

Producción de sueros hiperinmunes contra los reguladores de crecimiento vegetal, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y kinetina

Production of hyperimmune sera against plant growth regulators, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin

Margarita Ivonne Garrido-Gutiérrez¹, Sergio Zavala-Castillo^{2,3},
Silvia Paola de la Torre-Altamirano¹ y María Dolores Utrera-Barillas¹

¹ Facultad de Ciencia y Tecnología, Universidad Simón Bolívar, México.

² Centro de Investigación y Estudios Avanzados, IPN, México.

³ Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, México.

maguigarrido@yahoo.com

bonita_paola_13@hotmail.com

utreradolores@yahoo.com.mx

Recepción: 27 de junio de 2013

Aceptación: 28 de octubre de 2013

(pp. 164 - 170)

Resumen

La carencia de reactivos de diagnóstico para hacer ensayos inmunológicos en el área de fisiología vegetal planteó la necesidad de fabricar anticuerpos policlonales. En el presente trabajo se elaboraron anticuerpos policlonales a partir de la síntesis de conjugados (hapteno-acarreador) para dos reguladores de crecimiento vegetal, uno de tipo auxina, el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y otro de tipo citocinina, la Kinetina (Kin). La molécula acarreadora fue la proteína albúmina de suero bovino. La inmunización se realizó en conejos hembra de 2.5 kg de peso, de la cepa New Zealand. La cantidad y calidad de los antisueros se evaluaron por medio de las técnicas de precipitación en capilar y doble difusión de Oüchterlony. Se obtuvieron títulos de 1:128 y 1:512 para el suero anti-2,4-D-proteína y el suero anti-Kin-proteína, respectivamente. Además, se distinguieron dos sistemas antígeno-anticuerpo en cada uno de los antisueros elaborados contra cada uno de los conjugados sintetizados. Los resultados evidenciaron que fue posible obtener conjugados hapteno-acarreador con el regulador de crecimiento vegetal Kin, con capacidad para generar la producción de anticuerpos policlonales.

Palabras clave: conjugados, reguladores de crecimiento vegetal, anticuerpos policlonales

Abstract

The lack of diagnostic reagents for immunological plant assays raised the need to produce polyclonal antibodies. In this paper, polyclonal antibodies were developed from the synthesis of conjugated (haptens-carrier) for two plant growth regulators, one of type auxin 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and another type cytokinin, kinetin (Kin). The protein carrying molecule was bovine serum albumin. Immunization was performed on female rabbits weighing 2.5 kg, New Zealand strain. The quantity and quality of the antisera were assessed by means of the capillary precipitation and Oüchterlony double diffusion. Titers were obtained 1:128 and 1:512 for the anti-2,4-D-protein and serum anti-Kin-protein, respectively. We also observed two antigen-antibody systems at each of the antisera produced against each of the conjugates synthesized. The results showed that it was possible to achieve haptens-carrier conjugates with plant growth regulator Kin, capable of generating polyclonal antibodies.

Keywords: conjugates, plant growth regulators, polyclonal antibodies

Introducción

Los inmunoensayos han tenido éxito por décadas en los laboratorios clínicos dado que son tecnologías analíticas de una extraordinaria efectividad. Su uso se expandió para aplicarlos en diversas áreas de investigación, incluyendo la fisiología vegetal (Tchorbadjieva, Kalmukova, Pantchev y Kuyurkchiev, 2005; Fehér, Pasternak y Dudits, 2003; Toonen, Schmidt, Hendriks, Verhoeven, VanKammen y De Vries, 1996) con resultados igualmente positivos. En esta disciplina, se presenta el inconveniente que se trabaja con moléculas que no son antígenos conocidos y por lo tanto, las casas comerciales no producen los anticuerpos contra éstos. Por lo que se establece la necesidad de elaborarlos, para su uso como reactivos de diagnóstico.

Producir anticuerpos policlonales en un animal de experimentación inmunocompetente para moléculas antigénicas es posible y relativamente sencillo. Sin embargo, cuando se trata de moléculas pequeñas y con una pobre inmunogenicidad, denominadas haptenos, la producción se ve limitada o nula. Éste es el caso de los reguladores de crecimiento vegetal, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y kinetina (kin), compuestos centrales en el presente trabajo. Para resolver esta situación, se elaboran conjugados, que consisten en unir los haptenos a proteínas acarreadoras. Las proteínas se emplean dado que son muy inmunogénicas y las más comunes son ovoalbúmina (OVA) y albúmina de suero bovino (BSA por sus siglas del inglés Bovine Serum Albumine).

