

Estudio del proceso de callogénesis en genotipos promisorios de cafeto (*Coffea canephora* P.).

A study of the callogenesis process in promising coffee genotypes (*Coffea canephora* P.)

María Esther González Vega*

RESUMEN

Con la finalidad de obtener callos embriogénicos y luego embriones somáticos de los mismos en el cultivo del café (*Coffea canephora* P.), se cultivaron *in vitro* explantes foliares de ramas ortotrópicas de plantas establecidas en campo. Los medios de cultivo contenían las sales minerales recomendadas por Murashige y Skoog (1962) y como reguladores del crecimiento se estudiaron el 2,4-D (0.5 mg/L) y la Kinetina (2.0 mg/L), así como el RIZOBAC (0.4-1.8 mg/L) para la inducción del callo embriogénico. Se observó que la dosis de 0.9 mg/L de RIZOBAC y 2.0 mg/L de Kinetina favorecieron notablemente la formación de callos embriogénicos de alta frecuencia (46.0-98.7 %). Estos callos cultivados en un medio suplementado con ANA (0.1 mg/L) y Kinetina (0.5 mg/L) originaron embriones somáticos en diferentes estadios de desarrollo.

Palabras clave: Robusta, clones, callos, 2,4-D, Kinetina, RIZOBAC.

ABSTRACT

This research study was aimed at obtaining coffee crop (*Coffea canephora* P.) embryogenic callus and then somatic embryos. Leaf explants from orthotropic branches of plants established in the field were cultured *in vitro*. Culture medium contained mineral salts as recommended by Murashige and Skoog (1962). 0.5 mg/L 2,4-D and 2.0 mg/L Kinetine were studied as growth regulators as well as 0.4-1.8 mg/L RIZOBAC for inducing embryogenic calluses. 0.9 mg/L RIZOBAC and 2.0 mg/L Kinetine doses consistently enhanced embryogenic callus formation (46.0%-98.7%). When these calluses were cultivated in ANA (0.1 mg/L) and Kinetine (0.5 mg/L) supplemented médium they yielded somatic embryos in different development phases.

Key words: Robusta, callus, 2,4-D, Kinetine, RIZOBAC.

INTRODUCCIÓN

El café es uno de los productos agrícolas de mayor importancia a nivel internacional (Toruan-Mathius 1992; Cilas *et al.* 2000) y su valor económico para Cuba, por concepto de exportación del grano, es significativo.

Debido a las diferencias de ploidía entre las especies de café, estas se encuentran aisladas genéticamente y por tanto los programas tradicionales de fitomejoramiento no son factibles de

utilizar, se necesitan hasta 24 años de cruza continuas para obtener una variedad nueva, lo anterior ha ocasionado que se recurra al cultivo de tejidos como alternativa (Sondahl y Lauritis 1992; Ascanio y Arcia 1994; Hamon *et al.* 2000; Etienne *et al.* 2002).

Uno de los sucesos más espectaculares en la historia del cultivo de tejidos de plantas, no sólo por su valor científico, sino por el potencial de aplicación ha sido el descubrimiento de la embriogénesis somática en células cultivadas *in*

* M. Sc. Investigador Agregado del Departamento de Biofertilizantes y Nutrición de las Plantas, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba. E-mail: esther@inca.edu.cu

Recibido: diciembre 17 de 2002. **Aceptado:** marzo 20 de 2003

vitro (Reinert 1958; Stewart *etal.* 1958). Este descubrimiento permitió demostrar la totipotencia de las células de plantas superiores y su capacidad para formar plantas completas (Reinert *etal.* 1977). A partir de entonces el fenómeno de la embriogénesis somática ha sido reportado en más de 300 especies, en un amplio rango de plantas, entre las que se encuentra el café.

Dentro del protocolo de regeneración por embriogénesis somática en *Coffea* spp. existen diferentes etapas o fases por la que pasa el proceso. Cada fase está regulada por diversos factores que se conjugan e interactúan para que el proceso se desarrolle. En la fase inicial o de inducción se debe formar un callo compuesto por células con alta capacidad regenerativa y por ser la fuente inicial de biomasa se debe buscar una población celular que posea alta tasa multiplicativa, sin perder las características fisiológicas y bioquímicas que le permiten regenerar.

