

Optimización de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*: evaluación de la orientación y punto de origen del explante foliar

Optimization of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*: evaluation of leaf explant orientation and origin

Daniela Vargas-Morera¹, Roselind Vargas-Delgado², Steven Ceciliano-Castro³

Vargas-Morera, D; Vargas-Delgado, R; Ceciliano-Castro, S. Optimización de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*: evaluación de la orientación y punto de origen del explante foliar. *Tecnología en Marcha*. Vol. 37, N° especial. 30 Aniversario del Centro de Investigación en Biotecnología. Noviembre, 2024. Pág. 158-166.

 <https://doi.org/10.18845/tm.v37i9.7620>

- 1 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 daniela.vm@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-5816-3641>
- 2 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 roselind.vargas@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0001-7051-3563>
- 3 Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
 stevenceci858@estudiantec.cr
 <https://orcid.org/0000-0002-0478-6237>

Palabras clave

Cultivo *in vitro*, callo, café, hoja, vitroplanta.

Resumen

El cultivo del café (*Coffea arabica*) en Costa Rica afronta diversos desafíos debido a los cambios climáticos y a las fluctuaciones del mercado. La búsqueda de variedades más resistentes y de mayor calidad ha llevado a explorar métodos de propagación alternativos, como la embriogénesis somática (ES), que permite la multiplicación de nuevas variedades en condiciones controladas de laboratorio. Cuando se realiza directamente, sin callo de por medio, la orientación del segmento foliar y el punto de origen de la muestra poseen influencia evidente en el éxito del explante. Para comprobarlo, en este estudio se evaluó el efecto de la disposición adaxial y abaxial de las hojas de *C. arabica* obtenidas de puntos distales, proximales y mediales de vitroplantas para la inducción de embriogénesis somática directa. Secciones de las hojas fueron introducidas en un medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) suplementado. Se realizó un análisis multivariado para conocer cuál combinación de tratamientos generó una mejor respuesta en la ES, denotado mediando un mapa de calor. Se obtuvo un 36% de callo de regeneración al introducir explantes de forma adaxial con una oxidación reducida. Asimismo, la parte distal y medial exhibieron mayor capacidad de regeneración. La orientación adaxial de las hojas de café aumentó la inducción de embriones somáticos, posiblemente al favorecer el intercambio gaseoso por la característica hipoestomática de *C. arabica*. Con esta optimización, se podría facilitar el proceso de introducción de plantas a partir de hojas con un mayor porcentaje esperado de éxito.

Keywords

In vitro culture, callus, coffee, leaf, vitroplant.

Abstract

Coffee (*C. arabica*) farming in Costa Rica is facing several challenges due to climatic changes and market fluctuations. The search for higher quality and more resistant varieties has led to the research of new alternative propagation methods, such as somatic embryogenesis (SE), which allows the generation of new subspecies under controlled laboratory conditions. Direct propagation, without callus, has a significant influence on explant success depending on leaf orientation and the origin of the sample. To prove this, this work evaluates the effect of the adaxial and abaxial orientation of *C. arabica* leaves obtained from distal, proximal and medial points of vitroplants for the induction of direct somatic embryogenesis. Leaf sections were placed into supplemented Murashige and Skoog (MS) culture medium. Multivariate analysis was performed to know which combination of treatments led to a better response to SE, and it is shown using a heat map. About 36% regeneration callus was produced by introducing explants in adaxial form with decreased oxidation. Furthermore, distal and medial parts exhibited higher regenerative capacity. Adaxial orientation of *C. arabica* leaves promoted somatic embryo induction possibly by enhancing gas exchange due to hypostomatic leaf feature. By optimizing this protocol, the plant introduction process from leaves may be improved with a higher expected success rate.

