

Genética y mejoramiento

Factores que inciden en la germinación y el crecimiento *in vitro* de embriones cigóticos híbridos de *Coffea arabica* L.¹

Ramón Antonio Ramos-Navas,* Wondyifraw Tefera,** Felipe Martínez-Suárez,* Endale Gebre,*** Avelign Mengecha** y Teresa Alemayehu**

Resumen

La investigación se desarrolló en el laboratorio de biotecnología vegetal de Jimma Agricultural Research Centre (JARC) Etiopía, donde embriones cigóticos maduros de tres híbridos de *Coffea arabica* (Abba Buna, MCH₂ y Gawe) fueron cultivados sobre diferentes modificaciones de los medios de cultivo Murashige y Skoogs (1962) MS y Schenk y Hildebrandt (1972) SH para evaluar el efecto de la salinidad y de hormonas reguladoras del crecimiento. El uso de una solución de ácido fórmico (1,6 %) produjo altos niveles (95 %) de descontaminación, sin producir endurecimiento del endospermo y sin efecto tóxico residual. El cultivo *in vitro* de los embriones cigóticos incrementó significativamente la germinación en los tres híbridos, comparado con la siembra de semillas en viveros. La orientación del embrión y la concentración de citoquininas tienen efectos significativos sobre la tasa de germinación. Estos factores juntos con la combinación del medio basal y las condiciones de iluminación también muestran efecto sobre la longitud de la raíz y el tallo de las plántulas. Los niveles altos en la concentración absoluta de fósforo, la relación de nitrógeno, fósforo, así como la concentración absoluta de sales en el medio SH, favorecieron el desarrollo y elongación de las raíces de los embriones cigóticos en los tres híbridos. La aclimatización y tasa de supervivencia de las plantas resultantes fue mayor al 80 %.

Palabras clave: *Coffea arabica*, híbridos de café, café etíope, cultivo de tejidos, embriones cigóticos.

Abstract

The research was conducted at the Plant Biotechnology Laboratory of the Jimma Agricultural Research Centre (JARC) Ethiopia, where Mature zygotic embryos of three *Coffea arabica* hybrids (Aba Buna, MCH₂ and Gawe) were sequentially cultured on different modifications of Murashige and Skoog's (1962), MS, and Schenk and Hildebrandt (1972), SH, media to test the effects of plant growth regulators and salinity. The use of formic acid solution (1.6 %) produced high levels (90 % to 100 %) of decontamination, without hardening-off the endosperms and without any toxic residuals. *In vitro* zygotic embryo culture had significantly increased germination of the three Ethiopian *Coffea arabica* hybrids, compared to seeds sown in the greenhouse. Both, embryo orientation and cytokinin concentration had significantly affected germination rate. These factors together with basal media combinations and illumination conditions also showed variable effects on the length of roots and shoots of the seedlings. The high level in the absolute concentration of phosphate, the relative concentrations of N and P, as well as the least absolute salt concentration of SH medium had favoured better development and root elongation of the zygotic embryos of the three coffee hybrids. The acclimatization and survival rate of the resulting plantlets was more than 80 %.

Key words: *Coffea arabica*, coffee hybrids, Ethiopian coffee, culture tissue, zygotic embryo.

¹ Recibido: 10/2015

Aprobado: 14/12/2015

*Estación Experimental Agro-Forestal UCTB Tercer Frente, Santiago de Cuba, Cuba, genetica1@tercerfrente.inaf.co.cu

**Jimma Agricultural Research Centre (JARC), Ethiopian Institute of Agricultural Research.

***Ethiopian Institute of Agricultural Research (EIAR)

Introducción

Los embriones de la semilla del café se encuentran dentro del endospermo, en la parte basal del grano, cubiertos por dos capas: el pergamino y la película plateada (Nicolas, 2004).

Las fases específicas en las que el embrión se encuentra en cualquier momento, globular, corazón, torpedo y cotiledonar, se relacionan principalmente al volumen y consistencia del endospermo de las semillas.

