

Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano
Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria
Ingeniería Agronómica



Proyecto Especial de Graduación
**Efecto del 2,4-D, BAP y Kinetina en la inducción a embriogénesis
somática en láminas foliares de café**

Estudiante

Jesús Gabriel Acosta Villanueva

Asesoras

María Alexandra Bravo, M.Sc.

Cinthya Martínez, MAE

Honduras, julio 2022

Autoridades

TANYA MÜLLER GARCÍA

Rectora

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

HUGO ZAVALA MEMBREÑO

Secretario General

Contenido

Índice de Cuadros.....	5
Índice de Figuras	6
Resumen	7
Abstract.....	8
Introducción.....	9
Materiales y Métodos	11
Localización del Experimento	11
Material Vegetal.....	11
Desinfección Superficial y Establecimiento del Explante.....	11
Medios de Cultivo	12
Medio de Inducción a Calogénesis.....	12
Medio de Proliferación de Callo.....	12
Medio de Diferenciación.....	13
Variables Evaluadas	13
Diseño Experimental y Análisis Estadístico	14
Resultados y Discusión.....	15
Experimento 1: Establecimiento de Explantes Foliares de Café Variedad Lempira	15
Proliferación de Callo	16
Diferenciación de Embriones Somáticos	17

Experimento 2: Establecimiento de Explantes Foliare de Café Variedad Geisha	19
Conclusiones	21
Recomendaciones	22
Referencias.....	23

Índice de Cuadros

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en inducción a callogénesis de hojas de café cultivadas in vitro..	12
Cuadro 2. Escala para evaluación del número de bordes en los explante con formación de callo en láminas foliares de café establecidas in vitro.	13
Cuadro 3 Porcentaje de explantes con formación de callo y número de bordes con formación de callo en café variedad Lempira a los 52 días.	16
Cuadro 4. Porcentaje de explantes con formación de callo y número de bordes por explante con formación de callo en café variedad Geisha a los 44 días.	20

Índice de Figuras

Figura 1 Explantes foliares de café variedad Lempira establecidos en medio a inducción a callogénesis con reguladores de crecimiento	15
Figura 2 Proliferación de callo formado a partir de explantes foliares de café Variedad Lempira	17
Figura 3 Estructuras observadas en diferenciación de embriones somáticos obtenidos a partir de explantes foliares de café variedad Lempira	18
Figura 4 Explantes foliares de café variedad Geisha establecidos en medio a inducción a callogénesis	19

Resumen

El método de propagación por cultivo de tejidos nos permite multiplicar de forma masiva especies de importancia económica en un menor periodo de tiempo, debido a su alta tasa de multiplicación. El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de los reguladores BAP, Kinetina y 2,4-D en láminas foliares de café establecidas *in vitro*. Se usó medio semisólido compuesto por las sales minerales de Murashige y Skoog a la mitad de concentración (50%) y vitaminas de Yasuda. En el medio de cultivo se incorporó reguladores de crecimiento, se combinó la auxina 2,4-D con las citocininas Kinetina y 6-Bencilaminopurina. Los tratamientos a evaluados fueron: Tratamiento testigo: sin reguladores, Tratamiento 2: 2,4-D 0.5 mg/L; Tratamiento 2K: 2,4-D 0.5 mg/L + Kinetina 1.5 mg/L; Tratamiento 2B: 2,4-D 0.5 mg/L + 6-Bencilaminopurina 1.12 mg/L. Se midió el porcentaje de explantes con formación de callo y el número de bordes con presencia de callo en las variedades de café Lempira y Geisha. En los tres tratamientos con presencia de reguladores de crecimiento hubo presencia de callo por parte de los explantes en ambas variedades. En la variedad Lempira no hubo diferencia significativa en las variables evaluadas en los tratamientos con reguladores de crecimiento, mientras en la variedad Geisha si se obtuvo diferencias significativas en los tratamientos, mostrando un 100% de explantes con formación de callo el tratamiento 2,4-D + 6-Bencilaminopurina.

Palabras clave: bencilaminopurina, embriogénesis somática, kinetina, 2,4-D.