Introducción

El café (*Coffea arabica*) es uno de los principales cultivos de interés agrícola en el ámbito mundial, con más de 11 millones de hectáreas sembradas y el 80% cultivado en América Latina [1]. En Costa Rica, desempeña un destacado papel agrícola, social y comercial, al ocupar la mayor extensión de tierras dedicadas a cultivos permanentes en el país con 74 437 hectáreas sembradas según la última Encuesta Nacional Agropecuaria [2], [3]. Actualmente, el cultivo de café enfrenta importantes desafíos debido a su alta sensibilidad a las variaciones en los patrones climáticos, aumento de costos de producción, y a las fluctuaciones en el precio del mercado [4]. Esto ha motivado a los productores a explorar nuevas alternativas para asegurar una producción eficiente con variedades con mayor resistencia a enfermedades como la roya (*Hemileia vastatrix*), y variedades con mayor calidad en grano, como Híbrido F1 y Venecia, respectivamente, para adaptarse mejor a las condiciones cambiantes del entorno [5].

El aumento del número de plantas de dichos genotipos potenciales dentro de un programa de mejoramiento genético tradicional es un proceso complejo, considerando que la generación de nuevas variedades con características mejoradas y estables mediante dichas técnicas puede tomar alrededor de 30 años [6]. Ante esto, el cultivo *in vitro* se proyecta como una alternativa para la multiplicación de variedades *de C. arabica* a través del aislamiento de explantes vegetales obtenidos de la planta madre, con características potenciales para su crecimiento en condiciones reguladas dentro de un laboratorio y en un menor período de tiempo, demostrado a través de métodos basados en técnicas cada vez más optimizadas [7], [8]. Entre ellas, la embriogénesis somática (ES) es uno de los métodos biotecnológicos más viables para la micropropagación del café debido a su condición de especie leñosa y con un largo ciclo de vida, facilitando la producción clonal masiva de individuos élite [9].

Durante la ES, las células somáticas tomadas de tejidos como las hojas pueden desdiferenciarse en células totipotentes y reprogramar su desarrollo hacia la vía embriogénica con el estímulo apropiado [10]. En *C. arabica*, el proceso se puede lograr por una vía somática directa con células proembriogénicas formadas directamente desde células del explante foliar, o indirecta con el desarrollo previo de un callo friable del cual emergen estructuras embriogénicas [11]. Se ha reportado la obtención directa de embriones somáticos globulares y torpedo desde la hoja de vitroplantas posterior a 10 semanas de introducción en variedades como Catuaí y Caturra [12]; sin embargo, se ha señalado que en *Coffea* sp. el método indirecto genera mayor cantidad de estructuras tipo torpedo, donde la etapa de desarrollo del explante, edad de la planta, y la orientación de la hoja hacia el medio de cultivo durante la introducción *in vitro* toman relevancia si se busca la eficacia en la embriogénesis directa [13].

La orientación adaxial o abaxial del explante foliar permite el intercambio de gases dentro del frasco de cultivo *in vitro* según la posición de las estomas de la especie, siendo fundamental en la embriogénesis y morfogénesis, a pesar de que las tasas fotosintéticas y respiratorias en cultivos *in vitro* son bajas [14]. Además, la capacidad embriogénica *in vitro* puede depender del equilibrio entre los reguladores del crecimiento endógeno y exógeno, en particular de los niveles de auxinas endógenas, las cuales se concentran en mayor proporción en zonas distales o apicales con respecto a la totalidad de la planta [15]. Para evaluar la incidencia de estos factores, en este trabajo se buscó evaluar la eficiencia en la embriogénesis somática directa según la disposición adaxial o abaxial de hojas de vitroplantas de *C. arabica* var. Caturra obtenidas de desde un punto de origen distal, proximal o medial con respecto a la totalidad de la planta.

Materiales y métodos

El ensayo se llevó a cabo como parte de las prácticas del curso “Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales” de la carrera de Ingeniería en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), en Cartago, Costa Rica, siguiendo metodologías descritas en [16], [17].