Para la inducción de la formación de callos de *Coffea canephora* a partir de explantes foliares se emplean, generalmente, 2,4-D y Kinetina como reguladores del crecimiento. Estos compuestos son factores que controlan y regulan el proceso de formación de callo con potencial embriogénico. En los últimos años se ha dedicado especial atención a nuevos compuestos biológicos que pueden ejercer su efecto regulador sobre sistemas *in vitro* (Cabrera *etal.* 1998; Montes *etal.* 2000; Díaz *et al.* 2002). El RIZOBAC forma parte de estos nuevos productos que han mostrado una actividad biológica similar a la de los reguladores del crecimiento. Tomando en consideración la necesidad de contar, además, con nuevas alternativas que permitan reducir o sustituir el empleo de algunos reguladores del crecimiento en los medios de cultivo, se evaluó el efecto de este bioproducto en la inducción de callos embriogénicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el presente estudio las hojas constituyeron la fuente de los explantes. Se utilizaron hojas de plantas establecidas en el campo, las que fueron tomadas de ramas ortotrópicas de la zona media y superior de la planta por ofrecer menores índices de contami-

nación y del segundo y cuarto nudo tomando como referencia los resultados obtenidos en estudios precedentes al evaluar este aspecto en la var. Robusta, se evaluaron los clones M-229, K-234 y M-28. La desinfección y disección de las hojas se realizó según la metodología propuesta por Santana (1993).

Los explantes se colocaron en tubos de ensayo de 25 x 150 mm conteniendo el Medio de Formación de Callos (MFC). Se utilizaron 5 variantes de medio de cultivo para la inducción de la callogénesis en el café (MFC₁, MFC₂, MFC₃, MFC₄, MFC₅), cuya composición es: Sales MS (Murashige y Skoog 1962) 10 mL; Cisteína-HCL 25 mg/L; Tiamina-HCL 4 mg/L; Mesoinositol 100 mg/L; Sacarosa 30 g/L; Gelrite 2 g/L. Estos medios fueron suplementados con las dosis de auxina, citoquinina y RIZOBAC descritas en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo.

Medio de Cultivo	Regulador del crecimiento	
	Auxina	Citoquinina
MFC-1 (control)	2,4-D (0.5 mg/L)	Kinetina (2mg/L)
MFC-2	RIZOBAC (0.4 mg/L)	Kinetina (2mg/L)
MFC-3	RIZOBAC (0.9 mg/L)	Kinetina (2mg/L)
MFC-4	RIZOBAC (1.8 mg/L)	Kinetina (2mg/L)
MFC-5	RIZOBAC (0.9 mg/L)	—

Con la finalidad de estimular la inducción de embriones somáticos se utilizó un medio de cultivo con igual composición química a las anteriores, pero suplementado con Ácido naftalenacético (ANA) - 0.1 mg/L y 0.5 mg/L de Kinetina.

La esterilización de los medios se realizó en autoclave a 121 °C y 1.5 atmósfera por 15 minutos. El pH en todos los casos se ajustó a 5.6.

Se estudiaron 15 tratamientos con 40 repeticiones cada uno. Se utilizó un diseño completamente aleatorizado. Las variables evaluadas fueron: masa fresca del callo expresada en gramos, utilizando para ello una balanza Sartorius de 0.1 mg de precisión, la coloración del callo (de blanco cremoso a carmelita), la velocidad de crecimiento (de lenta a rápida), la

consistencia del callo (de friable a esponjosa), niveles de Proteínas Totales, para esto se tomaron cinco callos por cada tratamiento (= 2.5 g) se maceró en un mortero con sílice a 0°C, luego:

- Se añadió 1 mL de buffer tris-125 Mm; pH 6.8; Na Cl-50 Mm
- Se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 30 minutos
- Se tomó el sobrenadante y se guardó a -20°C en tubos Eppendorf de 1.5 mL de capacidad hasta el momento del análisis.

La cuantificación del contenido de proteínas totales se realizó por el método de Bradford (1976).

Se evaluó el número de explantes con callos de alta frecuencia de formación de embriones, para el calculo del porcentaje de callos con estas características se utilizó la siguiente expresión:

$$\% \text{ de callos altamente embriogénicos} =$$

$$\frac{\text{núm. de callos altamente embriogénicos} \times 100}{\text{núm. de callos cultivados}}$$

Se evaluó, además, la formación de embriones por tratamiento utilizando una escala de 3 niveles (González 1999), la cual se describe a continuación (Escala 1):

- + Baja frecuencia de formación de embriones somáticos (menos de 50 E.S./callo).
- ++ Formación media de embriones somáticos (de 50-100 E.S./callo).
- +++ Alta frecuencia de formación de embriones somáticos (más de 100 E.S./callo).

