg L⁻¹) and Kinetin (0.5, 1.0, and 1.5 mg L⁻¹) were evaluated in the formation of somatic embryos. With all the evaluated combinations of NAA and Kinetin, the formation of somatic embryos of the Velasco-5 coffee hybrid was observed; However, the highest percentage was obtained with the combination of ANA (0.1 mg L⁻¹) and kinetin (0.5 mg L⁻¹). The correct dosage of growth regulators allows optimizing the production of genetically uniform seedlings, which is key to improving crop productivity and resistance.

Keywords: naphthaleneacetic acid, kinetin, somatic embryogenesis

La literatura científica indica que los tejidos vegetales cultivados in vitro pueden desarrollar dos vías morfogénicas principales: la embriogénesis somática y la organogénesis. La embriogénesis somática es uno de los sistemas de regeneración de plantas más estudiados, pero los mecanismos que regulan su inducción aún no se han esclarecido por completo. Esto se debe a la complejidad de los procesos celulares involucrados en este fenómeno (Orłowska & Kępczyńska, 2020).

Diversos factores influyen en la aparición de la embriogénesis somática, entre los cuales destaca el tipo de explante utilizado. En teoría, todos los tejidos vegetales

Recibido: 05/2/2022

Aceptado: 07/4/2022

Conflicto de intereses: Los autores declaran no tener conflictos de interés



Este artículo se encuentra bajo los términos de la licencia Creative Commons Attribution-NonCommercial (CC BY-NC 4.0). <https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>



tienen la capacidad de formar callos in vitro, pero solo algunos explantes pueden generar callos con potencial embriogénico (Campos et al., 2017). Entre los explantes más utilizados se encuentran partes de plántulas, como cotiledones, hipocótilos, embriones, ápices caulinares, segmentos de hojas, tallos, raíces e inflorescencias inmaduras (Aga & Khillare, 2017). Además, el genotipo de la planta juega un papel crucial en la respuesta embriogénica, ya que algunos cultivares pueden regenerarse fácilmente en medios específicos, mientras que otros no responden de la misma manera (Caccha, 2021).

La eficiencia de la embriogénesis somática también depende de la concentración de los reguladores de crecimiento presentes en el medio de cultivo (Riviello et al., 2021). Estos compuestos tienen efectos significativos sobre el crecimiento y desarrollo de una amplia variedad de especies leñosas. En el caso de especies perennes como el café, es fundamental evaluar la influencia de los reguladores de crecimiento en el crecimiento in vitro. Las citoquininas, por ejemplo, promueven la división celular, mientras que las auxinas estimulan tanto la división como el crecimiento celular (Irene et al., 2019).

Los híbridos interespecíficos resultantes del cruce entre *Coffea arabica* (tetraploide, $2n=44$) y *Coffea canephora* (diploide, $2n=22$) se conocen como Arabusta (ANACAFÉ, 2019). Estos híbridos pueden propagarse vegetativamente o mediante técnicas biotecnológicas sin perder sus características. Estudios realizados en las condiciones agroecológicas del municipio Tercer Frente demostraron que clones de estos híbridos, denominados Velasco-5, tienen un alto potencial productivo, calidad en la taza y tolerancia al ataque de nematodos del género *Meloidogyne sp.* según Cabrera et al. (1998) y Arañó et al. (2001). Por ello, es necesario investigar combinaciones de reguladores de crecimiento que faciliten la obtención de embriones somáticos de este híbrido. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento en la formación de embriones somáticos del híbrido de café Velasco-5.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Tercer Frente, Santiago de Cuba, durante el período comprendido entre marzo a julio de 2021.