Material vegetal. El material vegetal utilizado consistió en vitroplantas de *C. arabica* var. Caturra disponibles para las prácticas docentes de dicho curso. Estas plantas se encontraban en el cuarto de crecimiento del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la carrera de Ingeniería en Biotecnología (ITCR) en un medio con sales M&S [18], complementado con vitaminas [19], 5 mg/L de benciladenina (BA), 15 g/L sacarosa, 125 mg/L de estreptomycin y 3 g/L de Phytigel, con un pH de 5.7, a una temperatura promedio de 24 + 2° C y a un fotoperíodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad, con 90 días de crecimiento [20].

Medio de cultivo. Para la ES de *C. arabica* var. Caturra, se empleó un medio de cultivo basal M&S al 25% (Macroelementos) y 50% (Microelementos) [18], FeEDTA al 50%, así como los siguientes componentes: fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) 42,5 mg/L, piridoxina 1 mg/L, ácido nicotínico 1 mg/L, tiamina 10 mg/L, mionositol 100 mg/L, bencilaminopurina (BAP) 1 mg/L, sacarosa 30g/L, 3 g/L de Phytigel, y se ajustó el pH a 5.6 [16]. El medio se dispensó en frascos de vidrio de 5.2 x 6 x 6-7 cm; con 60 ml para el cultivo *in vitro*.

Preparación del material e inducción de embriogénesis somática. Se extrajeron secciones de hojas de café de aproximadamente 1 cm² de los puntos de origen distales (primer par de hojas de la parte superior de la vitroplanta), medias (hojas de la parte media) y basales (hojas de la parte inferior, más cercanas al medio de cultivo) de vitroplantas seleccionadas. Cada explante se cultivó en un frasco con la orientación de la hoja en posición abaxial (envés hacia el medio de cultivo) o adaxial (haz hacia el medio de cultivo). El material se incubó a una temperatura constante de 26 °C en condiciones de oscuridad durante 60 días, tras los cuales se expusieron a luz directa durante 20 días adicionales [17]. Al final del proceso sobrevivieron 72 explantes.

Análisis estadístico. Las variables de respuesta para este experimento fueron oxidación, regeneración o embriogénesis, y formación de callo, mientras que los tratamientos fueron disposición de la hoja (abaxial, adaxial) y la parte del explante de donde se tomó la hoja (basal, medial y proximal). La evaluación del material se llevó a cabo luego de 80 días del ensayo. Se realizó un análisis multivariado utilizando la herramienta RStudio (v 2023.09.1), utilizando los paquetes; agricolae, factoextra, FactoMineR, pheatmap, RColorBrewer, colorspace y grid, con las variables de respuesta (oxidación, callo y regeneración) y la interacción entre los dos tratamientos establecidos (origen y posición del explante). Para ello se definió una matriz, los componentes principales analizados mediante análisis de covarianza y el análisis de conglomerados, por medio de la determinación de distancias euclidianas. En base a esto se realizó un mapa de calor para determinar cuál combinación de factores (orientación de la hoja y punto de origen en la planta) generó una mayor regeneración en la inducción de embriogénesis somática.

Resultados

La embriogénesis somática de *C. arabica* var. Caturra expuso el crecimiento de callo de cicatrización en las zonas cercanas a los cortes realizados en las hojas luego de 1 mes de incubación. Los ejes embrionarios germinaron en gran parte de los tratamientos 80 días después de la introducción de hoja en posición adaxial desde distintos puntos de origen (Cuadro 1, Figura 1), al igual que tratamientos con la hoja en posición abaxial, pero en menor cantidad.