Los datos se procesaron estadísticamente realizándose un análisis de varianza bifactorial de clasificación simple, en el caso de las variables cuantitativas, y estimándose las medias según Duncan en caso de significación al 5%, para lo cual se empleó el procesador START (INCA. Versión 4.10/1998).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los niveles de masa fresca obtenidos en cada uno de los tratamientos evaluados difieren significativamente para las combinaciones hormonales estudiadas (Tabla 2)

Tabla 2. Efecto del RIZOBAC sobre la masa fresca del callo (g).

Medio de Cultivo	Clones		
	M-229	K-234	M-28
MFC-1	1.16 d	0.91 e	0.58 f
MFC-2	1.37 b	1.21 c	1.17 d
MFC-3	1.50 a	1.48 a	1.39 b
MFC-4	1.55 a	1.51 a	1.47 a
MFC-5	0.45 g	0.31 h	0.17 i
ES x (±)	0.01***		
C.V. (%)	5.01		

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($\alpha = 5\%$).

Se observó que el medio de cultivo 3 que contenía 2 mg.L⁻¹ de Kinetina y 0.9 mg.L⁻¹ de RIZOBAC fue el de mejor resultado con un valor de 1.5 g de masa fresca del callo en el clon M-229, seguido por el clon K-234 (1.48 g), el clon M-28 aunque difiere significativamente de los anteriores para esta variante, si supera notablemente al testigo, donde sólo se obtuvo 0.58 g de masa fresca. Los menores valores para la variable analizada correspondieron a las combinaciones del medio control y MFC-5 (0.9 mg.L⁻¹ de RIZOBAC y libre de citoquininas) con 0.17, 0.31 y 0.45 g de masa fresca del callo en los clones estudiados. Estos resultados son similares a reportes realizados en diferentes especies, empleando nuevos biorreguladores como inductores de la calogénesis en el café (García 1998; Cevallos 2000) y en otros cultivos de interés agrícola (Montes *et al.* 2000). Resulta además interesante la posibilidad de contar con nuevas alternativas en la composición hormonal del medio de inducción de callos embriogénicos en el café y especialmente tratándose de la sustitución del 2,4-D en dicho balance, conociéndose su efecto como agente desestabilizador de la conformidad genética del material generado en el proceso de morfogénesis de numerosas especies.

De forma general, se pudo observar que existió una mayor capacidad de respuesta a la formación de callo en el clon M-229, evidenciándose la relación entre el efecto genotipo y el balance de los reguladores del crecimiento en la masa fresca de los callos. Resultados similares fueron obtenidos por

Vázquez *et al.* (1998) al reportar variaciones en el peso fresco de los callos de diferentes genotipos de *Coffea arabica*.

Por otra parte se ha reportado en cultivares de yuca (*Manihot esculenta* (runtz)) diferencias notables en el peso fresco de los callos procedentes de un mismo tipo de explante cultivados en idénticas condiciones de medio y de ambiente pero pertenecientes a diferentes variedades de una misma especie. Similares resultados fueron reportados en pimiento (*Capsicum annun*) (Rey *et al.* 1980 citados por Santana (1993)).

En este estudio la dosis de 0.9 mg.L^{-1} de RIZOBAC en ausencia de la citoquinina Kinetina no resultó adecuada para el inicio y desarrollo de la callogénesis en los clones evaluados lo que implica que si bien es factible el empleo de este producto para inducir la callogénesis en cafeto, este a su vez debe combinarse con una citoquinina, lo que se corrobora al analizar los resultados favorables alcanzados con el empleo de ambos suplementos.

Con relación a la cuantificación de las proteínas totales presentes en los callos es válido destacar que es una variable que no depende del clon estudiado y sí del medio de cultivo utilizado (Figura 1). Se observó que en el clon M-229 el tratamiento con 0.9 mg.L^{-1} de RIZOBAC en presencia de 2 mg.L^{-1} de Kinetina indujo niveles proteicos en el callo que no difieren significativamente de los obtenidos con 0.5 mg.L^{-1} de 2,4-D e igual dosis de Kinetina (2.47 y 2.42 mg/g de tejido (bmf), respectivamente) a los 40 días de cultivados, etapa donde los contenidos proteicos aumentaron considerablemente al encontrarse el callo en su fase de crecimiento exponencial, la cual se caracteriza por un intensa multiplicación y división celular, y en la que según reportes, existe una síntesis constante de proteínas (Cevallos 2000).