El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de café es una herramienta importante para estudiar los diferentes factores asociados con el crecimiento de los órganos de las plantas, así como los aspectos metabólicos y bioquímicos en la germinación de la semilla, que son difíciles de estudiar mientras el embrión esté dentro de la semilla, donde existe una pronunciada interferencia de otros tejidos. Esta técnica también ayuda a la multiplicación de los híbridos, en los casos donde el híbrido posea endospermos imperfectos o letales que inhiban el crecimiento y desarrollo del embrión (López, 1990).

Igualmente, en el género *Coffea*, el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos maduros obtenidos de cruzamiento interespecífico es una poderosa herramienta para el éxito en el desarrollo de nuevos híbridos. Sin embargo, existen pocos reportes del cultivo de embriones cigóticos en café (Collonna, 1972). Esta investigación se ejecutó con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes factores

sobre la germinación y el crecimiento y desarrollo *in vitro* de embriones cigóticos y su supervivencia *ex vitro*.

Materiales y métodos

La investigación fue conducida en el laboratorio de biotecnología de Jimma Agricultural Research Centre (JARC) Etiopía, entre enero de 2005-agosto de 2007. Muestras de semillas de tres híbridos (Aba Buna, MCH₂ y Gawe) fueron obtenidas de la división de genética y mejoramiento del centro, luego de una polinización manual cuidadosa de las líneas progenitoras en las temporadas de cruzamiento de 2005 y 2006. Las semillas se seleccionaron posteriormente en el laboratorio basado en su apariencia, color y sanidad.

Estas semillas fueron desinfectadas en dos fases, usando cuatro tipos de desinfectantes a diferentes concentraciones y tiempo de contacto. En todos los casos, las semillas se sumergieron en una solución de ácido fórmico al 1,6 % por 30 min y se lavaron tres veces con agua destilada estéril; consecutivamente, estas fueron sumergidas en una solución de ácido bórico al 0,5 % por 72 h.

En la segunda fase, las semillas fueron tratadas con una solución de hipoclorito de sodio, hipoclorito de calcio, peróxido de hidrógeno o blanqueador local (Barakina), a diferentes concentraciones y tiempos de contactos (Tabla 1). Finalmente, las semillas tratadas fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril a la que se adicionó cisteína hasta lograr una concentración de 25 mg/L.

Tabla 1. Desinfectantes químicos, concentración y tiempo de contacto usado para la esterilización de las semillas híbridas de café

Tratamiento	Desinfectante químico	Concentración (%)	Tiempo de contacto (min)
I	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	3	10-15
II	Hipoclorito de calcio	10	10
III	Hipoclorito de sodio	20	15
IV	Barakina (5 % Cl activo)	25	15

Luego de esterilizar las semillas, los embriones cigóticos fueron extraídos asépticamente de las semillas, siguiendo el procedimiento descrito por Ramos y col. (2001). Los embriones fueron separados haciendo dos cortes longitudinales en la superficie del endospermo donde el embrión está localizado. Luego, la cubierta del endospermo fue removida cuidadosamente hasta de-

jar al embrión completamente expuesto. También, para facilitar la extracción del embrión se puede presionar cuidadosamente la parte de la semilla donde este está localizado.

Seguidamente, es capturado con el bisturí e inoculado en el medio de cultivo de dos diferentes formas. En el primer caso, los polos meristemáticos y apicales en

contacto con el medio de cultivo siguiendo su orientación natural, mientras en el segundo caso solo el meristemo apical del embrión en contacto con el medio de cultivo.

Los medios basales SH (Schenk e Hildebrandt, 1972) y MS (Murashige y Skoog, 1962) sin hormonas reguladoras del crecimiento fueron usados para evaluar el efecto de la concentración de sales en el medio sobre la elongación de la raíz y el crecimiento del tallo del embrión cigótico.

El medio basal suplementado con diferentes concentraciones de BAP (Bencil amino purina), ANA (ácido naltalen acético) y GA₃ (ácido gibberélico) (Tabla 2) fue también evaluado. Como tratamiento control, los embriones fueron cultivados sobre medio basal SH sin hormonas reguladoras del crecimiento. En todos los casos, 25 mg/L L-cisteína y 30 g/L de sacarosa fueron adicionado al medio de cultivo y el pH se ajustó a 5,75 prior esterilización. Los medios de cultivos fueron gelificados con agar-agar 0,8 % (m/v) y esterilizados mediante autoclave a 121 °C por 15 min.