Callos embriogénicos obtenidos mediante el proceso de inicio de la embriogénesis somática indirecta fueron trasladados al flujo laminar horizontal (marca ENAC®), y fraccionados, luego colocados a razón de cuatro callos por frasco con 25 mL de medio de cultivo para formación de embriones somáticos, con las sales MS (Murashige & Skoog, 1962), ácido nicotínico 0,5 mg L⁻¹, piridoxina 0,5 mg L⁻¹,

tiamina 0,10 mg L⁻¹, mio-inositol 100 mg L⁻¹, cisteína 0,05 g L⁻¹ y sacarosa 30 g L⁻¹. El pH del medio de cultivo fue ajustado a 5,8 previo a la incorporación del Gelrite 30 g L⁻¹.

Para evitar la aparición de contaminantes microbianos se agregó 116 mg L⁻¹ de Vitrofur® y posteriormente se añadieron los reguladores del crecimiento vegetal ANA y kinetina en diferentes concentraciones según el tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1. Combinaciones de los reguladores de crecimiento utilizados en el medio de cultivo de diferenciación de embriones somáticos a partir de los callos del híbrido de café Velasco-5.

Tratamientos	Reguladores de crecimiento (mg L ⁻¹)	
	ANA	Kinetina
1	0,1	0,5
2	0,1	1,0
3	0,1	1,5
4	1,0	0,5
5	1,0	1,0
6	1,0	1,5
7	1,5	0,5
8	1,5	1,0

Los callos inoculados se incubaron en cámaras de crecimiento con luz artificial de lámparas fluorescentes de 40 W, con un fotoperíodo de 16 horas luz por ocho de oscuridad, intensidad luminosa de 30 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, a una temperatura de 25 ± 1 °C y humedad relativa 60 %, durante dieciséis semanas de cultivo.

Posteriormente se determinó el número de explantes con formación de embriones somáticos (%) y el número de embriones somáticos diferenciados por explante. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado por presentar condiciones controladas de laboratorio, previamente se comprobó si los datos de cada tratamiento cumplían con los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianzas, según las pruebas Kolmogorov-Smirnov y Levene para $p \leq 0,05$, los datos originales de las variables expresadas en porcentaje se transformaron mediante la fórmula $X' = (\arcsen \sqrt{x})$, se empleó la prueba de Mann Withney para determinar las diferencias entre tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los callos embriogénicos empleados respondieron a las concentraciones de ANA y Kinetina, para la formación de embriones somáticos del híbrido de café Velasco-5, mediante un proceso de embriogénesis somática indirecta. Se observó la formación de una masa embriogénica a partir de la cual se originaron embriones somáticos secundarios,

lo que indicó la ocurrencia de una embriogénesis somática repetitiva (Figura 1). Este fenómeno permitió incrementar la multiplicación de los embriones.



Figura 1. Formación de embriones somáticos del híbrido de café Velasco-5, a los 90 días de cultivo.

Los embriones somáticos inicialmente fueron blancos (Figura 2 A), pero a medida que aumentó el tiempo de cultivo se tornaron verdes (Figura 2 B). Este cambio de coloración puede deberse a la síntesis del pigmento clorofila durante el proceso de rediferenciación y especialización de los tejidos.

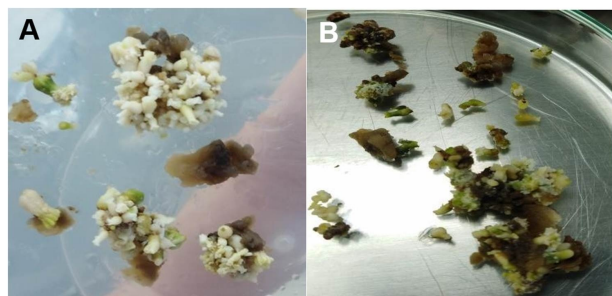


Figura 2. Callos con formación de embriones somáticos del híbrido de café Velasco-5. A (90 días de cultivo) y B (120 días de cultivo).

Los tratamientos que indujeron la formación de embriones somáticos en la mayoría de los explantes fueron el T1 (0,1 mg L⁻¹, ANA y 0,5 mg L⁻¹ Kinetina), seguido del T2 (0,1 mg L⁻¹, ANA y 1,0 mg L⁻¹ Kinetina), en ambos casos con valores cercanos al 60 % de explantes con embriones somáticos (Figura 3).