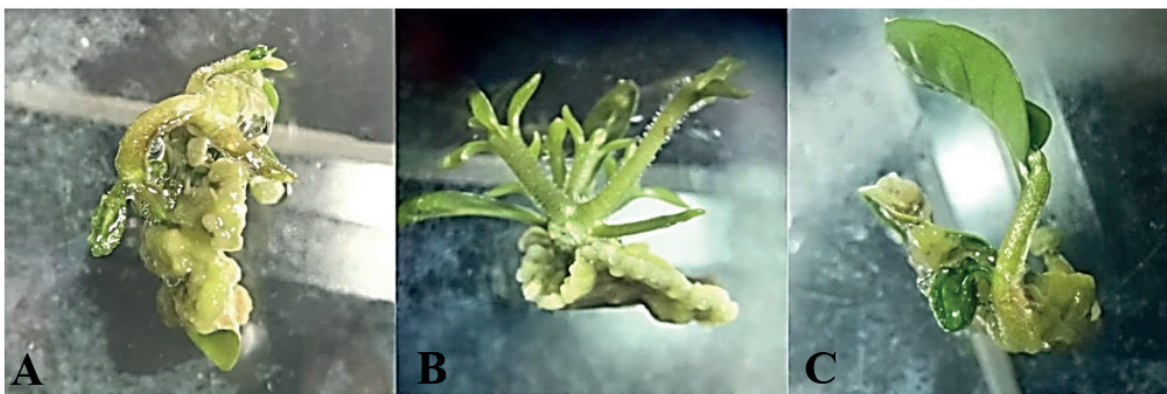


Figura 1. Embriogénesis somática a partir de explantes de hoja de vitroplantas de *Coffea arabica* var. Caturra de origen adaxial-distal (A), adaxial-medial (B) y adaxial-proximal (C) luego de 80 días.

Cuadro 1. Cantidad de explantes obtenidos por tratamiento luego de 80 días de desarrollo.

Orientación de la hoja	Punto de origen	Cantidad de explantes
Adaxial	Distal	12
	Medial	13
	Proximal	12
Abaxial	Distal	12
	Medial	10
	Proximal	13
Total de explantes		72

El análisis de conglomerados aplicado para la cuantificación vectorial dividió los datos en dos grupos, donde se agruparon los datos considerando la proximidad de las medias; es decir, al considerar todas las variables de respuesta conjuntamente, las combinaciones de tratamientos se agruparon en dos conglomerados que presentaron patrones de respuesta similares (Figura 2). La agrupación 1 se conformó por los tratamientos Abaxial/distal y Abaxial/proximal con una suma de cuadrados dentro del clúster (SS) de 0.0190, mientras que en la agrupación 2 se encontraban los tratamientos Adaxial/distal, Adaxial/medial, Adaxial/proximal y Abaxial/medial (SS = 0.1493). El conglomerado 2 exhibió el mayor promedio de regeneración con 0.36 (Cuadro 2). Dicho grupo engloba todas las muestras con disposición de hoja adaxial, y el tratamiento abaxial medial. La relación de SS entre el total de SS es de 46.7% asociado a la dispersión de los datos dentro del grupo de cada clúster.