Tabla 2. Combinación de reguladores del crecimiento de plantas usadas en el experimento

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)	GA ₃ (mg/L)
1	0,02	0,02	
2	0,04	0,02	
3	0,2	0,02	
4	0,5	0,02	
5	0,8	0,02	
6	0,02	0,02	0,04
7	0,02	0,02	0,05

Todos los cultivos fueron mantenidos en alternancia de condiciones de luz y oscuridad a temperatura de 26 + 2 °C en el cuarto de crecimiento. A lo largo del período experimental, observaciones y evaluaciones periódicas fueron tomadas a un intervalo de tiempo de 10 días con excepción de la última evaluación, la cual se realizó al final de cada experimento, luego de 45 días. Porcentaje de germinación y longitud del hipocótilo y la raíz fue evaluado. Plantas con más de tres pares de hojas (luego de 10 semanas de cultivo) fueron transferidas a condiciones de aclimatización y endurecimiento, para lo cual las plántulas fueron sembradas en potes plásticos llenados con una mezcla de suelos, arena y pulpa de café descompuesta en proporción 2:1:1.

El experimento se desarrolló en un diseño completamente aleatorizado con cincuenta réplicas por tratamiento y cada una formada por dos embriones por frasco de cultivo. El análisis estadístico fue realizado usando ANOVA y las medias fueron separadas usando la prueba de Rangos Múltiples de Duncan.

Resultados y discusión

El uso de la solución de ácido fórmico (1,6 %) aumentó los niveles de desinfección de la semilla al 98,5 % como promedio, sin ningún problema de endurecimiento del endospermo y sin producir efecto tóxico residual sobre las semillas tratadas.

Por otro lado, el uso de las diferentes concentraciones de bicloruro de mercurio (HgCl₂) y la solución de etanol al 95 % se encontraron dañinas para las semillas del café (Collonna, 1972). Sin embargo; compuestos per-clorado a diferentes concentraciones han sido eficientes en la esterilización de la semilla, debido a la facilidad de removerlos con agua, sin dejar residuos tóxicos sobre las semillas de café (Collona, 1972; Sondahl y Loh, 1988 y Raghuramulu *et al.*, 1989). La solución de ácido bórico (H₃BO₄) al 0,5 % sirvió como bacteriostático, evitando la contaminación cruzada de las semillas durante la imbibición en el agua destilada y estimuló la germinación. Estos resultados están en correspondencia directa con lo reportado por Ramos y col. (2002), quienes obtuvieron resultados similares al trabajar con selecciones de *Coffea arabica* en Cuba.

Los diferentes desinfectantes químicos evaluados en este experimento mostraron diferencias significativas respecto a su capacidad para el control de la contaminación. De todas las soluciones desinfectantes utilizadas, el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) reportó los mayores porcentajes de semillas de café desinfectada (95 %), seguido del hipoclorito de sodio (92 %), hipoclorito de calcio (91 %) y Barakina (91 %). Sin embargo, los embriones de café obtenidos de semillas tratadas con el peróxido de hidrógeno fueron oxidados más fácilmente que los tratados con los desinfectantes.

En algunos casos, embriones haploides de café son formados en los frutos durante las primeras fases de desarrollo de la cereza, aunque ellos no pudieran lograr la fase de desarrollo completo de retenerse en el tejido maternal. Por consiguiente, para asegurar su completo crecimiento y desarrollo en una planta viable, es indis-

pensable aislar tales embriones cuidadosamente en la fase apropiada y seguidamente cultivarlos en medios de cultivos apropiados. Como resultado, esta técnica de escisión podría efectivamente ayudar a obtener plantas de café haploide mediante el crecimiento de tales embriones *in vitro* sobre un medio artificial apropiado. En concordancia con esto, Couturon (1982) obtuvo embriones haploides de semillas inmaduras de *C. canephora* y los cultivó mediante injertos.

