

Diferenciación y germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* L. cv. Catimor 9722 obtenidos en agitador orbital

Manuel de Feria Silva*, Elio Jiménez González, Raúl Barbón Rodríguez, Alina Capote Pérez, Maité Chávez Milián y Elisa Quiala Mendoza. *Autor para la correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. e-mail: mdeferia@ibp.co.cu, mdeferia@yahoo.es

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivos estudiar el efecto de cuatro densidades de inoculación sobre el proceso de diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 y evaluar el efecto de dos medios de cultivo descritos en la literatura científica para la germinación de embriones somáticos. Los resultados mostraron que sólo se formaron embriones somáticos en los tratamientos inoculados con 0.5 y 1.0 gMF.l⁻¹, mientras que en los tratamientos inoculados con 5.0 y 10.0 gMF.l⁻¹ se multiplicaron sólo los agregados celulares. El mayor número de embriones somáticos (23 154 ES.l⁻¹) se obtuvo al inocular 1.0 gMF.l⁻¹, con diferencias estadísticas respecto al tratamiento inoculado con 0.5 gMF.l⁻¹, en el cual se obtuvieron 12 507 ES.l⁻¹. Respecto a la germinación de los embriones somáticos en etapa de torpedo, los mejores resultados se lograron al emplear 0.225 mg.l⁻¹ de 6-BAP, pues después de ocho semanas de cultivo germinaron como promedio 2.87 embriones somáticos de cada cinco colocados inicialmente en los frascos de cultivo, lo que representó un 57.5% de germinación.

Palabras clave: café, densidad de inoculación, medio de cultivo líquido

ABSTRACT

The present work had as objectives to study the effect of four inoculation densities on the process of differentiation of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 and to evaluate the effect of two culture media described in the literature for the germination of somatic embryos. The results showed that somatic embryos were only formed in the treatments inoculated with 0.5 and 1.0 g FW l⁻¹, while in the treatments inoculated with 5.0 and 10.0 g FW l⁻¹ only the cell aggregates were multiplied. The largest number of somatic embryos (23 154 SE.l⁻¹) was obtained when inoculating 1.0 g FW l⁻¹, with statistical differences regarding the treatment inoculated with 0.5 g FW l⁻¹, in which 12 507 SE.l⁻¹ were obtained. Regarding the germination of the somatic embryos in torpedo phase, the best results were possible when using 0.225 mg.l⁻¹ of 6-BAP, because after eight weeks of culture they germinated with an average of 2.87 somatic embryos out of five placed initially in the culture flasks, what represented 57.5% of germination.

Key words: coffee, inoculation density, liquid culture medium

INTRODUCCIÓN

El principal inconveniente para la propagación del cultivo del café por métodos tradicionales, es el hecho de ser este un cultivo perenne, lo que implicaría muchos años de trabajo para multiplicar un material genético con interés para la agricultura (Berthouly, 1997).

En este contexto es muy importante disponer de técnicas para la multiplicación *in vitro* del café, pero en particular, de protocolos para la regeneración de plantas vía embriogénesis somática, pues permitirán obtener volúmenes de producción superiores en un menor período de tiempo y a un costo más bajo, lo cual convierte a este sistema en una vía de regeneración de plantas potencialmente más eficiente que la regeneración vía organogénesis (Villalobos y Thorpe, 1991).

Según Vasil (1994), los estudios relacionados con la embriogénesis somática se iniciaron a principios de 1960. Autores como Merkle *et al.* (1995), reconocieron que la habilidad manifestada por los cultivos

embriogénicos para proliferar o multiplicarse indefinidamente, era uno de los aspectos más importantes que permitiría aplicar la embriogénesis somática en la propagación masiva de plantas y el mejoramiento genético por transferencia de genes.