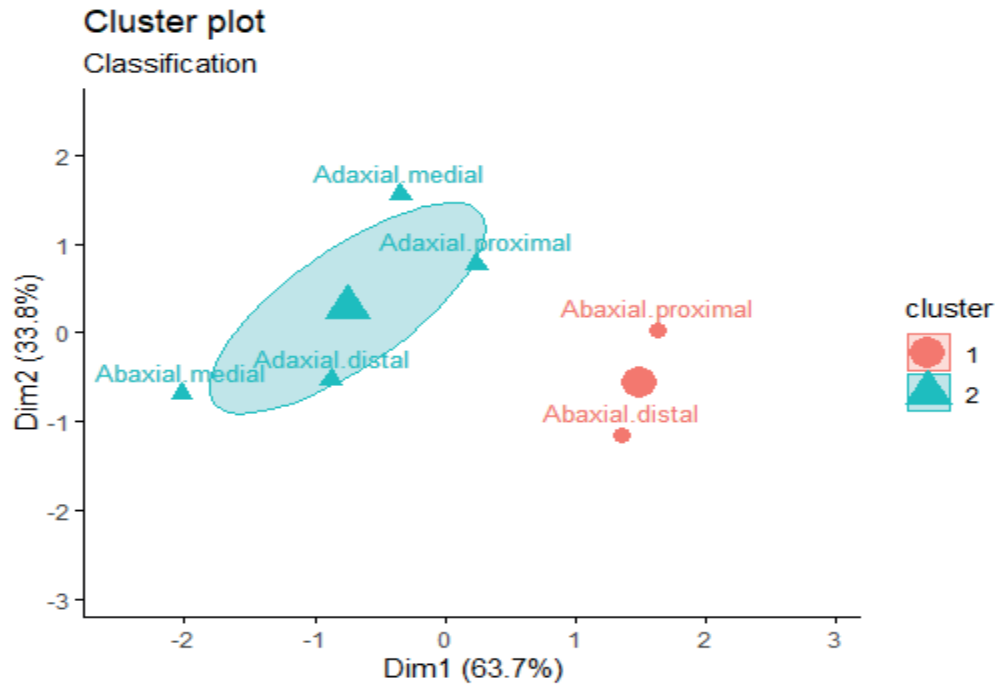


Figura 2. Agrupación de los datos a partir del análisis de clúster por K-medias para diferentes tratamientos de embriogénesis en *C. arábica* var. Caturra en base a su respuesta en callo, regeneración y oxidación, a partir de una métrica de distancia euclídea, un método de enlace completo y dos clúster. Representado con un 46.7% de varianza entre los clúster RStudio (v 2023.09.1).

Cuadro 2. Promedios de respuestas asociadas con la inducción de embriogénesis somática (callo, regeneración y oxidación) obtenidos a partir de explantes de hojas de vitroplantas de *Coffea arabica* var. Caturra a partir del análisis de clúster por K-medias.

Variable	Clúster 1 (Abaxial/distal-proximal) ($n = 25$) (SS=0.019)	Clúster 2 (Adaxial/distal-medial-proximal; Abaxial/ medial) ($n = 47$) (SS=0.15)
Callo	0.68	0.70
Regeneración	0.12	0.36
Oxidación	0.36	0.23

Nota: SS = suma de cuadrados dentro del clúster.

Las respuestas de cada tratamiento fueron representadas en forma de un mapa de calor (Figura 3), donde los colores representan diferentes niveles de respuesta junto a la escala de 0 a 1 donde la mayor cercanía a 1 representa que el tratamiento tiene una influencia significativa en la variable observada. El tratamiento con la hoja abaxial/medial generó más callo (0.92), probablemente relacionado con la cicatrización del tejido, y simultáneamente exhibió el mayor porcentaje de regeneración (0.46), que es la variable principal de interés en este estudio. El segundo tratamiento con mayor regeneración fue el adaxial distal (0.40), seguido del adaxial medial (0.33), indicando que estas partes de la planta permitieron la regeneración. Además, los tratamientos adaxiales restantes también mostraron regeneración, con una oxidación

relativamente reducida. Por otro lado, los tratamientos abaxiales distal y proximal muestran tonos más azulados en cuanto a regeneración, con un valor específico de 0.17 y 0.06, respectivamente, lo que sugiere una respuesta deficiente en esta variable, junto con mayor oxidación.

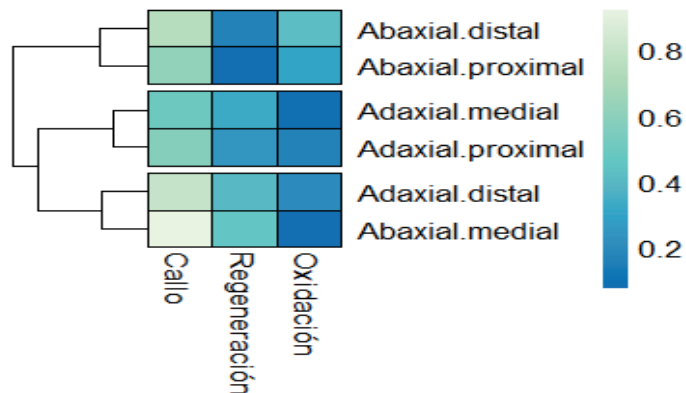


Figura 3. Mapa de calor de respuestas asociadas con inducción de embriogénesis somática (oxidación, regeneración y callo) respecto al tipo de explante de hojas de vitroplantas de *Coffea arabica* var. Caturra.