El cultivo *in vitro* de embriones mejoró la tasa de germinación de los híbridos de café por encima del 95 % al compararlo a la germinación *ex vitro* de semillas; también esta técnica ayuda a identificar con relativa facilidad las semillas con el embrión dañado y ausente. No se observaron diferencias significativas sobre el porcentaje de germinación entre los diferentes tratamientos (luz y/o orientación del embrión) evaluados en este experimento (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de varios factores sobre la germinación *in vitro* de embriones cigóticos de híbridos de *Coffea arabica* L.

Tratamiento	Germinación (%)
1. Fotoperíodo	
• 8 h luz + 16 h oscuridad	93,5
• 24 h oscuridad	90,3
2. Medio de cultivo	
a) 0,02 BAP (mg/L) y 0,02 ANA (mg/L)	96,4 b
b) 0,04 BAP (mg/L) y 0,02 ANA (mg/L)	96,2 b
c) 0,2 BAP (mg/L) y 0,02 ANA (mg/L)	70,5 bc
d) 0,5 BAP (mg/L) y 0,02 ANA (mg/L)	70,5 bc
e) 0,8 BAP (mg/L) y 0,02 ANA (mg/L)	65,3 c
f) 0,02 BAP (mg/L), 0,02 ANA (mg/L) y 0,04 GA ₃ (mg/L)	100 a
g) 0,02 BAP (mg/L), 0,02 ANA (mg/L) y 0,05 GA ₃ (mg/L)	99,3 a
3. Orientación	
• Polo radicular y apical sobre el medio de cultivo (posición natural en la semilla)	97,2
• Polo radicular sumergido en el medio de cultivo	95,1

Medias con letras iguales en una misma columna, no difieren estadísticamente para $\alpha = 0,05$.

Aunque el medio de cultivo 6 (de contenido 0,02 mg/L BAP, 0,02 mg/L ANA y 0,04 mg/L GA₃) brindó el mayor porcentaje de germinación, los beneficios de estos porcentajes no son estadísticamente significativos al relacionarlos con el medio de cultivo 7 (Tabla 3). Los resultados de este experimento han revelado la estimulación de la germinación de embriones cigóticos debido a la inclusión de BAP en el medio de cultivo. Sin embargo, reducción significativa en el porcentaje de germinación fue observada con el uso de BAP a concentraciones mayores que 0,2 mg/L debido a la formación de tejidos callosos (Fig. 1). Por lo tanto, es esencial evaluar y tomar la dosis óptima de fitohormona para explotar sus ventajas en el rescate de embriones. Además, niveles de

BAP más allá del óptimo declarado también retardaron el crecimiento de la raíz. En línea con estos resultados, Madhava y Sreenivasan (2004) reportaron promoción en la germinación de embriones cigóticos inmaduros de *Coffea arabica* L. cv. Cauvery (Catimor) debido a la aplicación de citoquinina. Ellos observaron que el BAP fue más efectivo que kinetina e isopenteniladenina (2-*ip*).

Los embriones extraídos de las semillas maduras mostraron una longitud media de 3-4 mm con dos cotiledones de color blanco en el momento de la inoculación en el medio de cultivo (Fig. 1). Resultado similar fue encontrado por Nicolas (2004), quien planteó que los embriones de café, cerca de 3-4 mm de longitud, están compuestos del hipocótilo y dos cotiledones.