Los primeros embriones somáticos de café fueron obtenidos a principios de 1970 por Staritsky, al emplear secciones de hojas de ramas ortotrópicas jóvenes de *C. canephora* (Dublin, 1991). En los últimos años, se ha incrementado la regeneración de plantas por esta vía y en particular el cultivo de células en suspensión (Montes *et al.*, 1995; Zamarripa, 1996; Etienne *et al.*, 1997; González *et al.*, 1999; Cevallos, 2000; de Feria *et al.*, 2001; de Feria *et al.*, 2003).

Entre los factores más importantes para incrementar la producción de embriones somáticos en etapa de torpedo y garantizar elevados porcentajes de germinación, se encuentra la densidad de inoculación, la cual dependerá del cultivo que se trabaje, ya que en algunas especies cuando se

utilizan elevadas densidades se limita el proceso de diferenciación, pero en otras se favorece la formación y multiplicación de un gran número de embriones somáticos, aunque sólo en etapa globular (Shigeta *et al.*, 1996; Barbón, 1997).

El presente trabajo tuvo como objetivos, evaluar el efecto de cuatro densidades de inoculación durante la fase de diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas de café y evaluar la germinación de embriones somáticos en etapa de torpedo, en dos medios de cultivo para esta finalidad descritos en la literatura científica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas en agitador orbital

Efecto de la densidad de inoculación

Este experimento tuvo como objetivo determinar la influencia de cuatro densidades de inoculación sobre la formación y diferenciación de embriones somáticos. Se estudiaron 0.5, 1.0, 5.0 y 10.0 gMF.l⁻¹ y se empleó el medio de cultivo propuesto por Zamarripa *et al.* (1991) compuesto por el 100% de las sales inorgánicas MS (Murashige y Skoog, 1962), 1.0 mg.l⁻¹ de ácido nicotínico, 1.0 mg.l⁻¹ de piridoxina, 1.0 mg.l⁻¹ de tiamina, 0.01 mg.l⁻¹ de biotina, 1.0 mg.l⁻¹ de pantotenato de calcio, 5.0 mg.l⁻¹ de 6-bencilaminopurina, 100 mg.l⁻¹ de mio-inositol, 40 mg.l⁻¹ de adenina, 400 mg.l⁻¹ de extracto de malta, 30 g.l⁻¹ de sacarosa y pH 5.8.

Se utilizó como inóculo una suspensión celular en fase de multiplicación en su etapa exponencial (nueve días de cultivo) según la metodología descrita por de Feria *et al.* (2001). Se emplearon cinco Erlenmeyers de 300 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo por frasco, a los cuales se les renovó el 55.0% del medio de cultivo con una frecuencia de siete días según la metodología descrita por Zamarripa *et al.* (1991).

Se determinó el tiempo de cultivo (días) en que se formaron los embriones somáticos en el medio de cultivo y se evaluó el número de embriones somáticos producidos por litro de medio de cultivo (ES.l⁻¹), los cuales se clasificaron de forma visual en globular, corazón y torpedo en función de la etapa en que se encontraban dentro del proceso de diferenciación.

La presencia en el medio de cultivo de los embriones somáticos en etapa globular se determinó de forma visual y la evaluación del número y clasificación de los ES.l⁻¹ se realizó al finalizar el experimento (56 días). Se determinó la masa fresca de toda la biomasa en los frascos de cultivo y luego se tomaron tres muestras de 1.0 g de masa fresca por cada

uno, para un total de 15 evaluaciones por tratamiento. Cada muestra se colocó en una placa de Petri de 70 mm de diámetro y se añadieron 2.0 g.l⁻¹ de Phytigel para facilitar el conteo y clasificación de los embriones somáticos, lo cual se realizó mediante el uso de un microscopio estereoscópico modelo WILD M8 (Leica).

El procesamiento estadístico se realizó mediante el paquete SPSS para Windows versión 8.0, los resultados del procesamiento de los datos se obtuvieron directamente al aplicar el test de Mann-Whitney, después de haber generado hasta 10 000 muestras con distribución similar a la real mediante técnicas de Monte Carlo, para estimar de esta forma la significación con el 99.0% de confianza.