Abstract

The tissue culture propagation method allows mass multiplication of economically important species in a shorter period, due to its high multiplication rate. The objective of this study was to determine the effect of the regulators BAP, Kinetin and 2,4-D on coffee leaves established in vitro. A semisolid medium composed of Murashige and Skoog salts at half concentration (50%) and Yasuda vitamins were used. Growth regulators were incorporated in the culture medium, the auxin 2,4-D was combined with the cytokinins Kinetin and 6-Benzylaminopurine. The treatments evaluated were Control treatment: no plant growth regulators; Treatment 2: 2,4-D 0.5 mg/L; Treatment 2K: 2,4-D 0.5 mg/L + Kinetin 1.5 mg/L; Treatment 2B: 2,4-D 0.5 mg/L + 6-Benzylaminopurine 1.12 mg/L. The percentage of explants with callus formation and the number of edges with presence of callus were measured in the coffee varieties Lempira and Geisha. In the three treatments with the presence of growth regulators, there was the presence of callus on the explant side in both varieties. In the Lempira variety there were no significant differences in the variables evaluated in the treatments with plant growth regulators, while in the Geisha variety there were significant differences in the treatments, showing 100% of explants with callus formation in the 2,4-D + 6-Benzylaminopurine treatment.

Keywords: benzylaminopurine, kinetin, somatic embryogenesis, 2,4-D.

Introducción

El café es originario de Etiopia, pertenece a la familia de las rubiáceas, en el género *Coffea*, esta familia está compuesta entre 500 géneros y alrededor de 6000 y 8000 especies, entre estas especies podemos mencionar el *Coffea arábica* y el *Coffea canephora* como las más importantes económicamente (ICO [actualizado 2020]). El café es producido en América del sur y central, Asia y África; como principal productor mencionamos Brasil, que es el mayor productor de café arábico y robusta (Cortijo 2017).

Existen diversos métodos de propagación de este cultivo, de forma sexual o asexual, en el método sexual hacemos uso de semillas y en el método asexual se utiliza material vegetativo (Monroig 2018). Cuando se desarrollan variedades con características deseables como la tolerancia a enfermedades, estas son híbridos que no tienen la cantidad deseable de semillas para su propagación sexual, el cultivo de tejidos nos permite la propagación masiva de especies de importancia económica, seleccionando la planta que posea las mejores características (Lozano Kretschmar 2014). El cultivo de tejidos vegetales consiste en aislar un órgano o tejido vegetal, al cual se le proporciona un medio con los nutrientes necesarios, condiciones óptimas, aprovechando cualidades totipotenciales y fenotípicas, maximizando su desarrollo (Alcántara Cortes et al. 2017).

El medio de cultivo posee reguladores de crecimiento, estos son necesarios para la producción de callos, órganos o embriones somáticos. La concentración, el tipo de regulador y el tiempo de exposición de los explantes a estos reguladores está ligado a la especie a propagar y al objetivo de la micropropagación (Campos et al. 2017). Según Thomas y Jiménez (2006), los reguladores de crecimiento más utilizados en los cultivos *in vitro* son las auxinas y citocininas. Cabe destacar que ambos reguladores se vinculan además de la organogénesis, en la embriogénesis somática, regulando el ciclo celular y promoviendo la división, desdiferenciación y diferenciación celular.

La embriogénesis somática es la producción de embriones a partir de tejidos somáticos es decir sin fecundación, los embriones generados son genéticamente iguales a la planta madre (Campos

et al. 2017). La embriogénesis somática nos permite multiplicar especies de importancia económica en un menor periodo de tiempo, debido a su alta tasa de multiplicación. Además permite la automatización de la micropropagación mediante el uso de biorreactores de inmersión temporal (Sánchez et al. 2019).