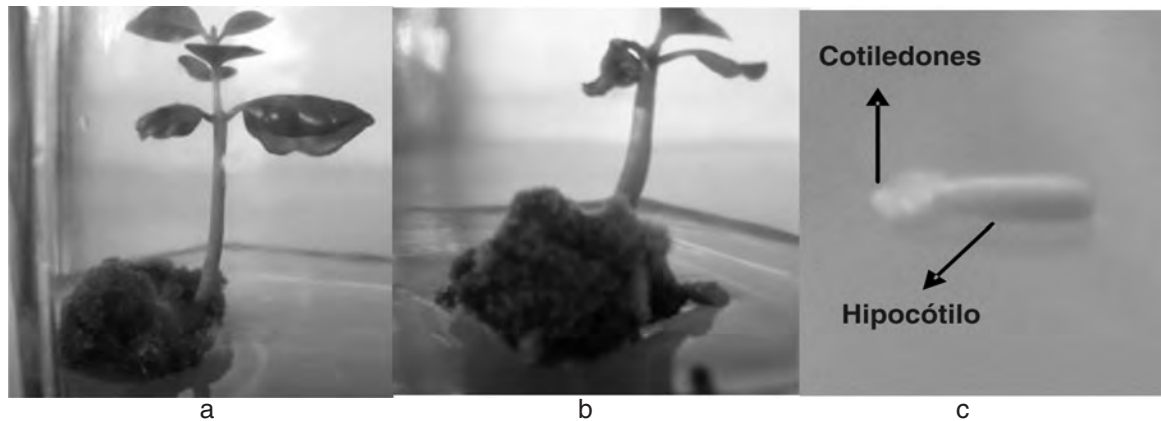


Fig. 1. Formación de callos en plantas de café, obtenidas a partir de embriones cigóticos en el medio de cultivo 5 formado con 0,8 mg/L BAP y 0,02 mg/L ANA. Aba Buna (a) y MCH_2 (b). Embrión en el momento de inoculación en el medio de cultivo (c).

A diferencia del porcentaje de germinación, diferencias significativas fueron observadas entre los tres tipos de medios basales usados respecto a la longitud del tallo y la raíz. En el medio basal SH se encontraron los tallos (0,87 cm) y las raíces (0,85 cm) más largas (Fig. 2). El

segundo mejor medio fue $\frac{1}{2}$ MS, el cual reportó 0,65 cm y 0,64 cm longitud del tallo y la raíz, respectivamente, mientras MS mostró los menores resultados (0,62 cm y 0,57 cm para la longitud del tallo y la raíz, respectivamente).

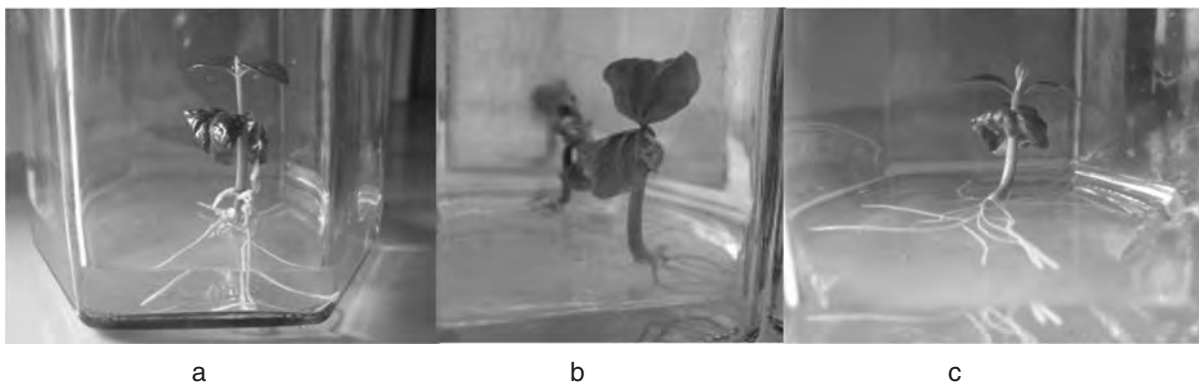


Fig. 2. Plantas de café a partir de embriones cigóticos cultivados en medio basal SH luego de 12 semanas. Aba Buna (a), MCH_2 (b) y Gawe (c).

El mejor comportamiento de los embriones en el medio basal SH sobre el MS podría deberse a la más alta concentración del ion fosfato (2,5 mM) en el primero, en comparación con 1,5 mM en el segundo. Además, el medio SH también presenta una relación (11:1) de nitrógeno y fosfato favorable, a diferencia del medio MS (40:1). Encima de esto, la más baja concentración absoluta de las sales en el medio SH (3,4 g/L) en contraste con el medio MS (4,5 g/L) podría ser otra razón por el comportamiento relativo pobre de los embriones en este último medio.