A medida que se incrementó la concentración de ácido naftalenacético (ANA) y kinetina, se observó una disminución en el número de explantes con formación de embriones somáticos. Esta reducción podría estar relacionada

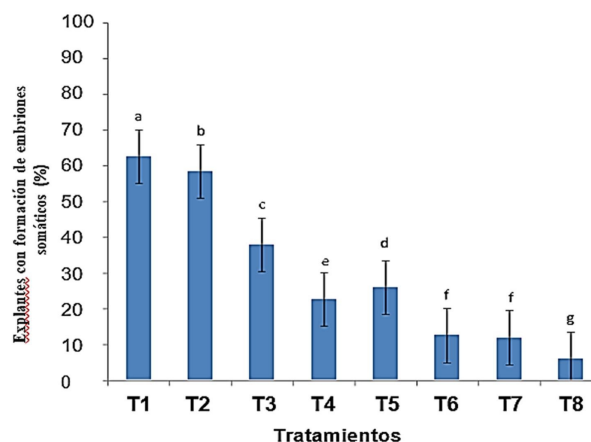


Figura 3. Explantes con formación de embriones somáticos del híbrido de café Velasco-5 con diferentes concentraciones de ANA y Kinetina. Letras diferentes sobre las barras difieren significativamente según la prueba de Ducan ($p < 0,05$).

con la división celular, la cual incrementa la síntesis de proteínas y la actividad metabólica, que afectan los procesos de división celular. Los menores valores se registraron en los tratamientos del cuatro al ocho, donde menos del 30 % de los explantes mostraron formación de embriones somáticos (Figura 3).

Una respuesta similar fue informada por Dublin (1980) al estudiar la inducción de embriones somáticos en el híbrido Arabusta. Este autor evaluó el efecto de las auxinas ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), ácido indolbutírico (AIB) y 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), y encontró que el mayor porcentaje de formación de embriones somáticos (33 %) se obtuvo con AIA. En los demás tratamientos, los valores no superaron el 14,2 %.

En otro estudio, Dublin empleó AIA en concentraciones entre 0,5 y 2,0 mg L⁻¹ para la formación de embriones somáticos en Arabusta. El mayor valor (37,7 %) se alcanzó con 1,0 mg L⁻¹ de AIA, lo cual difiere de los resultados obtenidos en el presente estudio, donde las mejores respuestas se lograron con concentraciones inferiores. Este aspecto es de interés, ya que sugiere la posibilidad de optimizar el uso de reactivos y mejorar la eficiencia en los procesos de cultivo de tejidos vegetales.

Durante el proceso de embriogénesis, se observó un alto grado de asincronía, lo cual es característico en poblaciones de embriones somáticos que muestran un amplio rango de tamaños y formas (Figura 4). Esta asincronía resultó desventajosa desde el punto de vista práctico por dos razones principales. En primer lugar, la falta de uniformidad en la fase de desarrollo de los embriones somáticos se mantuvo a lo largo del cultivo in vitro. En segundo lugar, fue difícil determinar si las células no diferenciadas presentaron fallas o retrasos en el proceso de embriogénesis somática.



Figura 4. Embriones somáticos en diferentes etapas de desarrollo del híbrido de café Velasco-5 a los 120 días de cultivo en medio de cultivo de diferenciación.

En la morfología del embrión somático, se identificaron dos protuberancias meristemáticas localizadas en el meristemo apical, las cuales dieron origen a una separación simétrica. Posteriormente, los embriones somáticos se elongaron y avanzaron a las etapas de torpedo y cotiledonar (Figura 4).