Para la obtención de conjugados hapteno-acarreador es necesario exponer grupos funcionales en ambas moléculas por medio de solventes adecuados para posteriormente unirlos. La construcción resultante, hereda la propiedad inmunogénica de la proteína y es posible estimular al sistema inmune de un animal inmunocompetente para la obtener anticuerpos contra el hapteno en cuestión. La proporción de anticuerpos generados con el hapteno es mayor, en comparación con los obtenidos para el conjugado y para la misma proteína acarreadora (Rojas-Espinosa, 2006).

Los reguladores de crecimiento vegetal son compuestos determinantes en la morfogénesis vegetal. Conocer su modo de acción y las células blanco implicaría manipular eficientemente los cultivos *in vitro* vegetales, impactando positivamente su productividad. Existen varias estrategias experimentales para investigar lo anterior, incluyendo técnicas

moleculares, por el análisis de ácidos nucleicos y los inmunoensayos. Éstos últimos son sensibles, de bajo costo y útiles para indagar el funcionamiento celular. La razón es que los resultados que generan son informativos y concluyentes, no dan pie a confusiones como los que se obtienen por medio del análisis de los ácidos nucleicos. Para analizar células vegetales no se cuenta con alguno de forma comercial, por lo que en el presente trabajo se produjeron anticuerpos policlonales para dos reguladores de crecimiento vegetal de tipo auxina (2,4-D) y citocinina (kinetina), ambos determinantes para generar respuestas morfogénicas en plantas.

Objetivo

Producir conjugados hapteno-acarreador con el ácido 2,4-diclorofenoxiacético y kinetina con albúmina sérica bovina para producir anticuerpos policlonales en conejos.

Método

Se elaboraron dos conjugados hapteno-acarreador con los reguladores de crecimiento vegetal 2,4-D y kinetina acoplados a la proteína BSA. Se siguió el procedimiento de Yakovleva, Zeravik, Michurai, Formanovsky, Franek y Eremin (2003), con ligeros cambios, para el conjugado con kinetina. Y se modificó el procedimiento para producir el conjugado con 2,4-D por los resultados obtenidos con el método de Knopp (2004).

Síntesis del conjugado Kin-BSA. Se disolvieron 0.2 mmol de kinetina en 1 ml de dimetilformamida. Esta solución se agregó, gota a gota, a otra de 0.2 mmol de glutaraldehído al 25% (p/v) con 0.9 ml de agua destilada. La mezcla de reacción se agitó suavemente por 10 min. Después, se adicionó 2 μ mol de BSA disuelta en 10 ml de solución amortiguadora de carbonatos (0.01 M de hidrocarbonato de sodio, pH 9.6) y se homogenizó por 15 min a temperatura ambiente. Para inhibir las bases de Schiff, mediante su efecto ácido-base, se incorporaron 200 μ mol de tetraborato de sodio. La reacción se incubó por 3 h, a temperatura ambiente, en agitación suave. Posteriormente, el producto se dializó en una membrana con límite de exclusión molecular de 10 kDa contra 3 L de PBS (10 mM de solución amortiguadora de

fosfatos con 0.8% p/v de NaCl, pH 7) 1X (cuatro cambios de la solución), a 4 °C. El precipitado resultante se recuperó por centrifugación a 3 500 rpm durante 10 min. Se almacenó a temperatura de refrigeración, es decir, a 4° C. Se manipuló todas las veces en condiciones de esterilidad.

Síntesis del conjugado 2,4-D-BSA. Se disolvieron 0.2 mmol de 2,4-D en 6 ml de dioxano. A la mezcla se le agregó 1 ml de glutaraldehído al 2.5% (p/v) en una concentración de 0.2 mmol. Se mezcló suavemente por 10 min a temperatura ambiente. Se agregaron 4 μmol de BSA en 20 ml de solución amortiguadora de carbonatos (0.01 M de carbonato de sodio, pH 9.6) y se mezcló por 3 h con 200 μmol de tetraborato de sodio. El producto se dializó contra PBS 1X con 5 recambios en una membrana con límite de exclusión molecular de 12 kDa. El precipitado se recuperó por centrifugación a 3 500 rpm por 10 min. Se almacenó a 4 °C y se manipuló siempre bajo condiciones de esterilidad.