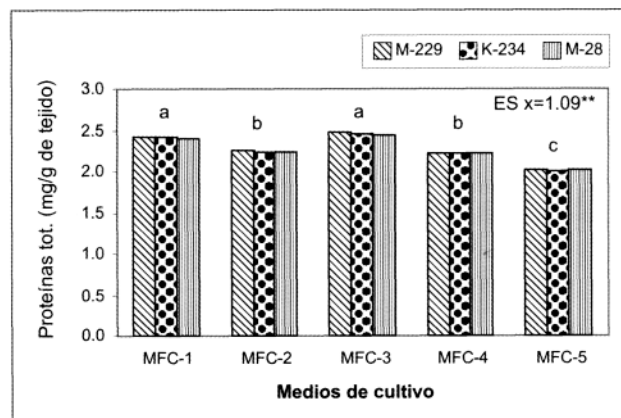


Figura 1. Efecto de los medios de cultivo sobre los niveles proteicos de los callos en los clones evaluados.

El nivel de proteínas más bajo (2.00 mg/g de tejido) se obtuvo con el medio MFC-5, o sea el tratamiento formulado por 1.8 mg/L de RIZOBAC y libre de citoquinina.

Por otro lado, la evaluación del comportamiento de las variables coloración, velocidad de crecimiento y consistencia del callo (Tabla 3), sugiere la existencia de una acentuada diferencia entre las combinaciones hormonales más que por la procedencia del explante (genotipo), sobresaliendo los tratamientos con 0.5 mg.L^{-1} de 2,4-D y 2.0 mg.L^{-1} de Kinetina para los clones M-229 y K-234, así como un buen comportamiento del clon M-229 en presencia de RIZOBAC (0.9 mg.L^{-1}) y Kinetina (2.0 mg.L^{-1}) y del clon K-234 frente a la misma dosis Kinetina y 0.4 mg.L^{-1} de RIZOBAC para la coloración, consistencia y crecimiento del callo. Los callos que fueron tratados con estas combinaciones hormonales presentaron características superiores al resto de los tratamientos, o sea, coloración blanco cremoso, crecimiento rápido y consistencia friable.

Tabla 3. Influencia de las diferentes combinaciones hormonales sobre las variables cualitativas.

Medio de Cultivo	Coloración			Veloc. de Crecimiento			Consistencia		
	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28	M-229	K-234	M-28
MFC-1	BC	B	CC	L	L	L	F	F	FN
MFC-2	B	BC	B	R	R	L	F	F	E
MFC-3	BC	CC	BC	L	R	R	F	FN	E
MFC-4	CC	CO	CC	R	L	R	FN	F	F
MFC-5	B	B	CO	L	L	L	E	E	E

B: Blanco, **BC:** Blanco cremoso, **CC:** Carmelita claro, **CO:** Carmelita oscuro, **L:** Callos formados después de los 30 días y hasta los 40 días, **R:** Callos formados antes de los 30 días, **E:** Esponjoso, **F:** Friable, **FN:** Friable nodular.

No obstante, desde el punto de vista morfológico, los clones mostraron características similares al utilizar una misma combinación hormonal siendo siempre el M-28 el de comportamiento más alejado. Aunque el empleo del RIZOBAC en la callogénesis del cultivo del café no ha sido reportado, su efecto se ha comprobado en otras especies vegetales, fundamentalmente para la estimulación del crecimiento vegetal, con resultados favorables.

De manera general, se pudo observar que la incorporación de este producto en el medio de cultivo favoreció notablemente la formación de callo embriogenia) de alta frecuencia (Tabla 4); sin embargo el comportamiento de los clones sobre los medios evaluados (MFC-2 y MFC-3) difirió significativamente, siendo el clon M-229 el que mayor capacidad de formación de callos embriogénicos de alta frecuencia expresó en ambos medios superando, como se puede observar, al resto de los clones. El clon M-28 resultó el más recalcitrante al proceso de inducción, con porcentajes de 46.0 y 20.5 % en los respectivos medios.

Tabla 4. Efecto del genotipo en la formación de callo embriogénico de alta frecuencia (%).