Germinación de los embriones somáticos

La germinación de los embriones somáticos constituye un paso importante para validar cualquier proceso embriogénico. Con este objetivo se evaluaron embriones somáticos clasificados de forma visual en etapa de torpedo y que se obtuvieron como resultado del experimento anterior, los cuales fueron colocados en dos variantes de medios de cultivo descritos en la literatura para la germinación de embriones somáticos de café, el primero (1) propuesto por De García y Menéndez (1987) y el segundo (2) por Zamarripa *et al.* (1990) (Tabla 1).

Los frascos de cultivo se colocaron en cámaras de crecimiento con incidencia de luz solar a una densidad de flujo de fotones fotosintéticos (DFFF) que osciló entre 100 y 125 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de $28.0 \pm 2.0^\circ\text{C}$. Cada tratamiento estuvo compuesto por 40 réplicas (frascos de cultivo de 250 ml de volumen) y se colocaron cinco embriones somáticos por frasco, para evaluar después de ocho semanas de cultivo la supervivencia y el número de embriones somáticos que germinaron.

Según Merkle *et al.* (1995), en la mayoría de los trabajos realizados hasta esa fecha, los diferentes autores no hacen una clara distinción entre los términos germinación y conversión. Es importante definir que la germinación se refiere al crecimiento del brote y la raíz de los embriones somáticos en condiciones *in vitro* y puede ser considerada germinación total si el crecimiento del brote y la raíz se produce simultáneamente o parcial si el embrión somático sólo emite brote o raíz (Söndahl *et al.*, 1991), mientras que la conversión fue un término descrito por Stuart y Strickland (1984), referido a la supervivencia y desarrollo de las plantas producidas *in vitro* a partir de embriones somáticos, pero en condiciones ambientales, o sea *ex vitro*.

Para procesar estadísticamente los resultados de la germinación, se aplicó el mismo procedimiento que se siguió con los resultados del experimento anterior.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo empleados para la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722.

Componentes de los medios de cultivo.	Medio de cultivo para la germinación (1).	Medio de cultivo para la germinación (2).
Sales inorgánicas	½ MS	½ MS
Acido nicotínico	---	1.0 mg.l ⁻¹
Piridoxina	---	1.0 mg.l ⁻¹
Tiamina	10 mg.l ⁻¹	1.0 mg.l ⁻¹
Pantotenato de calcio	---	1.0 mg.l ⁻¹
Biotina	---	0.01 mg.l ⁻¹
L-Cisteina	35 mg.l ⁻¹	---
Mio-inositol	100 mg.l ⁻¹	100 mg.l ⁻¹
ANA	0.03 mg.l ⁻¹	---
AG ₃	0.03 mg.l ⁻¹	---
6-BAP	---	0.225 mg.l ⁻¹
Kinetina	0.03 mg.l ⁻¹	---
Sacarosa	30 g.l ⁻¹	10 g.l ⁻¹
pH	5.8	5.8

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferenciación de las suspensiones celulares embriogénicas en agitador orbital

Efecto de la densidad de inoculación

Al analizar el efecto de la densidad de inoculación sobre el proceso de diferenciación de las suspensiones celulares, se observó que sólo se formaron embriones somáticos en los tratamientos inoculados con 0.5 y 1.0 gMF.l⁻¹; mientras que, en los tratamientos inoculados con 5.0 y 10.0 gMF.l⁻¹ se produjo una multiplicación de los agregados celulares.

El proceso de formación de los embriones somáticos se favoreció en el tratamiento inoculado con 1.0 gMF.l⁻¹, pues los embriones somáticos fueron observados a los 19 días de cultivo, dos días antes que el tratamiento inoculado con 0.5 gMF.l⁻¹ y fueron observados de forma individual y también asociados en pequeños grupos que podían ser separados con facilidad (Figura 1).