Caracterización de los conjugados. Se hizo por titulación de los grupos amino libres con el ácido 2,4,6 trinitrobencenosulfónico (TNBS, Hermanson, 2005).

Se disolvieron 2.4 mg/ml de cada conjugado en NaOH al 1 N. Para 0.3 ml de la solución del conjugado se le agregaron un volumen de HCl al 1 N, 1.4 ml de solución de bicarbonato de sodio al 4% a pH 8.5 y 1 ml de solución acuosa de TNBS al 0.1%. Se mezcló y se incubó por 2 h a 40 °C. Posteriormente, se incorporó 1 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10% y 0.5 ml de HCL al 1 N. Se mezcló y se leyó la absorbancia a 335 nm. El número de grupos amino libres (n) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$n = (\Delta E \text{ MW}_{\text{prot}}) / (\epsilon_{\text{NH}_2} C_{\text{prot}})$$

donde ΔE es la diferencia de extinción entre el conjugado y la muestra de referencia, MW_{prot} es el peso molecular de la proteína, C_{prot} es la concentración molar de la proteína y ϵ_{NH_2} es el coeficiente de extinción molar de un grupo amino libre de la proteína acarreadora.

Inmunización de conejos y obtención de sueros hiperinmunes. Para la inmunización de los conejos hembra de la cepa *New Zealand* de 2.5 kg con kinetina-BSA, se hizo intradérmicamente con 1 ml de la solución inmunogénica en dosis crecientes, de 0.3 a 1.2 mg, del conjugado disuelto en PBS con 1 volumen igual de adyuvante completo de Freund. Las inoculaciones se hicieron en el lomo de los conejos, en múltiples sitios. La estimulación se hizo por 5 semanas en intervalos de 7 días. Posteriormente, se hicieron inoculaciones intramusculares por intervalos de 7 días por 3 meses con 1 mg del inmunógeno disuelto en PBS y con un volumen de adyuvante incompleto de Freund (Yakovleva et. al., 2003). Terminado el protocolo de inmunización, se sangraron a los conejos en blanco y se obtuvo el suero. Los sueros obtenidos se almacenaron bajo condiciones estériles, en alícuotas a -18 °C hasta su uso.

La inmunización de los conejos hembra de la cepa *New Zealand* de 2.5 kg con 2,4-D-BSA fue hecha intradérmicamente en múltiples sitios. Se inoculó 0.1 ml de conjugado que se preparó con 2 mg de éste, disuelto en 1 ml de solución salina fisiológica estéril y se emulsificó con 1 mL de adyuvante completo de Freund. La estimulación se hizo cada semana durante 8 semanas. A la semana 4, se preparó el antígeno con adyuvante incompleto de Freund. Terminado el protocolo de inmunización y después de 7 o 10 días, se sangró en blanco a los conejos por punción cardiaca. Por último, se obtuvo el suero y se almacenó bajo condiciones estériles, en alícuotas a -18 °C hasta su uso.

Evaluación de la calidad de los antisueros. Durante el curso de las inmunizaciones, se evaluaron la cantidad (título que corresponde a la dilución del antisuero) y cualidad (especificidad, afinidad y sensibilidad hacia diferentes antígenos) de los anticuerpos generados por ambos conjugados. Se sangraron los conejos por la arteria central de la oreja y se analizaron los antisueros por las técnicas de precipitación en capilar y doble difusión de Ouchterlony (Margi, 2004).