La embriogénesis somática es una respuesta de la totipotencia de las células vegetales, que se define según Alcántara Cortes et al. (2017) como la “capacidad que tienen las células no diferenciadas (meristemáticas) para llegar a ser diferenciadas y cumplir una función específica dentro del organismo del cual hacen parte”. En la embriogénesis somática existen dos técnicas de establecimiento, conocidas como: embriogénesis somática directa y embriogénesis somática indirecta (Gatica 2002). En la forma directa los embriones son formados sin la presencia de callos, y en la forma indirecta existe la presencia inicial de un callo embriogénico y luego la formación de embriones a partir de este callo (Campos et al. 2017) . Las características que nos ayudan a distinguir un embrión somático es que es muy similar a un embrión cigótico, además de ser capaz de poseer una estructura bipolar (raíz y brote) siendo apto para originar una planta, igualmente posee un desarrollo embrionario parecido a un embrión cigótico, el cual consta con las siguientes fases: preembrión, fase globular, corazón, torpedo y fase cotiledonar, esta fase cotiledonar solo se presenta en plantas dicotiledóneas (Paz Ramírez 2000).

En este estudio se utilizó el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), que es una auxina que se usa en el cultivo *in vitro* para la formación de callos y la inducción de embriogénesis somática (Espinosa et al. 2012). Como citocininas se utilizaron 6-Bencilaminopurina (BAP) y Kinetina. El BAP promueve la diferenciación y la división celular, la Kinetina promueve la división y elongación celular, asimismo rompe la dormancia (Pincay Bajaña 2017).

El objetivo de este estudio fue conocer el efecto de los reguladores BAP, Kinetina y 2,4-D en la formación de callo embriogénico en láminas foliares de café.

Materiales y Métodos

Localización del Experimento

La investigación se realizó en el Laboratorio de Cultivo de tejidos de la Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano ubicada en Valle de Yeguaré, a 30 km al SE de Tegucigalpa, Honduras.

Material Vegetal

En este estudio se utilizaron las variedades de café Lempira y Geisha. La variedad Lempira es de porte bajo, potencial de rendimiento alto en promedio de 1270 kg/ha, pero presenta una baja calidad y susceptible a la roya del café. La variedad Geisha es de porte alto, potencial de rendimiento medio en promedio 680 kg/ha, pero presenta una calidad excepcional y es considerada tolerante a la roya de café (World Coffee Research [consultado 2022]).

Las hojas que se utilizaron se extrajeron de ramas plagiotrópicas de los dos tercios superiores de la planta, hojas nuevas completamente expandidas de color verde con una longitud de 10 cm, sin la presencia de daños físicos y enfermedades.

Desinfección Superficial y Establecimiento del Explante

Previo a la recolección del material se realizaron aplicaciones para control de plagas y enfermedades. Con los siguientes productos 72 horas antes de la recolección:

Bactericida: Agry-Gent Plus (Sulfato de gentamicina 2% + Clorhidrato de oxitetraciclina 6%) 4 g/L (sistémico y de contacto).

Fungicida: Amistar (20%Azoxystrobin + 12.5%Difenoconazol) 1 mL/L (sistémico).

Las hojas recolectadas se lavaron con agua y jabón, luego, se preparó una solución de Amistar (0.1 g/L) y se sumergieron las hojas por 10 minutos. Transcurrido el tiempo se sumergieron por 5 minutos en una solución de NaOCl al 2% + Tween 80 (Sánchez et al. 2019) . Finalmente, y dentro de la cámara de flujo laminar se realizaron de 3 a 4 enjuagues con agua destilada estéril.

Los explante se cortaron en cuadros de 1 cm x 1 cm, colocándolos en el medio de cultivo con el haz de la hoja hacia abajo, es decir que el haz de hoja está en contacto con el medio.

Medios de Cultivo

Medio de Inducción a Callogénesis

Se usó medio semisólido compuesto por las sales minerales (Macro y microelementos) de Murashige y Skoog a la mitad de concentración (50%), vitaminas de Yasuda (Piridoxina 1 mg/L, A. Nicotínico 1 mg/L, Tiamina 1 mg/L, Inositol 100 mg/L), Cisteína 25 mg/L, reguladores de crecimiento según el tratamiento a evaluar, Sacarosa 30 g/L, el pH del medio fue ajustado a 5.6 y se solidificó con Phytigel 1.8 g/L. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1 kg/cm², 20 minutos.

Los explantes permanecieron 139 días en este medio de inducción en total oscuridad, 21°C, 30% humedad relativa. No se realizó un cambio de medio (refrescamiento) durante este tiempo.

Tratamientos Evaluados para Inducción a Callogénesis.