El mayor número de embriones somáticos (23 154 ES.l⁻¹) se produjo al inocular 1.0 gMF.l⁻¹, con diferencias estadísticas al tratamiento inoculado con 0.5 gMF.l⁻¹, en el cual se obtuvieron 12 507 ES.l⁻¹ (Figura 2).

También se presentaron diferencias estadísticas entre ambos tratamientos en cuanto al número de embriones somáticos según la etapa en que estos se encontraban dentro del proceso de diferenciación (Tabla 2).

Resultados similares fueron obtenidos por Barbón (1997), al trabajar con suspensiones celulares de *C. arabica* cv. Caturra rojo. Este autor al inocular 0.5 y 1.0 gMF.l⁻¹ observó que los embriones somáticos obtenidos transitaron por todas las etapas del proceso de diferenciación. Sin embargo, a diferencia de los resultados del presente trabajo, al inocular 5.0 gMF.l⁻¹ observó la formación de una gran cantidad de embriones somáticos, pero sólo en la etapa globular, después de transcurridas ocho semanas de cultivo.

Numerosos autores han hecho referencia al papel de la densidad de inoculación y su relación con el proceso de diferenciación, al utilizar como cultivo modelo la zanahoria (Osuga *et al.*, 1993; Osuga y Komamine, 1994; Shigeta *et al.*, 1996). Los mismos han evidenciado que existe un efecto de autoinhibición del proceso embriogénico que está ligado a las elevadas densidades de inoculación y que con anterioridad había sido descrito por Ozawa y Komamine (1989).

Germinación de los embriones somáticos

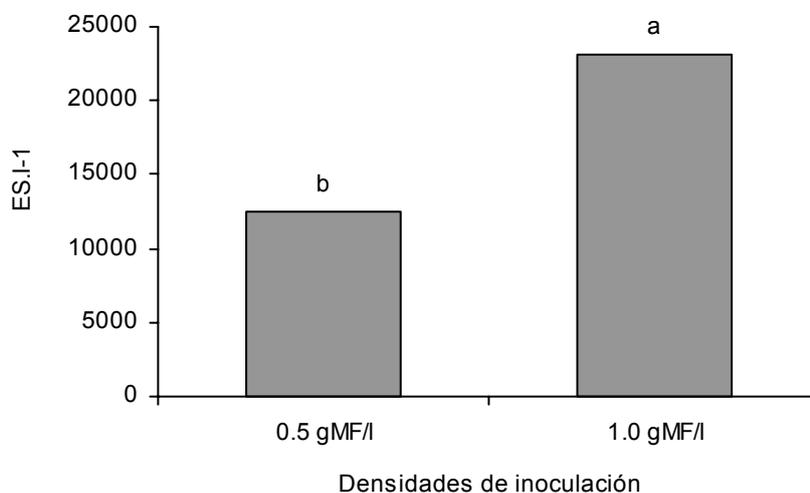
Los mejores resultados se lograron al emplear el medio de cultivo descrito por Zamarripa *et al.* (1990), ya que después de ocho semanas de cultivo germinaron como promedio 2.87 embriones somáticos de cada cinco colocados inicialmente en los frascos de cultivo (Tabla 3), lo que representó un 57.5% de germinación. Bajo estas condiciones los embriones somáticos que germinaron alcanzaron a las 12 semanas de cultivo un desarrollo morfológico similar al que se muestra en la figura 3d.

En ambos medios de cultivo se observó entre 40 y 42% de embriones somáticos que sólo presentaron desarrollo del primer par de hojas o de la raíz (Fig.4). Según Al-Khayri (2003) este hecho puede estar relacionado con el empleo en el medio de cultivo de ácido naftalenacético (ANA) como regulador del crecimiento en detrimento del ácido indol butírico (AIB),

lo cual sucede en el medio de cultivo propuesto por De García y Menéndez (1987). Por su parte, Perán *et al.* (2004) también lo atribuyen a la presencia sólo de 6-bencilaminopurina (6-BAP) como único regulador del crecimiento durante el proceso de germinación, lo cual es una de las características del medio de cultivo propuesto por Zamarripa *et al.* (1990).