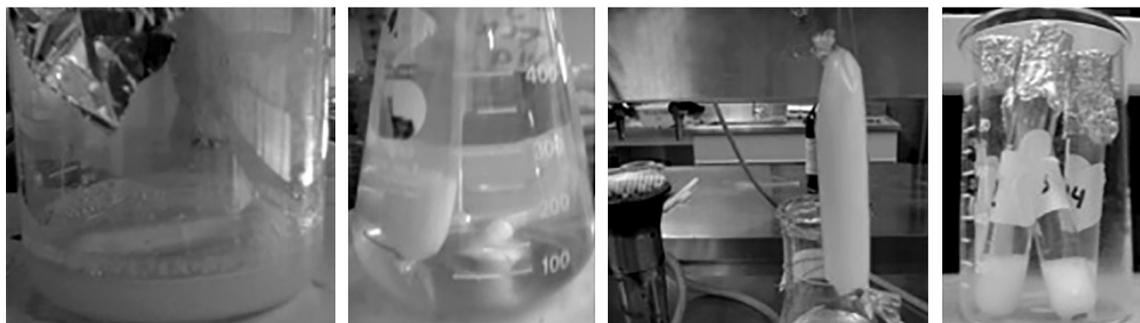
En la precipitación en capilar, se hicieron diluciones seriadas con un factor de 2 de los conjugados en proporción de 0.05 mg/ml en solución salina fisiológica. Se llenaron capilares en partes iguales de la solución del conjugado y del antisuero. Se incubaron por 24 h a temperatura ambiente. El título del antisuero fue la dilución más alta en la que aún se observó precipitado.

Para la doble difusión de Oüchterlony, a portaobjetos limpios y desgrasados con etanol, se les colocó 1 ml de agarosa al 0.3% disuelta en solución salina fisiológica y, después de polimerizar, 2 ml de agarosa al 0.9% en solución salina fisiológica. Se hicieron perforaciones equidistantes de aproximadamente 0.5 cm de diámetro, una central, en donde se colocaron los antisueros, y periféricas a la primera, en las que se agregaron los conjugados en solución (0.05 mg/ml). Se incubaron por 24 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda hecha con cajas de Petri con papel filtro húmedo con agua destilada. Se fotografiaron las bandas de precipitación.

Resultados

Algunas de las fases para la síntesis de los dos conjugados hapteno-acarreador con los reguladores de crecimiento vegetal 2,4-D y Kinetina (haptenos), cada uno con la proteína BSA, como molécula acarreadora, se muestran en la figura 1. Es posible apreciar la consistencia grumosa o viscosa, no líquida, que se produce durante la incubación de la mezcla de reacción, que se hace aún más evidente conforme se termina este periodo (figura 1a y 1c). Con el conjugado Kin-proteína el cambio de consistencia fue menos evidente (figura 1d) que con 2,4-D-proteína (figura 1a). Este estado de agregación perduró después de la diálisis (figura 1b) e hizo difícil disolver el conjugado 2,4-D-proteína en PBS durante su preparación para los posteriores ensayos. No fue el caso para el conjugado Kin-proteína (figura 1c y 1d). Se cambió el procedimiento para producir el conjugado con 2,4-D por los resultados obtenidos con el protocolo propuesto por Knopp (2004). Con este, el producto de la reacción nunca dejó de ser líquido hialino (resultados no mostrados). El procedimiento modificado que se siguió fue el que se expone en método.

Figura 1. Síntesis de conjugados hapteno-acarreador de los reguladores de crecimiento vegetal ácido 2,4-diclorofenoxiacético (a y b) y Kinetina (c y d). Fin de la reacción de síntesis del conjugado 2,4-D-proteína (a), inicio de diálisis del conjugado 2,4-D-proteína (b) y Kin-proteína (c), recuperación del conjugado Kin-proteína de la bolsa de diálisis (d)



La incorporación de los haptenos a la proteína BSA fueron en proporción de 82.1% para el conjugado Kin-proteína y para el 2,4-D-proteína no se pudo calcular debido a que la E fue negativa y los resultados sobrepasaron el 100% de incorporación.

Después de 8 semanas de estimulación con el conjugado 2,4-D-proteína se obtuvo el suero de los conejos inmunizados y se analizaron con la prueba de precipitación en capilar (figura 2a). El título que se obtuvo fue 1:128. Por otro lado, al término del protocolo de inmunización para el conjugado Kin-proteína, la prueba de precipitación en capilar arrojó un título de 1:512 (figura 2b).