En el medio de cultivo de inducción a callogénesis se agregaron los reguladores de crecimiento. Se evaluaron tres tratamientos, las dosis en miligramos por litro en cada tratamiento y la nomenclatura usada para nombrarlos se detallan a continuación (Cuadro 1).

Cuadro 1

Tratamientos evaluados en inducción a callogénesis de hojas de café cultivadas in vitro

Tratamientos	Reguladores de crecimiento
Tratamiento testigo	sin reguladores
Tratamiento 2	2,4-D 0.5 mg/L
Tratamiento 2K	2,4-D 0.5 mg/L + Kinetina 1.5 mg/L
Tratamiento 2B	2,4-D 0.5 mg/L + 6-Bencilaminopurina 1.12 mg/L

Medio de Proliferación de Callo

Una vez se obtuvo callos estos se transfirieron a medio líquido compuesto por las sales minerales (Macro y microelementos) de Murashige y Skoog a la mitad de concentración (50%),

vitaminas de Yasuda, Cisteína 25 mg/L, BAP 5mg/L, Sacarosa 30 g/L, el pH del medio fue ajustado a 5.6. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1 kg/cm², 20 minutos.

La separación de los callos del tejido vegetal (explante) se realizó usando el filo de la hora de bisturí estéril. Los callos separados fueron colocados en un matraz Erlenmeyer con medio líquido estéril y agitados contantemente en un agitador orbital a 100 RPM. Se mantuvieron con luz por 16 horas, 28 °C, estos callos permanecieron 57 días en esta etapa de proliferación.

Medio de Diferenciación

Luego de mantener los callos en el medio de proliferación por 57 días, el callo obtenido se filtró en condiciones estériles y transfirió a medio semisólido estéril compuesto por las sales minerales (Macro y microelementos) de Murashige y Skoog a la mitad de concentración (50%), vitaminas de Yasuda, Cisteína 25 mg/L, Sacarosa 30 g/L, el pH del medio fue ajustado a 5.6 Phytigel 1.8 g/L. Los medios se esterilizaron en autoclave a 121 °C, 1 kg/cm², 20 minutos. Los callos permanecieron 30 días en este medio de diferenciación, con luz por 16 horas, 21°C, 30% humedad relativa.

Variables Evaluadas

Se evaluó el porcentaje de explantes con formación de callo. Los callos son proliferaciones de células sobre el explante en este caso en las hojas.

Adicionalmente se contó en cada explante el número de bordes con formación de callo incluyendo la nervadura central usando la escala del Cuadro 2.

Cuadro 2

Escala para evaluación del número de bordes en los explante con formación de callo en láminas foliares de café establecidas in vitro

	0 bordes (Sin reacción)	1 ó 2 bordes	3 ó 4 bordes	4 bordes + nervadura
Valor	0	1	2	3

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Se usó un diseño completo al azar con cuatro tratamientos y 75 repeticiones por tratamiento en el caso de la variedad Lempira y para la variedad Geisha se usó un diseño completo al azar con cuatro tratamientos y 50 repeticiones por tratamiento.

Para el análisis estadístico se realizó un ANDEVA y separación de medias por el método de Duncan con una probabilidad <0.05 . El software estadístico utilizado fue INFOSTAT 2020.