Medio de Cultivo	Clones		
	M-229	K-234	M-28
MFC-2	89.00 b	80.30 b	20.50 d
MFC-3	98.79 a	81.60 b	46.00 c
ES \bar{x} (\pm)	5.08***		
C.V. (%)	1.98		

Tratamientos con letras iguales no difieren significativamente según Duncan ($\alpha = 5\%$).

El clon K-234 resultó el más estable a las condiciones del medio de cultivo al no mostrar diferencias significativas en su respuesta en los dos medios estudiados. Tanto para el clon M-229 como para el K-234, los dos medios evaluados pueden constituir variantes a utilizar como alternativas de medios de cultivo a pesar de diferir significativamente para el caso del primer clon (M-229).

El clon M-28 se ajustó de manera notable al balance hormonal del medio MFC-3, observándose una disminución marcada en el porcentaje de formación de callos embriogénicos (de 46.00 a 20.50) en el medio MFC-2.

De los resultados obtenidos puede inferirse el efecto marcado del genotipo en la formación del callo embriogénico sobre un mismo medio de cultivo, aspecto que ha sido demostrado por otros autores (Berthouly y Michaux-Ferriere 1996) al estudiar la incidencia de este factor en la respuesta de diferentes materiales de la especie *C. canephora*. Estos resultados confirman la existencia de controles genéticos sobre el comportamiento *in vitro*.

El clon M-229 mostró una alta frecuencia de formación de embriones somáticos en callos procedentes del medio de cultivo MFC-3 y subcultivados posteriormente en el medio para inducción de embriones. Los embrioides se diferenciaron en callos de color blanco-cremoso y carmelita claro, identificándose como puntos de color blanco brillante. Es de destacar que Pierson *et al.* (1983) obtuvieron resultados similares con relación a la diferenciación de embrioides en callos de color blanco, al trabajar con *Coffea canephora*. Sin embargo otros autores (Sondahl y Sharp 1977; Peña 1983) han obtenido mejores resultados en callos de color carmelita al evaluar este aspecto, tanto en *Coffea canephora* como *Coffea arábica*.

Tabla 5. Comportamiento de la formación de E.S. con relación al clon y medio de cultivo estudiado (Escala 1).

Clones	MFC-2	MFC-3
M-229	++	+++
K-234	++	++
M-28	+	+

Durante el desarrollo de esta etapa se observaron embrioides en los diferentes estadios de desarrollo de los embriones somáticos (globular, acorazonado y torpedo). Los clones K-234 y M-28 mostraron un comportamiento más estable a las variaciones en la composición química del medio de cultivo, resultando ser de modo general la frecuencia de formación de embriones para K-234 media (50-100 E.S./callo) (Tabla 5), sin embargo para el clon M-28 este indicador fue bajo (menos de 50 E.S./callo), estos resultados coinciden con los datos obtenidos en la evaluación del porcentaje de callos embriogénicos de alta frecuencia donde el clon M-229 resultó el de mayor potencial embriogénico y el clon M-28 el más recalcitrante a la variable evaluada.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este estudio sobre el proceso de callogénesis en la variedad Robusta se pudo arribar a las siguientes conclusiones:

La adición del biopreparado RIZOBAC a razón de 0.4 - 1.8 mg.L⁻¹ en el medio de cultivo y en presencia de 2.0 mg.L⁻¹ de Kinetina, para la inducción de la callogénesis en explantes foliares de café, constituye una alternativa a considerar como sustituto de la fuente auxínica en el medio de cultivo o para inducir el proceso en clones recalcitrantes a los medios establecidos para este cultivo, siendo más efectiva la dosis de 0.9 mg.L⁻¹ del biopreparado para las condiciones evaluadas.

Se constató el efecto marcado del genotipo en la respuesta de los explantes al proceso de callogénesis, resultando de los clones evaluados, el M-229 el de mayor capacidad de respuesta (89-98% de callos con alta frecuencia de formación de embriones) y el clon M-28 el más recalcitrante a la variable evaluada.