Se hizo la prueba de Oüchterlony, en la cual no se obtuvieron bandas de precipitación usando el hapteno como antígeno (datos no mostrados). Al hacerla con los conjugados, se obtuvieron bandas de identidad con los sueros anti-2,4-D-BSA (figura 3a) y anti-Kin-BSA (figura 3b). Estas bandas se aprecian como una continua entre los pozos 2 y 4 de las figuras 3a y 3b. Además, esta técnica permitió identificar los sistemas antígeno-anticuerpo presentes en los antisueros elaborados. En la figura 3, se muestra la existencia de bandas de precipitación adicionales a la de identidad, anteriormente mencionada, evidenciadas por las cabezas de

flecha. De acuerdo con estos resultados, para cada antisuero obtenido, es posible identificar por lo menos dos sistemas antígeno-anticuerpo.

Con la prueba de doble difusión de Oüchterlony no fue posible detectar bandas de precipitación con el suero anti-2,4-D y su antígeno homólogo, el conjugado 2,4-D-proteína (figura 3a, pozos 1 y 3). Sin embargo, hubo reacción cruzada con un antígeno heterólogo, el conjugado Kin-proteína (figura 3a, pozos 2 y 4). Por otro lado, el suero anti-Kin, no mostró reacción cruzada con el conjugado 2,4-D-proteína (figura 3b, pozos 1 y 3).

Figura 2. Prueba de precipitación en capilar con los conjugados 2,4-D-proteína (A) y Kin-proteína (B). Muestras en los capilares de izquierda a derecha, el primer capilar es el suero hiperinmune, a partir del segundo hasta el penúltimo capilar son diluciones seriadas con un factor de dos, último capilar es el antígeno en concentración de 0.05 mg/ml

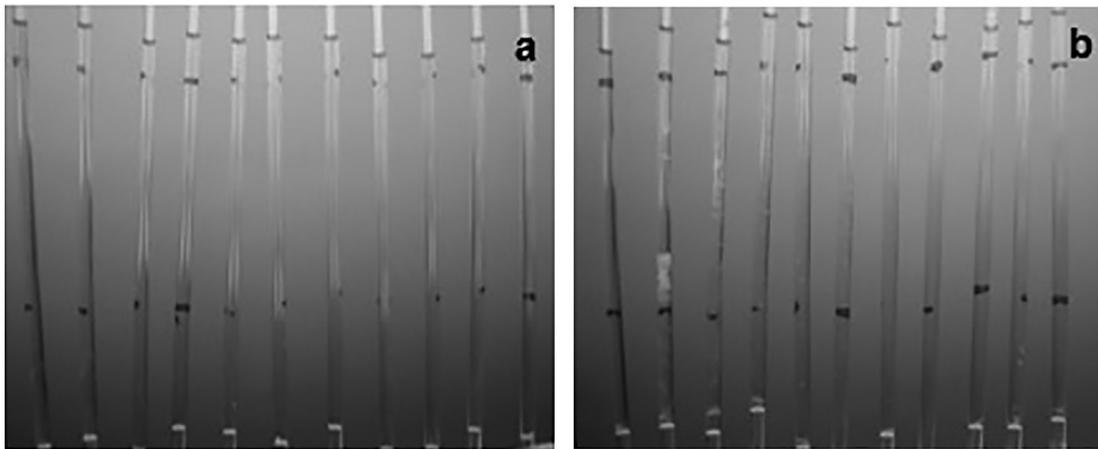
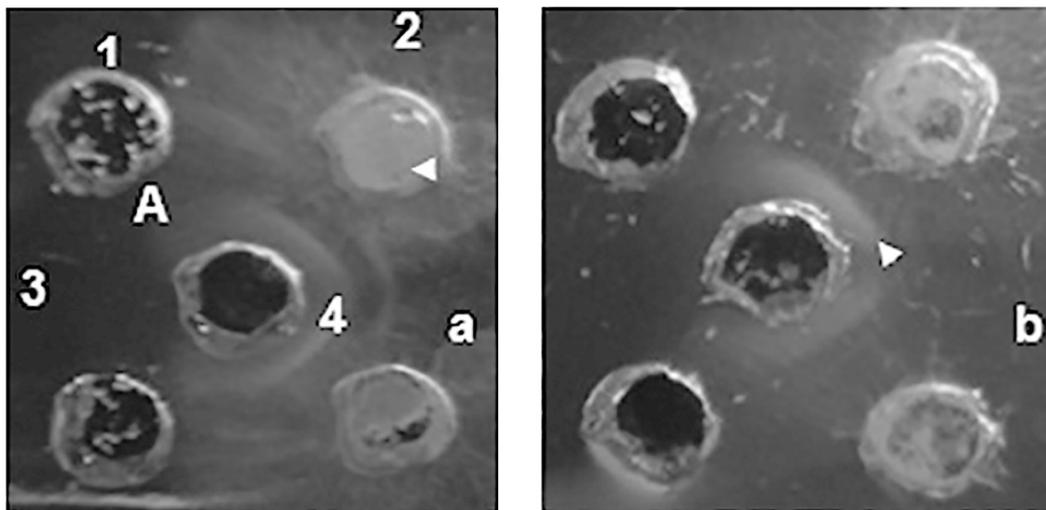