Resultados y Discusión

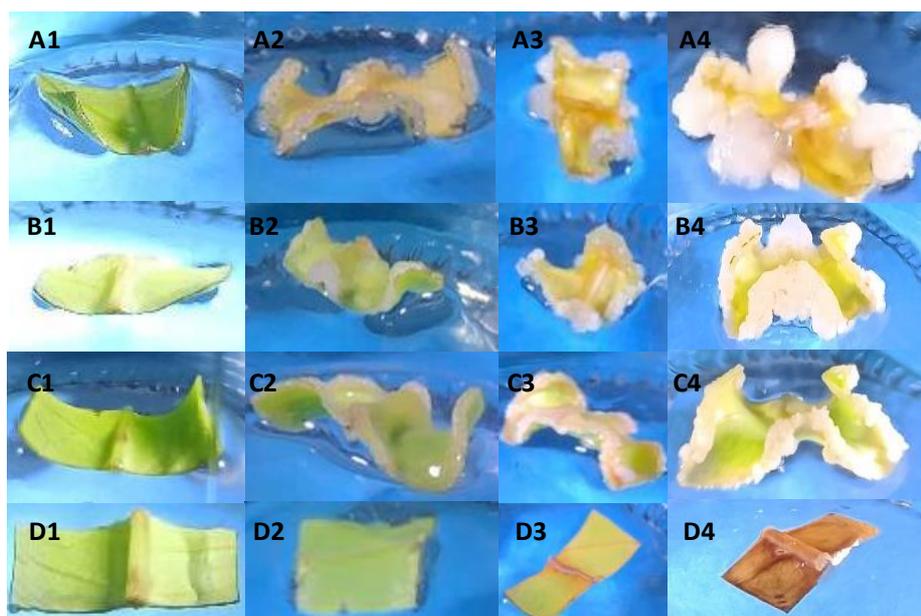
Experimento 1: Establecimiento de Explantes Foliares de Café Variedad Lempira

En los tres tratamientos con presencia de reguladores se observó formación de callo, como se puede observar en la Figura 1. Teniendo respuesta de enrollamiento entre los primeros 6-10 días, similar a lo reportado por Morales (2017) quien también observó enrollamientos de los explantes en los medios con la presencia de reguladores de crecimiento.

A partir de los días 17 y hasta el día 25 se observó el ensanchamiento de los bordes y aparición de callo de color blanco, días posteriores el callo aumentaba su volumen y para el día 31 los explantes presentaban callo en los 4 bordes. Es importante mencionar que, en los tres tratamientos con reguladores de crecimiento, ninguno presentó diferencias significativas en la inducción a callo a los reguladores de crecimiento (Cuadro 3). Los explantes en el medio sin reguladores, no presentaron formación de callo.

Figura 1

Explantes foliares de café variedad Lempira establecidos en medio a inducción a callogénesis con reguladores de crecimiento



Nota. A 2,4-D. B 2,4-D + Kinetina. C 2,4-D + BAP. D Sin reguladores. 1. Día 6. 2. Día 18. 3. Día 31. 4. Día 41.

Sánchez et al. (2019) llevaron a cabo una investigación induciendo embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café (Castillo, Catuaí y Costa Rica 95) en donde obtuvo mayor número de embriones somáticos, aplicando en el medio de cultivo 0.5 mg/L de 2,4-D + 1.5 mg/L de Kinetina. Igualmente Paredes et al. (2017) realizaron inducción de callo en la variedad de café robusta, en donde presentó un gran crecimiento de callo y friabilidad deseada con la aplicación al medio de 2,4-D (0.5 mg/L) y Kinetina (2 mg/L).

Cuadro 3

Porcentaje de explantes con formación de callo y número de bordes con formación de callo en café variedad Lempira a los 52 días

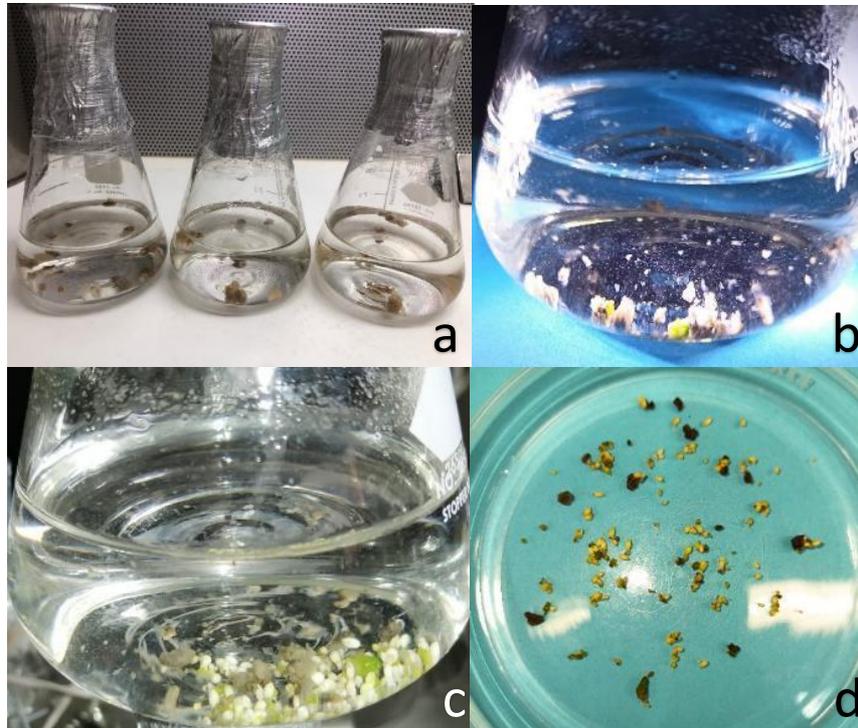
Tratamiento	% de explantes con formación de callo	Número de bordes con callo
2,4-D + Kinetina	97.5 a	1.66 a
2,4-D + BAP	94.87 a	1.41 a
2,4-D	90.0 a	1.53 a
Sin reguladores	0.00 b	0.00 b
CV	2.66	2.91
P	<0.0001	<0.0001
R ²	0.80	0.57