Esta asincronía que se presentó durante la formación de los embriones somáticos (Figura 4) resultó desventajosa desde el punto de vista práctico, por dos razones: primero, la no uniformidad inicial en cuanto a la fase de desarrollo de los embriones somáticos, que se reflejó a lo largo del cultivo *in vitro* de la población resultante; y segundo, por la incertidumbre de determinar en un momento dado si en las células no diferenciadas resultaron fallas o presentaron retraso en la embriogénesis somática.

En la morfología del embrión somático emergieron dos protuberancias meristemáticas, localizadas en el meristemo apical, las cuales dieron origen a una separación simétrica. Con posterioridad los embriones somáticos se elongaron y pasaron a las etapas torpedo y cotiledonar (Figura 4).

Durante la maduración, los embriones somáticos experimentaron cambios morfológicos y bioquímicos, como el aumento de tamaño y la acumulación de sustancias de reserva, como almidón y azúcares. Estos cambios son esenciales para su desarrollo posterior, germinación y conversión en plantas fotoautótrofas (Riviello et al., 2021).

En la Tabla 2 se presenta la cantidad de embriones somáticos formados por explante, clasificados según su etapa de desarrollo al momento de la evaluación. Los tratamientos que combinaron ANA 0,1 mg L⁻¹ con kinetina 0,5 mg L⁻¹ y 1,0 mg L⁻¹ mostraron la mayor cantidad de estructuras embriogénicas, con 150 (T1) y 140 (T2) embriones somáticos por explante, respectivamente.

El número de embriones por explante es superior al obtenido por Hernández (2021), quien indujo la formación de embriones somáticos en anteras de rocoto (*Capsicum pubescens* Ruiz & Pav.) con 2,4-D y kinetina. El tratamiento T2 (0,1 mg L⁻¹ 2,4-D y 0,1 mg L⁻¹ kinetina) mostró los mejores resultados, con un 18,27 % de anteras que formaron embriones somáticos.

El efecto de la kinetina también fue evaluado por Sánchez & Cabrera (2019), quienes identificaron que el uso de 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D y 1,5 mg L⁻¹ kinetina fue el mejor tratamiento para la inducción de embriones somáticos en las variedades de café Castillo y Catuaí. En la variedad Catuaí, se obtuvieron 26,84 embriones somáticos por explante, que superan los 25,69 embriones por explante informados por Moncada et al. (2004), en un medio de cultivo similar al MS suplementado con 0,3 mg L⁻¹ 2,4-D y 2,7 mg L⁻¹ 6-BAP.

Los valores obtenidos en este estudio superaron los informados por Grozeva & Nankar (2020), quienes obtuvieron 54 embriones somáticos (27 %) en un medio de cultivo MS suplementado con 2,4-D (0,1 mg L⁻¹) y kinetina (0,1 mg L⁻¹). Asimismo, los resultados fueron mayores a los de Iracheta-Donjuan (2019), quien registró 44 embriones somáticos en explantes de *Theobroma cacao* con el medio DKW suplementado con 2,4-D 4,52 μM y 2ip 0,02 μM. Estas comparaciones resaltan la efectividad del método aplicado en el presente estudio. En otras variedades, se observaron resultados menos favorables. Por ejemplo, en algunos casos se obtuvo un solo embrión por explante al adicionar 2,4-D/2ip y epibrasinólida al medio de cultivo.

Tabla 2. Número de embriones somáticos en tres de los tratamientos anteriores del híbrido de café Velasco-5 a los 120 días de cultivo.