Discusión

La embriogénesis somática es una técnica importante para la propagación masiva de plantas como *C. arabica* var. Caturra. La posición de la hoja puede contribuir significativamente a la eficacia del proceso de embriogénesis somática, con variaciones que pueden representar hasta un 70% de diferencia en la formación de embriones dependiendo del protocolo y la posición de la hoja [21].

La orientación adaxial de las hojas hacia el medio de cultivo ha demostrado tener una respuesta eficiente y significativa en la formación de callos y embriones en esta especie [22]. Este aspecto posiblemente se debe a la riqueza en células activas de los tejidos epidérmicos y mesófilos presentes en el lado adaxial de la hoja, facilitando la absorción de nutrientes y fitohormonas esenciales para la embriogénesis somática. Además, la característica hipoestomática (estomas en el envés) de las hojas de *C. arábica* favorece el intercambio gaseoso cuando es cultivada con la superficie adaxial en contacto con el medio de cultivo, lo que puede resultar en una formación de callos más eficiente [7].

La regeneración de embriones en *C. arábica* también está estrechamente relacionada con la biosíntesis local de auxinas y sus vías de transporte endógenas [23]. La acumulación de auxinas en los tejidos cercanos a las lesiones promueve la regeneración tisular, siendo fundamental para el proceso de embriogénesis [24]. Asimismo, el punto de origen de la hoja en la planta donadora también desempeña un papel crucial en la inducción de la embriogénesis somática a partir de tejido foliar, ya que las hojas jóvenes/adultas ubicadas en la parte media o distal de la planta son ricas en citocininas y auxinas, estimulando el desarrollo embrionario significativamente [21]. Adicionalmente, los explantes obtenidos de vitroplantas tienden a exhibir la mejor respuesta a la inducción de la embriogénesis somática debido a su composición parenquimatosa, caracterizada por un bajo nivel de diferenciación celular [25].

Se observó que las hojas tomadas de la parte medial de la planta mostraron una mayor capacidad de regeneración. La combinación de hojas con posición adaxial medial generó una respuesta más favorable, seguida de los tratamientos con hojas adaxiales tanto distales, basales y proximales, destacando además una reducida oxidación en el grupo 2, donde se observó un

36% de formación de embriones, mientras que en el grupo 1 fue del 12%. Estas observaciones se basan en un total de 72 inducciones de embriogénesis, en las cuales, la mayoría de los explantes del clúster 2 presentaron una capacidad superior para formar embriones somáticos.

Conclusiones

El cultivo de explantes de hoja de café (*C. arabica* var. Caturra) en posición abaxial mostró regeneración de plantas reducida, pues posiblemente se limita el intercambio gaseoso y conduce a un mayor nivel de oxidación. En consecuencia, se sugiere priorizar el uso de hojas tomadas de la parte medial de la planta, las cuales deben ser colocadas en el medio de cultivo en posición adaxial para obtener mayor porcentaje esperado de éxito en la inducción de la embriogénesis somática con vitroplantas de *C. arabica*. La capacidad de esta especie para originar embriones a partir de tejido somático representa una ventaja en la regeneración de plantas por cultivo de tejidos, siendo de interés para procesos de propagación a gran escala.

Agradecimientos

Los autores agradecen al grupo de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II del Instituto Tecnológico de Costa Rica del año 2023 por su colaboración con el desarrollo de la técnica empleada, así como el uso de los datos obtenidos para esta investigación.