BIBLIOGRAFÍA

- Ascanio E. y M. Arcia 1994. Efecto del estado de desarrollo de la antera y de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. var. Garnica. *Café Cacao The*. 38: 75-80.
- Berthouly, M. and M. Michaux - Ferriere 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell Org. Cult.* 44: 169-176.
- Braddford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein Dye Binding. *Analytical Biochemistry* 12: 248-254.
- Cabrera, J; R. Iglesias; A. Gutiérrez; S. González; E. Diosdado; R. Gómez; D. Agramonte; H. Izquierdo; J. González 1998. Pectimorf: un biorregulador cubano para la Biotecnología Vegetal. En: REDBIO'98-Third Latin American Meeting on Plant Biotechnology, *Agricell Report* 31(1): 3.
- Cevallos, M. 2000. Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del café. Tesis de Grado (Doctor en Ciencias Agrícolas). INCA, San José de las Lajas. 186 p.
- Cilas C.; C. Montagnon; B. Bertrand; C. Godin 2000. Wood elasticity of several *Coffea canephora* Pierre clones. A new trait to be included in selection schemes. *Agronomie*, 20 : 439-444.
- Díaz, B; E. Héctor; A. Torres; H. Vento; Miriam Isidron; N. Garcés; H. Izquierdo; Miriam Núñez; R. Iglesias; Ariannys Roque; E. Pinzón 2002. Sustitución de las hormonas sintéticas por bioproductos de producción nacional en la tecnología de propagación *in vitro* del plátano macho (AAB). EN: AGROTROP-2002 (abril 9-12, La Habana). Memorias CD. ROM. UNIVERSIDAD AGRARIA DE LA HABANA, FACULTAD DE AGRONOMÍA, 2002. ISBN: 959-16-0149-2.
- Etienne H.; F. Anthony; S. Dussert; D. Fernandez; P. Lashermes; B. Bertrand 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 38 : 129-138.
- García, D. 1998. Actividad biológica de análogos Brasinoesteroides sobre la formación de callos embriogénicos en café (*Coffea canephora* Pierre). Tesis de Maestría; UH. (Facultad de Biología). La Habana. 74 p.
- González, María E. 1999. Embriogénesis somática y respuesta a diferentes factores de cuatro clones seleccionados de la var. Robusta (*Coffea canephora* P.) Tesis de Maestría (Maestro en Ciencias Biológicas). Facultad de Biología. Universidad de la Habana. 79 p.
- Hamon S.; F. Anthony; P. H. Barre; J. Berthaud; M. Boursot; N. Chabrilange; M. C. Combes; E. Couturon; J. Cros; S. Dussert; F. Engelmann; P. Lashermes; D. Le Pierres; J. Louarn; M. Noirot; C. Recalt; P. Trouslot; A. Charrier 1998. Coffee Genetic Resources and biotechnologies : their putative uses for breeding. *Cahiers Agricultures*, 7 : 480-487.
- INCA. START: Sistema automático para Análisis Estadístico, (Versión 4.10, 1998) INCA. Disq. 1998.

- Montes, Silvia; J. P. Aldaz, M. Cevallos, J. C. Cabrera y Mirta López 2000. Uso del biorregulador Pectimorf en la propagación acelerada del *Anthurium cubense*. *Cultivos Tropicales* 21 (3): 29-32.
- Murashige, T. and F. Skoog 1962. A revised médium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plants* 15: 473-497.
- Peña, M. 1993. Somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. Simposio sobre Ferrugens do Cafeeiro, o eiras (Portugal) p. 493-512.
- Pierson, E. S.; A. A. M. Van Lammeren; J. H. N. Schel and G. Staritsky. 1983. *In vitro* development of embryoids from punched leaf discs of *Coffea canephora*. *Protoplasma* 115 (23): 208-216.
- Reinert, J. 1958. Morphogenese in ihrem Kontrolle and Gemebekuteren our Carothern. *Notus Winsens Chapten*. 45: 344-345.
- Santana, Nancy 1993. Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.) Tesis de Grado (Doctor en Ciencias Agrícolas). INCA, San José de las Lajas. 124 p.
- Sondahl M. R. y Lauritis J. A. 1992. Coffee. En *Biotechnology of peremial fruit crop*. Ed. for F.A. Hammerchlang y R.E. Litz. CAB International p. 401-420.
- Sondahl, M. R. and W.R. Sharp. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Zeitschrift fur Pflanzenphysiologie* 81 (5): 395-408.
- Steward, F and K. Mears 1958. Growth organized develoment of cultured cells. II-Organization in cultures grown from frely suspended cells. *Am. I. Bot.* 45: 705-708.
- Towan-Mathius N. 1992. Isolation on protoplast culture of *Coffea arabica* L. *Biotrop. Spec. Publ.* 49: 89-98.
- Vázquez R.; K. Salgar; W. Solano; A. Pescira; B. Bertand y H. Etienne 1998. En: Libro de Reportes REDBIO'98- Third Latin American Meeting on Plant Biotechnology. La Habana.