Altos niveles de concentración salina en los medios basales no son favorables para el desarrollo del embrión y es-

pecíficamente de la raíz. Esta situación se intensifica cuando la relación de N/P es inadecuada. En concordancia con estos resultados, Cruz y col. (1990) reportaron los niveles medios de concentración de sales como los mejores para el desarrollo de las raíces de embriones cigóticos de *Coffea arabica*, similares a los encontrados en el medio basal SH. Los efectos de una proporción inadecuada de N:P:K se ven atenuados a bajos niveles de concentración de sales. Ellos encontraron también que la proporción de los elementos N:P:K en la solución mineral es en general más importante que la concentración de absoluta de sales en el medio para la iniciación y desarrollo de la raíz.

Los tratamientos a la oscuridad y a la luz revelaron efectos significativos sobre el crecimiento *in vitro* de embriones germinados luego de 20, 30 y 45 días de cultivo. Diferencias no significativas fueron observadas entre los

tres híbridos con respecto a estos tratamientos. Embriones cultivados en la oscuridad produjeron tallo más largo y raíces más cortas que los cultivados a la luz durante todo el período de evaluación (Fig. 3).

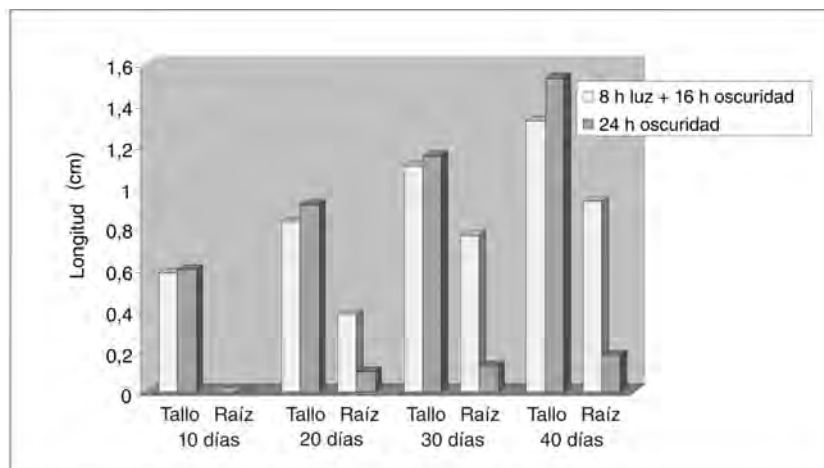


Fig. 3. Efecto del fotoperíodo sobre la longitud del tallo y la raíz de embriones cigóticos de híbridos de *Coffea arabica* cultivados *in vitro*.

Por otro lado, en los casos donde el polo radicular no estuvo expuesto al medio de cultivo, el crecimiento de la

raíz y el tallo fue mucho menor que cuando este polo estuvo expuesto (Fig. 4), así como el desarrollo de las hojas.

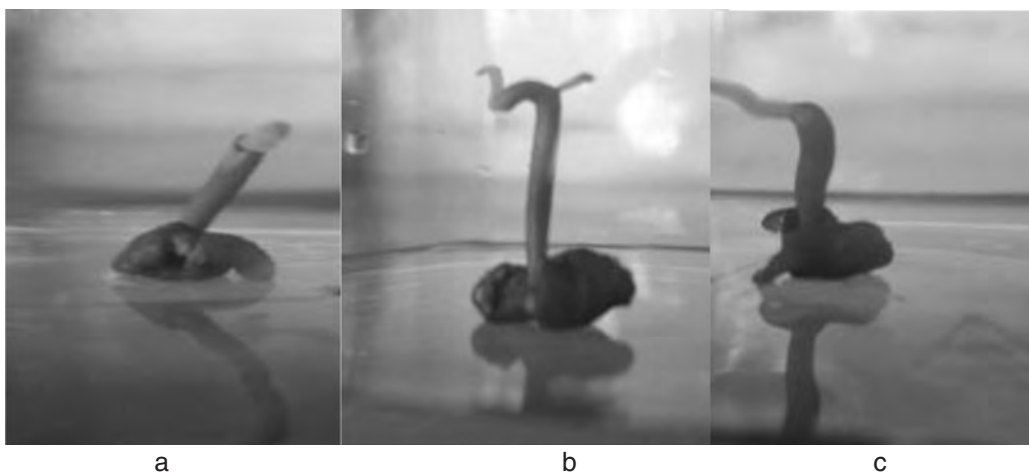


Fig. 4. Crecimiento de embriones cigóticos, cuando el polo radicular no estuvo en contacto con el medio de cultivo: (a) Aba Buna, (b) MCH₂ y (c) Gawe.