Figura 1. Embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 en etapa globular a los 28 días de iniciado el proceso de diferenciación de suspensiones celulares inoculadas con 1.0 gMF.l^{-1} (aumento 100x).



	Total.
M.G. ± E.S.	17 830.5 ± 111.4
C.V.	1.39%

Medias con letras distintas sobre las columnas indican diferencias estadísticas según la prueba de Mann-Whitney.

Figura 2. Efecto de la densidad de inoculación sobre la producción de embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 a los 56 días de cultivo.

Tabla 2. Influencia de la densidad de inoculación en el número de embriones somáticos obtenidos para cada etapa del proceso de diferenciación a los 56 días de cultivo.

Etapa de desarrollo de los embriones somáticos	Tratamientos		M.G. ± E.S.
	0.5 gMF.l ⁻¹	1.0 gMF.l ⁻¹	C.V.
Globular	4 817 b	9 987a	7402.0 ± 79.9 2.41%
Corazón	2 491b	4 822a	3656.5 ± 36.4 2.23%
Torpedo	5 199 b	8 345a	6772.0 ± 65.6 2.16%

Medias con letras distintas dentro de una misma fila difieren estadísticamente según la prueba de Mann-Whitney.

Tabla 3. Influencia de dos medios de cultivo descritos en la literatura científica sobre la germinación de embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, después de ocho semanas de cultivo.

Medios de cultivo	No. de ES germinados completamente por frasco	% de germinación	M.G. ± E.S. C.V.
De García y Menéndez (1987)	0.27 b	5.5%	1.575 ± 0.09
Zamarripa <i>et al.</i> (1990)	2.87 a	57.5%	9.17%

Medias con letras distintas difieren estadísticamente según la prueba de Mann-Whitney.

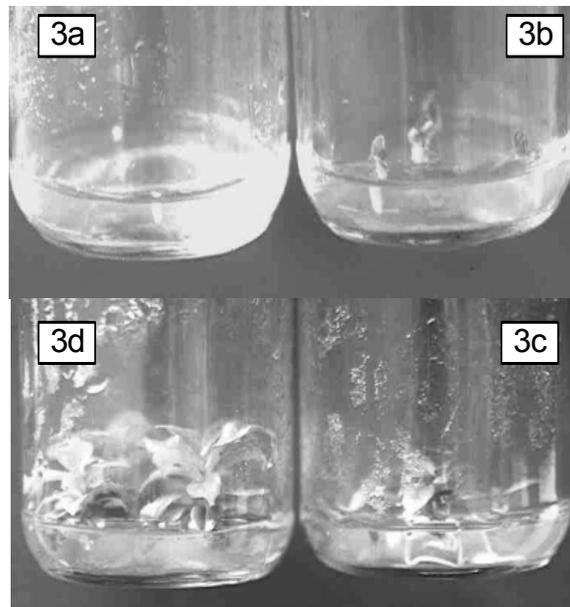


Figura 3. a) Embriones somáticos *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 en etapa de torpedo después de ocho semanas de cultivo. b) A las dos semanas de cultivo en medio de cultivo de germinación. c) A las cinco semanas de cultivo. d) Plantas *in vitro* obtenidas de embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 después de 12 semanas de cultivo en medio de cultivo de germinación.

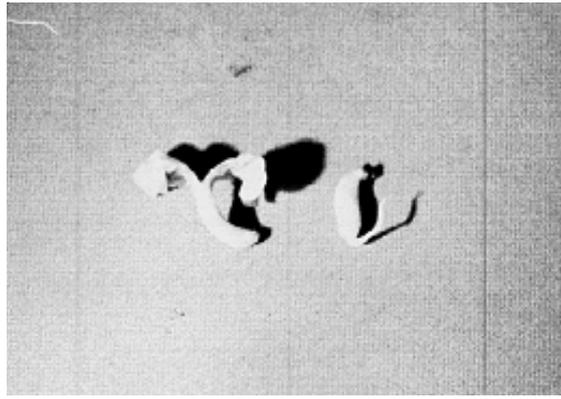


Figura 4. Embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722 con desarrollo sólo del primer par de hojas o de la raíz después de tres semanas de cultivo, comportamiento este considerado como germinación parcial.