Referencias

- [1] S. Ahmed *et al.*, "Climate Change and Coffee Quality: Systematic Review on the Effects of Environmental and Management Variation on Secondary Metabolites and Sensory Attributes of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*," *Front. Plant Sci.*, vol. 12, Oct. 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.708013.
- [2] R. H. Perez, Y. C. Adriana, A. C. Sancho, M. V. Chinchilla, and J. M. C. Subirachs, "Influencia de un nuevo bioestimulante sobre la floración y fructificación en café (*Coffea arabica* L.)," *Rev. ESPAMCIENCIA ISSN 1390-8103*, vol. 12, no. 1, Art. no. 1, Jun. 2021, doi: 10.51260/revista_espamciencia.v12i1.226.
- [3] Instituto Nacional de Estadística y Censos (INEC), "Resultados generales de la actividad agrícola y forestal.," Encuesta Nacional Agropecuaria 2021, 2021. [Online]. Available: <https://admin.inec.cr/sites/default/files/2022-09/reagropecENAAGR%C3%8DCOLA2021-01.pdf>
- [4] S. Wagner, L. Jassogne, E. Price, M. Jones, and R. Preziosi, "Impact of Climate Change on the Production of *Coffea arabica* at Mt. Kilimanjaro, Tanzania," *Agriculture*, vol. 11, no. 1, Art. no. 1, Jan. 2021, doi: 10.3390/agriculture11010053.
- [5] C. A. Harvey *et al.*, "Transformation of coffee-growing landscapes across Latin America. A review," *Agron. Sustain. Dev.*, vol. 41, no. 5, p. 62, Aug. 2021, doi: 10.1007/s13593-021-00712-0.
- [6] C. M. Avila-Victor, V. M. Ordaz-Chaparro, E. de J. Arjona-Suárez, L. Iracheta-Donjuan, F. C. Gómez-Merino, and A. Robledo-Paz, "In Vitro Mass Propagation of Coffee Plants (*Coffea arabica* L. var. Colombia) through Indirect Somatic Embryogenesis," *Plants*, vol. 12, no. 6, Art. no. 6, Jan. 2023, doi: 10.3390/plants12061237.
- [7] M. E. Aguilar, X. Wang, M. Escalona, L. Yan, and L. Huang, "Somatic embryogenesis of Arabica coffee in temporary immersion culture: Advances, limitations, and perspectives for mass propagation of selected genotypes," *Front. Plant Sci.*, vol. 13, Oct. 2022, doi: 10.3389/fpls.2022.994578.
- [8] H. A. Méndez-Hernández *et al.*, "In Vitro Conversion of *Coffea* spp. Somatic Embryos in SETIS™ Bioreactor System," *Plants*, vol. 12, no. 17, Art. no. 17, Jan. 2023, doi: 10.3390/plants12173055.
- [9] T. Hazubska-Przybył, M. K. Wawrzyniak, J. Kijowska-Oberc, A. M. Staszak, and E. Ratajczak, "Somatic Embryogenesis of Norway Spruce and Scots Pine: Possibility of Application in Modern Forestry," *Forests*, vol. 13, no. 2, Art. no. 2, Feb. 2022, doi: 10.3390/f13020155.
- [10] M. Zhang *et al.*, "Direct and Indirect Somatic Embryogenesis Induction in *Camellia oleifera* Abel," *Front. Plant Sci.*, vol. 12, p. 644389, Mar. 2021, doi: 10.3389/fpls.2021.644389.
- [11] R. Arimarsetiowati, B. S. Daryono, Y. T. M. Astuti, E. Prastowo, and E. Semiarti, "Regeneration and development of *Coffea arabica* L. plants through indirect somatic embryogenesis," *Coffee Sci. - ISSN 1984-3909*, vol. 18, pp. e182078–e182078, Mar. 2023, doi: 10.25186/v18i.2078.