Los diferentes medios de cultivo considerados en este experimento mostraron diferencias significativas con respecto a la longitud del tallo y la raíz solo luego de los 20, 30 y 45 días de cultivo, no detectándose diferencias

significativas al décimo día de cultivo (Tabla 4). Embriones cultivados en el medio 6 experimentaron un rápido crecimiento, aunque ellos no mostraron diferencias significativas de esos retenidos en el medio 7.

Tabla 4. Longitud del tallo y la raíz de las plantas obtenidas a partir de embriones cigóticos de híbridos de *Coffea arabica* L. a diferentes tiempos de evaluación para seis medios

Tratamiento	10 días		20 días		30 días		45 días	
	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Tallo (cm)	Raíz (cm)	Tallo (cm)	Raíz (cm)
1	0,54	0	0,82 bc	0,48 b	1,09 b	0,78 b	1,40 ab	1,09 ab
7	0,57	0	0,99 ab	0,62 ab	1,09 b	1,05 ab	1,46 ab	1,34 ab
2	0,57	0	0,72 bc	0,32 bc	1,00 bc	0,95 ab	1,30 bc	1,06 b
3	0,60	0	0,88 bc	0,10 c	0,86 c	0,19 c	0,99 c	0,31 c
6	0,61	0	1,10 a	0,80 a	1,41 a	1,50 a	1,74 a	1,79 a
4	0,63	0	0,68 c	0,03 c	0,83 c	0,14 c	1,05 c	0,20 c
5	0,56	0	0,52 c	0,03 c	0,63 c	0,10 c	0,97 c	0,19 c
ES	0,25		0,53	0,26	0,33	0,57	0,45	0,65
CV	25,57 ns		34,68	37,21	36,31	41,02	42,00	31,52

Medias en una misma columna seguidas por la misma letra no difieren significativamente usando la prueba de Rangos Múltiples de Duncan (DMRT) a un nivel de significación del 5 %.

Embriones cigóticos maduros son estructuras bipolares independientes con un ápice radicular que permite el desarrollo normal de la raíz. El uso incorrecto en las concentraciones de fitohormonas o en la concentración de las sales en el medio basal puede inhibir la organogénesis de la raíz. Consecuentemente, en este experimento los tratamientos 3, 4 y 5, involucrando concentraciones de BAP mayores a 0,2 mg/L, inhibieron el enraizamiento

en más del 30 % de los casos, mientras el medio basal SH libre de fitohormonas reguladoras del crecimiento respondió de una forma opuesta.

Diferencias no significativas fueron observadas entre los tres híbridos para la longitud del tallo y la raíz para todo el período de evaluación, excepto para MCH₂, que manifestó la mayor longitud absoluta de la raíz luego de 20, 30 y 45 días de cultivos (Fig. 5).