Proliferación de Callo

En la Figura 2, se puede observar los cambios físicos que presentaron los callos en el medio líquido, en el día 32 ya se observaban estructuras individuales redondas que cambiaron de color blanco a verde.

Figura 2

Proliferación de callo formado a partir de explantes foliares de café Variedad Lempira



Nota: a. Proliferación de callo en medio líquido. b. Callo en el día 32 observación de las primeras estructuras de color verde. c. Callo en el día 39 reacción de más estructuras cambiando de color blanco a verde y observación de estructuras redondas. d. Estructuras filtradas después de 57 días en medio de proliferación.

Diferenciación de Embriones Somáticos

En esta fase el callo proveniente del medio de proliferación fue transferido a medio de cultivo semi sólido, sin regulador de crecimiento, este callo presentaba estructuras de color verde y blancas de forma redonda, estas cambiaron de forma y pudimos observar el desarrollo de posibles embriones somáticos. Estas estructuras que parecen ser embriones somáticos fueron observadas en un estereoscopio (10x) (Figura 3). Paredes et al. (2017) obtuvieron estructuras con formas similares a este estudio, los cuales identifican como estructuras embrionarias, es importante mencionar que se utilizaron Nitrato de potasio y reguladores de crecimiento distintos (Ácido α -naftalenacético y

Kinetina) en la fase de proliferación. En base al estudio mencionado y sus resultados, las estructuras observadas en este estudio pueden considerarse como embriones somáticos.

Figura 3

Estructuras observadas en diferenciación de embriones somáticos obtenidos a partir de explantes foliares de café variedad Lempira



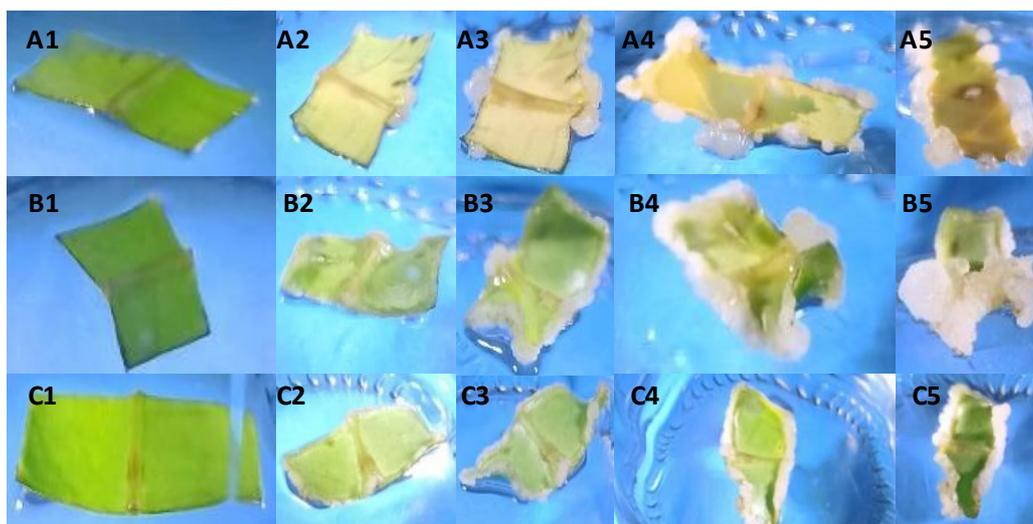
Nota: Barra: 2mm.