Zamarripa *et al.* (1990) con este medio de cultivo, lograron entre un 50 y 60% de germinación de embriones somáticos de *C. canephora* obtenidos a partir de suspensiones celulares. Por su parte, Quiala (1995) realizó un estudio con nueve medios de cultivo para la germinación de embriones somáticos de la especie *C. arabica* cv. Catimor 9722 y obtuvo los mayores porcentajes de germinación (52.8%) también con el mismo medio de cultivo propuesto por Zamarripa *et al.* (1990). Según Ziv *et al.* (1995), la germinación de los embriones somáticos se estimula al ser expuestos a concentraciones bajas de citoquininas o cultivados en medios de cultivo libres de reguladores del crecimiento.

Vázquez *et al.* (1998) en un estudio con diferentes híbridos de *C. arabica*, alcanzaron entre 17 y 79% de germinación y plantearon que la diferencia en los porcentajes obtenidos se debió a las características propias de cada híbrido. Cevallos (2000) refirió porcentajes de germinación que oscilaron entre 30 y 39% después de 60 días de cultivo en la especie *C. arabica* cv. Catimor 9723, mientras que para la especie *C. canephora* cv. Robusta fueron entre 44 y 53% de germinación a los 70 días. Con anterioridad otros autores han obtenido diferentes porcentajes al trabajar con distintos genotipos, Ducos *et al.* (1993) informaron para el híbrido Arabusta valores que oscilaron entre 32 y 35%, mientras que para *C. canephora* cv. Robusta fueron de un 47%. Con este mismo cultivar Zamarripa (1993) y Tahara *et al.* (1994) indicaron 46 y 48% de germinación respectivamente.

CONCLUSIONES

La densidad de inóculo para el cultivo de células en suspensión varía para cada especie en particular, y es uno de los parámetros de cultivo que define el comportamiento de las suspensiones celulares, independientemente en muchos casos de la fase de desarrollo y la composición del medio de cultivo.

Los resultados obtenidos demostraron que en el cultivo de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722, las bajas densidades de inoculación estimularon el proceso de diferenciación de los agregados celulares y por consiguiente la formación y diferenciación de los embriones somáticos, mientras que al emplear altas densidades de inoculación se favorecieron las condiciones para la multiplicación de los agregados celulares.

Se demostró además, que las condiciones en que se realizó el proceso de diferenciación provocaron asincronía en el desarrollo fisiológico de los embriones somáticos, lo cual constituye uno de los aspectos importantes a estudiar, pues como se conoce, sólo los embriones somáticos que han madurado morfológica y fisiológicamente, son capaces de germinar y dar lugar *in vitro* a una planta completa, lo cual constituye en definitiva la finalidad de este proceso. No obstante, los porcentajes de germinación obtenidos fueron similares a los valores más elevados descritos para este y otros cultivares y variedades de café hasta el presente.

REFERENCIAS

- Al-Khayri JM (2003) *In vitro* germination of somatic embryos in date palm: Effects of auxin concentrations and strength of MS salts. *Current Science* 84: 680-683
- Barbón R (1997) Empleo de suspensiones celulares embriogénicas para la transformación genética del café (*Coffea arabica* cv. Caturra rojo) por electroporación. Tesis de Maestría. IBP.UCLV. Santa Clara.
- Berthouly M (1997) Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura, pp. 25-49. San José, Costa Rica
- Cevallos AM (2000) Establecimiento de una metodología eficiente en el proceso de embriogénesis somática del café (*Coffea* spp.), mediante el uso de marcadores morfohistológicos y moleculares. Tesis de doctorado. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, La Habana