Figura 3. Doble difusión de Oüchterlony de los sueros obtenidos con los conjugados 2,4-D-proteína (a) y Kin-proteína (b). El orden de las muestras es el mismo en ambos paneles. En los pozos centrales (A) se colocó suero anti-2,4-D-proteína (a) y suero anti-Kin-Proteína (b). En los pozos 1 y 3 se cargaron con el conjugado 2,4-D-proteína (en a y b) y en los pozos 2 y 4 el conjugado Kin-proteína (en a y b). Las cabezas de flechas indican bandas de precipitación (ver texto)



Discusión

Se sinterizaron dos conjugados hapteno-acarreador para dos reguladores de crecimiento vegetal determinantes para desencadenar respuestas morfogénicas *in vitro* en vegetales (Cooke, Racusen y Cohen, 1993; Yasuda, Fujii y Yamaguchi, 1985), con el objetivo de producir anticuerpos policlonales, para usarlos como reactivos de diagnóstico en inmunoensayos. Para el compuesto 2,4-D se han diseñado y desarrollado procedimientos por inmunoensayos acoplados a radioisótopos (Knoop, 2005), pues es un contaminante químico muy tóxico (World Health Organization, 1984) y gracias a ellos es posible detectar sus niveles en individuos expuestos. Sin embargo, su aplicación para investigación en el área de fisiología vegetal, como se pretende hacerlo en el presente trabajo, no se ha contemplado. El 2,4-D es el regulador de crecimiento vegetal para inducir el proceso de embriogénesis somática. Establecer los mecanismos de acción de éste en especies vegetales recalcitrantes (Quiroz-Figueroa, Méndez-Zeel, Larqué-Saavedra y Loyola-Vargas, 2001), abriría el camino para la manipulación acertada del proceso, lo que implicaría alcanzar productividades elevadas (Payne, Bringi, Price y Shuler, 1992).

El diseño de los llamados inmunoconjugados para componentes cíclicos y con el grupo benceno, de igual forma, se elaboran (Yacovleva *et al.*, 2003), pero no se tiene informes que se hayan hecho para la molécula de Kinetina, en particular. Existen referencias en donde se han generado anticuerpos contra zeatina, isopentil adenina y para estas moléculas unidas a ribonucleosidos (Nicander, Stálh, Björkman y Tillber, 1993; Morris, Jameson, Laloue y Morris, 1991), todas ellas análogos de Kin. En este sentido, los antisueros obtenidos en el presente trabajo para el conjugado Kin-proteína resultan ser reactivos muy valiosos.

Los conjugados inmunogénicos reguladores de crecimiento vegetal-proteína, se sintetizaron por medio de los grupo amino libres expuestos en la proteína acarreadora, y uniéndolos por el uso de glutaraldehído, como reactivo de acoplamiento (Erlanger, 1973). Este método ha mostrado ventajas debido a que permite a la mayoría de las partes características del hapteno no cambiar, es decir, permanecer inalteradas (Aehringhaus, Wölbing, König, Patrono, Peskar y Peskar, 1982), lo que favorece la generación de antígenos muy parecidos al hapteno original, lo que redundaría en producir antisuero

con anticuerpos específicos. Los resultados de la prueba de doble difusión de Oüchterlony hecha con el conjugado Kin-proteína y con el suero anti-Kin-proteína confirman lo anteriormente expuesto. Pues los anticuerpos obtenidos reaccionaron únicamente con el conjugado que les dio origen, haciéndolos característicos y distintivos para el inmunoconjugado en cuestión. La excepción a tal correlación fue el conjugado 2,4-D-proteína, que en la misma prueba, resultó negativo a la formación de bandas de precipitación de identidad.