Experimento 2: Establecimiento de Explantes Foliares de Café Variedad Geisha

Los tratamientos con presencia de reguladores de crecimiento presentaron formación de callo, como se puede observar en la Figura 4., dentro de los días 18 y 20 se pudo observar la reacción inicial de los explantes como enrollamiento e inicio de la formación de tejido callogénico, en los días 27 - 37 sigue en formación de callo y para el día 44 hay un mayor volumen de callo y se observa presencia de callo en los 4 bordes. Igualmente como lo describe Morales (2017), que estableció explantes foliares de café variedad Geisha.

Figura 4

Explantes foliares de café variedad Geisha establecidos en medio a inducción a callogénesis



Nota: A 2,4-D. B 2,4-D + Kinetina. C 2,4-D + BAP. 1. Día 8. 2. Día 20. 3. Día 27. 4. Día 37. 5. Día 44.

En los tratamientos realizados, estos presentan diferencias significativas, obteniendo buenos resultados en un 100% de explantes con formación de callo en el medio con la presencia de 2,4-D 0.5 mg/L + BAP 1.12 mg/L (Cuadro 4). Morales (2017) presentó formación de callo embriogénico en el medio suplementado con 2,4-D 1.1 mg/L + Kinetina 4.3 mg/L, en variedad Geisha, al igual que Acosta Andrade (2015) quien presentó respuesta del tejido foliar con la formación de callos con medios con concentraciones de 0.25 mg/L a 1 mg/L de 2,4D en *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.

Cuadro 4

Porcentaje de explantes con formación de callo y número de bordes por explante con formación de callo en café variedad Geisha a los 44 días

Tratamiento	% de explantes con formación de callo	Número de bordes con callo
2,4-D + Kinetina	95.83 ab	2.00 a
2,4-D + BAP	100.00 a	2.14 a
2,4-D	88.46 b	1.69 b
Sin reguladores	0.00 c	0.00 c
CV	2.46	2.14
P	<0.0001	<0.0001
R ²	0.84	0.77

Conclusiones

En la variedad Lempira el regulador 2,4-D solo o combinado con Kinetina y BAP induce a la formación de callo embriogénico.

En la variedad Geisha la mejor combinación de reguladores para inducción de callo embriogénico es 2,4-D + BAP.

Recomendaciones

En la variedad Lempira para la inducción a callo usar únicamente el regulador de crecimiento 2,4-D y para la variedad Geisha usar 2,4-D+BAP.

En la variedad Lempira y Geisha, evaluar diferentes tiempos (días) que permanece el explante en la fase de inducción para pasarlos a medio de proliferación, ampliando el tiempo de los 4 meses ya probados en este estudio.

Una vez observadas las estructuras globulares pasar los embriones a medio de maduración y luego a medio de germinación.

Continuar con las próximas fases proliferación y diferenciación de callo en la variedad Geisha.