Tratamientos	Etapas de desarrollo de los embriones somáticos							
	Globular		Corazón		Torpedo		Cotiledonar	
	Media	Rango Medio	Media	Rango Medio	Media	Rango medio	Media	Rango medio
1	10	25,05 a	12	19,50 a	48	23,65 a	80	14,35 b
2	4	12,80 b	10	17,60 a	33	15,20 b	93	21,10 a
3	3	8,65 b	7	9,40 b	20	7,65 c	70	11,05 c

Rangos medios con letras diferentes en una misma columna difieren significativamente según la prueba Mann Whitney ($p < 0,05$)

Para la variedad H13xUF-273, la combinación de 2,4-D/2ip indujo la formación de 1,7 embriones por explante. En contraste, la variedad PA-169 x UF-273 mostró un promedio de 0,5 embriones por explante cuando se utilizó un medio DKW suplementado con 2,4-D, kinetina y epibrasinólida. Estos datos refuerzan la importancia de las condiciones específicas del medio de cultivo y las concentraciones hormonales en la eficiencia de la embriogénesis somática. Además, es evidente la respuesta específica de las variedades a las diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento vegetal.

Watson-Guido et al. (2021) emplearon reguladores de crecimiento en el cultivo de Ajo Criollo costarricense y observaron la formación de embriones globulares en menos tiempo que en este estudio. La maduración embrionaria se logró con 0,5 mg L⁻¹ de AG3, y la germinación con 0,5 mg L⁻¹ de BAP. La germinación consistió en el desarrollo de meristemas radicales y foliares, que culminaron en la formación de plántulas completas.

Montes-de Godoy (2019) obtuvo la germinación de embriones somáticos a partir de los 13 días de cultivo, completándose a los 30 días, cuando las vitroplantas presentaban dos pares de hojas verdaderas. Este proceso se realizó en un medio MS suplementado con 0,5 mg L⁻¹ de 6-BAP y un pH de 5,7.

Las respuestas de las variedades de café estudiadas indican que cada variedad requiere un medio de cultivo específico. Silva et al. (2015) destacaron la necesidad de desarrollar protocolos específicos para cada especie o variedad.

En este estudio se logró un promedio de 150 embriones somáticos por callo embriogénico, un valor significativamente superior al informado por otros autores. Por ejemplo, Avila et al. (2018) indujeron embriogénesis con el empleo de 0,5 mg L⁻¹ 2,4-D y 1,12 mg L⁻¹ BAP, obteniendo resultados inferiores.

CONCLUSIONES

1. Los tratamientos con 0,1 mg L⁻¹ de ANA y 0,5-1,0 mg L⁻¹ de kinetina mostraron la mayor eficiencia en la formación de embriones somáticos en el híbrido de café Velasco-5, con tasas cercanas al 60%. Sin embargo, concentraciones más altas de estas hormonas redujeron la formación de embriones, lo que sugiere que el equilibrio hormonal es crucial para optimizar la embriogénesis somática.
2. Se observó un alto grado de asincronía en el desarrollo de los embriones somáticos, lo que dificultó la uniformidad del cultivo. A pesar de esto, se identificaron etapas clave en la morfología embrionaria, como la formación de protuberancias meristemáticas y la transición a fases torpedo y cotiledonal, esenciales para la maduración y germinación de los embriones.