Asimismo, el cálculo de la titulación de los grupos amino libres confirma los resultados obtenidos en la prueba de Oüchterlony, pues se obtuvieron 81.23 unidades de lisina usada por la incorporación del regulador de crecimiento vegetal Kin. Lo cual correspondió a 82.13% de BSA ocupada y 17.87% de BSA libre. En cambio, para el 2,4-D la diferencia de extinción entre su conjugado (2,4-D-proteína) y la muestra de referencia (BSA, es decir, E) fue un valor negativo, lo que implica que no hubo incorporación del 2,4-D a la BSA o fue escasa para estimular la formación de anticuerpos en los conejos y ser detectada por el método espectrofotométrico usado. Por lo que las bandas de precipitación observadas en la prueba de doble difusión corresponden únicamente a la reacción cruzada con anticuerpos obtenidos contra BSA, la proteína acarreadora, y no contra el 2,4-D.

De acuerdo con los resultados y tomando en cuenta las referencias bibliográficas con relación a la efectividad del método de síntesis de conjugados usado en el presente trabajo, es menester replantear las pruebas para caracterizar al suero anti-2,4-D-proteína. El empleo de varios isómeros de la molécula 2,4-D (Yacovleva *et al.*, 2003; Aehringhaus *et al.*, 1982) en ensayos tales como ELISA, posiblemente se identificaría a el (o los) determinante(s) antigénico(s) inmunodominante(s) que motivó(aron) los anticuerpos observados y probablemente, identificar si se produjeron algunos contra 2,4-D.

Conclusión

Fue posible obtener conjugados hapteno-acarreador con el regulador de crecimiento vegetal Kinetina, con capacidad para generar la producción de anticuerpos policlonales. 

Referencias

- Aehringhaus, U., Wölbing, R.H., König, W., Patrono, C., Peskar, B.M. y Peskar, B.A. (1982). "Release of leukotriene C₄ from human polymorphonuclear leucocytes as determined by radioimmunoassay". En: *FEBS Letters*. 146(1),111-114.
- Cooke, T.J., Racusen, R.H. y Cohen, J.D. (1993). "The role of plant auxina in plant embryogenesis". En: *The Plant Cell*. 5:1494-1495.
- Erlanger, B.F. (1973). "Principles and methods for the preparation of drugs protein conjugates for immunological studies". En: *Pharmacol. Rev.* 25, 271-280.
- Fehér, A., Pasternak T.P. y Dudits D. (2003). "Transition of somatic plant cells to an embryogenic state". En: *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 74(201), 201-228.
- Hermanson, G.T. (ed.) (2005). *Bioconjugate Techniques*. New York: Academic Press.
- Knopp, D. (2004). "Analysis of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Body Fluids of Exposed Subjects Using Radioimmunoassay". En: *Methods in Biotechnology*, Vol. 19, Pesticide Protocols. Edited by: J. L. Martínez Vidal and A. Garrido Frenich. 119-131. Totowa, NJ: Humana Press Inc.
- Margi, A. (2004). *Inmunología e Inmunoquímica*. 5ta. ed. México: Panamericana.
- Morris, R.O., Jameson, P.E., Laloue, M., y Morris, J.W. (1991). "Rapid identification of cytokinins by an immunological method". En: *Plant Physiology*. 95, 1156-1161.
- Nicander, B., Stålh, U., Björkman, P-O y Tillber, E. (1993). "Immunoaffinity co-purification of cytokinins and y analysis by high-performance liquid chromatography with ultraviolet-spectrum detection". En: *Planta*. 189, 312-320.
- Payne, G., Bringi, V., Price, C. y Shuler, M. (1992). "Somatic embryogenesis". En: *Plant cell and tissue cultures in liquid systems*. 312-325. New York: Ed. Hanser Publishers.
- Coffea arabica* Plant Cell Rep. 20, *Inmunología (de memoria)*
Dactylis glomerata Planta. 222
Planta. 200, 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)". *Environmental Health Criteria Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 83(7-8), Yasuda, T., Fujii, Y. y Yamaguchi, T. (1985). "Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine". En: *Plant Cell Physiol.* 26, 595-597.