Referencias

- Acosta Andrade JA. 2015. Embriogénesis somática en café (*coffea canephora* y *coffea arabica*) para su aplicación y adopción de sistemas de micropropagación masal. [Tesis]. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil; [consultado el 2 de jun. de 2022]. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/12103>.
- Alcántara Cortes J, Castilla Pérez M, Sánchez Mora R. 2017. Importancia de los cultivos vegetales Invitro para establecer bancos de germoplasma y su uso en investigación. Biociencias; [consultado el 29 de may. de 2022]. 1(1):71–83. <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/2222>.
- Campos NA, Panis B, Carpentier SC. 2017. Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities. *Frontiers in Plant Science*. 8:1–12. doi:10.3389/fpls.2017.01460.
- Cortijo JD. 2017. El mundo del café. [sin lugar]: [sin editorial]; [consultado el 18 de may. de 2022]. <http://infocafes.com/portal/wp-content/uploads/2017/01/cafe.pdf>.
- Espinosa A, Silva J, Sariego S, Cholo Masapanta L, Delgado H. 2012. Efecto del tipo de explante y la concentración de ácido 2,4-diclorofenoxiacético en la formación de callos en *Morus alba* L. *SciELO*; [consultado el 29 de may. de 2022]. 35(4). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03942012000400006.
- Gatica A. 2002. Regeneración De Plantas De Café (*Coffea arabica* cv. Caturra y Catuaí) Por Embriogénesis Somática Directa A Partir De Segmentos De Hoja [Informe de práctica de especialidad]. Cartago, Costa Rica: Universidad de Costa Rica, Instituto Tecnológico De Costa Rica; [consultado el 18 de may. de 2022]. <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/5647/regeneracion%20de%20plantas%20de%20cafe%20COFFEA%20ARABICAL.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- [ICO] International Coffee Organization. [actualizado 2020]. Aspectos botánicos. International Coffee Organization: [sin editorial]; [consultado el 18 de may. de 2022]. https://www.ico.org/es/botanical_c.asp.
- Lozano Kretschmar GA. 2014. Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica*)-variedad Lempira- a partir de meristemas [Proyecto Especial de Graduación]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; [consultado el 21 de jun. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/68892160-153f-42f9-a105-cc19896a1250/content>.
- Monroig M. 2018. Manual para la propagación del cafeto en Puerto Rico. Puerto Rico: Universidad de Puerto Rico; [consultado el 18 de may. de 2022]. <https://www.uprm.edu/cafe/wp-content/uploads/sites/292/2020/01/Portada-Manual-de-Propagaci%C3%B3n-2018F-merged.pdf>.
- Morales R. 2017. Propagación *in vitro* de café (*Coffea arabica* L.) -variedades Geisha y Sarchimor- a partir de láminas foliares y meristemas axilares [Proyecto Especial de Graduación]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; [consultado el 29 de may. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/6113/1/CPA-2017-072.pdf>.
- Paredes G, Peña C, Jadán M. 2017. Obtención de embriones en fase cotiledonar de Café Robusta (*Coffea canephora*) con el empleo de un sistema de inmersión temporal, mediante la técnica de

- embriogénesis somática a partir de segmentos foliares. *Revista Ecuatoriana de Medicina y Ciencias Biológicas*; [consultado el 2 de jun. de 2022]. 34(1-2):63–83. 10.26807/remcb.v34i1-2.236. doi:10.26807/remcb.v34i1-2.236.
- Paz Ramírez A. 2000. Inducción de embriogénesis somática *in vitro* de *Coffea arabica* a partir de explantes foliares [Proyecto Especial de Graduación]. Honduras: Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano; [consultado el 2 de jun. de 2022]. <https://bdigital.zamorano.edu/server/api/core/bitstreams/f2a600e8-a422-4daa-ba37-725bd6528e71/content>.
- Pincay Bajaña V. 2017. Multiplicación *in vitro* de café caturra rojo *Coffea arabica* L. con la interacción de dos fitohormonas [Tesis]. Guayaquil, Ecuador: Universidad de Guayaquil; [consultado el 29 de may. de 2022]. <http://repositorio.ug.edu.ec/bitstream/redug/18266/1/Picay%20Baja%C3%B1a%20Vanessa%20Juliana.pdf>.
- Sánchez J, Cabrera Pintado R, Jiménez D J. 2019. Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café. *SciELO*; [consultado el 18 de may. de 2022]. 10(2). http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172019000200012&lang=es.
- Thomas C, Jiménez V. 2006. Mode of Action of Plant Hormones and Plant Growth Regulators During Induction of Somatic Embryogenesis: Molecular Aspects. En: Peter N, editor. *Plant Cell Monographs*. [sin lugar]: Springer. p. 157–175 ; [consultado el 18 de may. de 2022]. <https://www.kerwa.ucr.ac.cr/bitstream/handle/10669/77461/2005%20-%20Thomas%20%26%20Jimenez.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- World Coffee Research. [consultado el 19 de jun. de 2022]. Variedades café Arábica. [sin lugar]: [sin editorial]. <https://varieties.worldcoffeeresearch.org/es>.