BIBLIOGRAFÍA

- Aga, E., & Khillare, Y. (2017). In vitro multiplication of *Coffea arabica* L. from leaf explants through indirect somatic embryogenesis. *International Journal of Botany Studies*, 2(1), 17-22.
- ANACAFÉ. (2019). *Guía de variedades de café*. Asociación Nacional de Café Guatemala.
- Araño, L., Carracedo, C., Cabrera, M., & López, C. (2001). Determinación del comportamiento de genotipos de cafetos ante el ataque de nematodos (*Meloidogyne* sp.). *Café y Cacao*, 2(1), 3-6.
- Avila, C. M., Martínez-Infante, Á., Ordaz-Chaparro, V. M., Arjona-Suárez, E. J., Iracheta-DonJuan, L., Gómez-Merino, F. C., & Robledo-Paz, A. (2018). Embriogénesis somática directa e indirecta en *Coffea arabica* var. Colombia. *Agroproductividad*, 11(4), 30-35.
- Cabrera, M., López, C., Portilla, M., Díaz, W., & Bustamante, C. (1998). Descripción de clones de *Coffea canephora* en el Tercer Frente. *Cafe Cacao*, 1(1), 23-29.
- Caccha, J. M. (2021). *Obtención de callos embriogénicos de tres variedades (Caturra rojo, Catimor y Catuai) de café (Coffea arabica L.)* [Tesis en opción al título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UNMS_84ae64b611589cb5f5da01f1ddd7e2a
- Campos, N. A., Panis, B., & Carpentier, S. C. (2017). Somatic embryogenesis in coffee: The evolution of biotechnology and the integration of omics technologies offer great opportunities. *Frontiers in plant science*, 8(1), 2-4.
- Dublin, P. (1980). Multiplication vegetative in vitro de l'Arabusta. *Café Cacao Thé*, 24(4), 281-289.
- Grozeva, S., & Nankar, A. N. (2020). Effect of incubation period and culture medium on pepper anther culture. *Indian Journal of Biotechnology*, 19(1), 53-59.
- Hernández, A. D. (2021). *Embriogénesis somática a partir del cultivo in vitro de anteras en rocoto (capsicum pubescens Ruiz & Pav.)* [Tesis en opción al título de Biólogo con mención en Biotecnología, Universidad Nacional José Faustino Sánchez Carrión]. <http://repositorio.unjfsc.edu.pe/handle/20.500.14067/4869>
- Iracheta, L. (2019). 2iP Y BRASINOSTEROIDES PROMUEVEN LA INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN *Theobroma cacao* L. *Agro Productividad*, 12(1), 65-70.
- Irene, W. M., Alumiro, H. L., Asava, K. K., Agwanda, C. O., & Anami, S. E. (2019). Effects of genotype and plant growth regulators on callus induction in leaf cultures of *Coffea arabica* L. F1 hybrid. *Journal of Plant Biochemistry and Physiology*, 7(2), 1-12.
- Moncada, E., Vielma, M., & Mora, A. (2004). Inducción in vitro de embriogénesis somática a partir de tejido foliar de *Coffea arabica* L. variedad Catuai amarillo. *Universidad de los Andes Venezuela*, 3(6), 23-28.

- Montes-de Godoy, M. E. (2019). Micropropagación y caracterización molecular de una variedad de café (*Coffea arabica*) resistente a roya (*Hemileia vastatrix*). *Cultivos Tropicales*, 40(2), 6-9.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Orłowska, A., & Kępczyńska, E. (2020). Involvement of O₂— in the regulation of Polycomb, Trithorax and LEC1, L1L, WUS, WOX5, STM gene expression during somatic embryogenesis induction in *M. truncatula*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 142(1), 201-212. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01854-x>
- Riviello, E., Robledo-Paz, A., Gutiérrez-Espinosa, M. A., Suárez-Espinosa, J., & Mascorro-Gallardo, J. O. (2021). Maturation and germination of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Colombia. *Revista fitotecnica mexicana*, 44(2), 161-171.
- Sánchez, J., & Cabrera, R. (2019). Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *Scientia Agropecuaria*, 10(2), 259-264.
- Silva, A. T., Barduche, D., Do Livramento, K. G., & Paiva, L. V. (2015). A putative BABY BOOM-like gene (CaBBM) is expressed in embryogenic calli and embryogenic cell suspension culture of *Coffea arabica* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 51(1), 93-101. <https://doi.org/10.1007/s11627-014-9643-z>
- Suárez Padrón, I. E. (2020). *Cultivo de tejidos vegetales*. Fondo Editorial Universidad de Córdoba. <https://repositorio.unicordoba.edu.co/entities/publication/800256e3-9997-4159-aae4-a0a2c5522852>
- Watson-Guido, W., Jimenez-Bonilla, V., & Brenes-Madriz, J. (2021). Establecimiento de un protocolo para la inducción de embriogénesis somática indirecta en *Allium Sativum* (Ajo Criollo Costarricense). *Revista Tecnología en Marcha*, 34(2), 178-186.