- [12] A. M. Gatica-Arias, G. Arrieta, and A. M. Espinoza, "Direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuai: effect of tricontanol, light condition, and medium consistency," *Agron. Costarric.*, 2008.
- [13] M. S. D. Ibrahim, R. S. Hartati, R. Rubiyo, A. Purwito, and S. Sudarsono, "Direct and Indirect Somatic Embryogenesis on Arabica Coffee (*Coffea arabica*)," *Indones. J. Agric. Sci.*, vol. 14, no. 2, pp. 79–86, Oct. 2013, doi: 10.21082/ijas.v14n2.2013.p79-86.
- [14] J. P. R. Martins, V. Verdoodt, M. Pasqual, and M. De Proft, "Impacts of photoautotrophic and photomixotrophic conditions on in vitro propagated *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae)," *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC*, vol. 123, pp. 121–132, 2015.
- [15] A. M. Capelo, S. Silva, G. Brito, and C. Santos, "Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive," *Plant Cell Tissue Organ Cult. PCTOC*, vol. 103, no. 2, pp. 237–242, Nov. 2010, doi: 10.1007/s11240-010-9773-x.
- [16] J. Sanchéz, R. C. Pintado, and J. J. D, "Inducción de embriogénesis somática a partir de explantes foliares en tres variedades de café," *Sci. Agropecu.*, vol. 10, no. 2, pp. 259–264, Apr. 2019, doi: 10.17268/sci.agropecu.2019.02.11.
- [17] R. M. Cabrera and K. J. Sánchez, *Regeneración de plántulas de café (Coffea arabica L.) mediante embriogénesis somática*. Instituto Nacional de Innovación Agraria, 2022. Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://repositorio.inia.gob.pe/handle/20.500.12955/2038>
- [18] T. Murashige and F. Skoog, "A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures.," *Physiol Plant*, vol. 15, no. 3, pp. 473–497, 1962.
- [19] G. Morel and R. H. Wetmore, "Tissue Culture of Monocotyledons," *Am. J. Bot.*, vol. 38, no. 2, pp. 138–140, 1951, doi: 10.2307/2437836.
- [20] N. R. Martínez, "Establecimiento in vitro de café (*coffea arabica*) variedad cuscatleco por medio de microesquejes'.," bachelor, Universidad De El Salvador, 2014. Accessed: May 22, 2024. [Online]. Available: <https://oldri.ues.edu.sv/id/eprint/13735/>
- [21] A. Gatica-Arias, "Regeneración de plantas de café (*Coffea arabica* cv. Caturra y catuai) por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja," 2002, Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/5647>
- [22] E. Arias-Pérez, C. Lecona-Guzmán, F. Gutiérrez-Miceli, J. Montes-Molina, and N. Ruiz-Lau, "Encapsulation of Immature Somatic Embryos of *Coffea arabica* L. for *in Vitro* Preservation," *Phyton-Int. J. Exp. Bot.*, vol. 90, no. 6, pp. 1741–1748, 2021, doi: 10.32604/phyton.2021.016004.
- [23] K. A. Withers *et al.*, "Auxin Involvement in *Ceratopteris* Gametophyte Meristem Regeneration," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 24, no. 21, Art. no. 21, Jan. 2023, doi: 10.3390/ijms242115832.
- [24] M. Omary, R. Matosevich, and L. Efroni, "Control sistémico de la regeneración de plantas y reparación de heridas." Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://doi.org/10.1111/nph.18487>
- [25] C. M. Avila-Victor *et al.*, "Embriogenesis somatica directa e indirecta en *Coffea arabica* var. Colombia.," *AGROProductividad*, vol. 11, no. 4, pp. 30–36, Apr. 2018, Accessed: Apr. 06, 2024. [Online]. Available: <https://go.gale.com/ps/i.do?p=IFME&sw=w&issn=&v=2.1&it=r&id=GALE%7CA619548664&sid=googleScholar&linkaccess=abs>