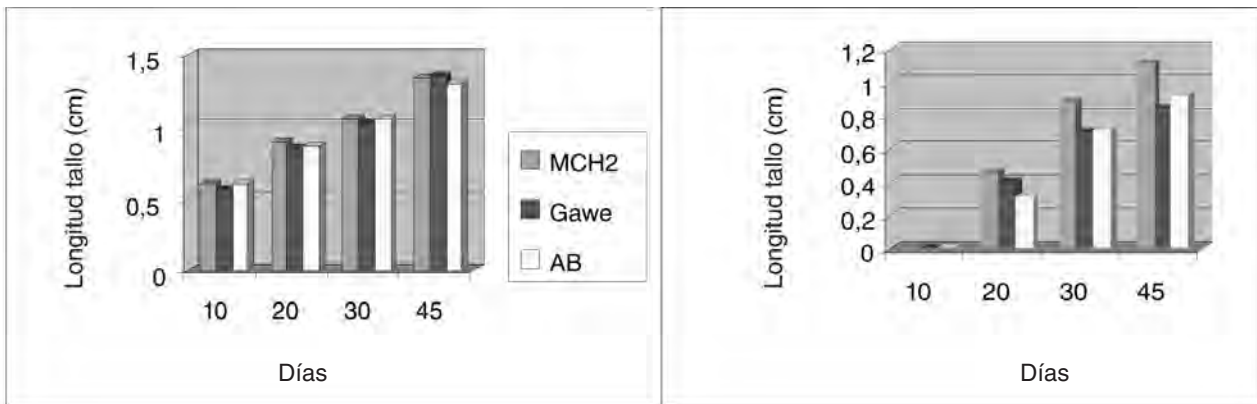


Fig. 5. Longitudes medias del tallo y la raíz de los tres híbridos de café para todo el período de evaluación.

Plantas con más de tres pares de hojas fueron transferidas a condiciones de endurecimiento y aclimatización bajo apropiadas condiciones fitosanitarias. Las plantas mostraron buen crecimiento en los potes llenados con una mezcla de suelo, arena y pulpa de café descompuesta (dos partes de suelo, una de arena y una de pulpa de café) con un porcentaje de sobrevivencia mayor al 80 %. Estos resultados pueden atribuirse al buen desarrollo del

tallo, buena iniciación y desarrollo del sistema radicular y presencia de hojas verdaderas de las plántulas antes de ser transferidas a condiciones de aclimatización.

Conclusiones

- El cultivo *in vitro* de embriones cigóticos de los tres híbridos de *Coffea arabica* L. incrementa la tasa de germinación comparado con el crecimiento de la semilla.

- La orientación del embrión en el medio de cultivo y la concentración de citoquininas tiene alta influencia sobre la germinación de los embriones cigóticos.
- Las concentraciones relativas altas de fosfato absoluto y baja concentración de sales totales en el medio SH favorece el desarrollo y elongación de las raíces de las plantas obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de embriones cigóticos.

Bibliografía

- Collonna, J. P.: Contribution a'la 'e' tude de la culture in vitro d'embryos de cafeiers. Action de lo cafeine. *Café Cacao Thé*, 16: 193-202, 1972.
- Couturon, E.: Obtention D'haploides sontanes de *Coffea canephora* Pierre par l'utilisation du greffage d'embryons. *Café Cacao Thé*, 25(3): 155-160, 1982.
- Cruz, y col.: Enraizamiento *in vitro* de embriones cigóticos de café. Documentación Técnica. Est. Cent. Inv. Café y Cacao, 15 pp., 1990.
- López P., Cristina: Cultivo de embriones y óvulos. En: *Fundamentos teóricos prácticos del cultivo de tejidos vegetales*. – Roma: FAO. 112 pp., 1990.
- Madhava, M. N. and C.S. Sreenivasan: Effect of abscisic acid and cytokinins on cultured zygotic embryos of *Coffea arabica* cv. Cauvery (Catimor). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 79: 279-284, 2004.
- Murashige, T. and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497, 1962.
- Nicolas, W. J.: *Coffee: Growing, Processing, Sustainable Production*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.KGoA. Weinheim, 975 pp., 2004.
- Raghuramulu, Y.; Sreenivasan, M. S. and P. K. Ramaiah: Regeneration of coffee plantlets through tissue culture techniques in India. *Journal of Coffee Research*, 19: 30-38, 1989.
- Ramos, R.; Cabrera, M. y Esther, M. A.: Agua residual sola y complementada como sustituto del medio basal de cultivo *in vitro* de embriones de café. *Tropicultura*, 19 (3): 97-100. 2002.
- Ramos, R. A.; Chill, I.; González, M. E.; Cabrera. M.; Díaz, A.; Mederos, Y.; Pérez, P.; Martínez, F. y C. López: Tecnología para la recuperación de agar a partir de los medios de cultivo de desechos empleados en Biotecnología Vegetal. *Café Cacao*, 2(1): 7-11, 2001.
- Sndahl, M. R. and W. H. T. Loh: Coffee biotechnology. In: *Coffee Agronomy, Vol. 4* [edited by Clarke, R.J.; Macrae, R.] London, UK: Elsevier Applied Science pp. 235-262, 1988.
- Schenk, R. U. and A. C. Hildebrandt: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.*, 50:199-204, 1972.