- de Fera, M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M y Quiala E (2003) Effect of dissolved oxygen concentration on differentiation of somatic embryos of *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 72: 1-6
- de Fera, M, Jiménez E, Barbón R, Capote A, Chávez M y Quiala E (2000) Multiplicación de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* cv. Catimor 9722. *Biotecnología Vegetal* 1: 13-20
- De García E y Menéndez A (1987) Somatic Embryogenesis from leaf explants of coffee plants 'Catimor'. *Café Cacao Thé* 31 (1): 15-22
- Dublin P (1991) Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: Roca, WM y Mroginski, LA (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, pp. 578-619. CIAT. Cali
- Etienne, H, Solano W, Pereira A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Anthony F, Côte F y Berthouly M (1997) Utilización de la embriogénesis somática en medio líquido para la propagación masal de los híbridos F1 de *Coffea arabica*. XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura, pp. 253-261. San José, Costa Rica
- González, ME, Santana N, Ferrer M, y Cabrera M (1999) Influencia de diferentes factores en la embriogénesis somática de *Coffea canephora* P. Libro de Reportes Cortos 5º Coloquio Internacional de Biotecnología Vegetal. pp. 96-97. IBP. Santa Clara
- Merkle, S, Parrott W y Flinn B (1995) Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. En: Thorpe, T (Ed.), *In vitro Embryogenesis in Plant*, pp. 155-203.
- Montes, S, Martínez M, Rojas R, Santana N y Cuba M (1995) Obtención de embriones somáticos a partir de suspensiones celulares de *Coffea canephora* variedad Robusta. *Cultivos Tropicales* 16 (3): 77-81
- Murashige, T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15: 473-497
- Osuga, K y Komamine A (1994) Synchronization of somatic embryogenesis from carrot cells at high frequency as a basis for the mass production of embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 39: 125-135
- Osuga, K, Kamada H y Komamine A (1993) Cell density is an important factor for synchronization of the late stage of somatic embryogenesis at high frequency. *Plant Tissue Culture Letters* 10 (2): 180-182
- Ozawa, K y Komamine A (1989) Establishment of a system of high frequency embryogenesis from long-term cell suspension culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet* 77: 205-211
- Perán, R, Sánchez C, Barceló A y Pliego F (2004) Factors affecting maturation of avocado somatic embryos. *Scientia Horticulturae* 102: 61-73
- Quiala E (1995) Encapsulación de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* cv. Catimor). Trabajo de Diploma. p. 65. Facultad de Ciencias Agropecuarias. UCLV. Santa Clara
- Shigeta, J, Sato K y Mii M (1996) Effects of initial cell density, pH and dissolved oxygen on bioreactor production of carrot somatic embryos. *Plant Science* 115: 109-114
- Söndahl, MR, Nakamura T y Sharp WR (1991) Propagación *in vitro* del café. En: Roca, WM y Mroginski, LA (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. pp. 621-642. CIAT. Cali
- Stuart, DA, Strickland SG (1984) Embryogenesis from cell culture of *Medicago sativa*. The role of amino acid additions to the regeneration medium. *Plant Science Letters* 34: 74-78
- Tahara, M, Yasuda T, Uchinda N y Yamaguchi T (1994) Formation of somatic embryos from protoplasts of *Coffea arabica*. *L. Hortscience* 29: 172-174
- Vasil IK (1994) Automation of plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39: 105-108
- Vasquez, N, Salazar K, Solano W, Pescira A, Bertrand B y Etienne H (1998) Embriogénesis de alta frecuencia en híbridos F1 seleccionados de *Coffea arabica* a partir de explantes de hoja: reactividad y eventos histológicos. En: III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, REDBIO 98. (1-5 Junio) 516 p. La Habana
- Villalobos, V y Thorpe T (1991) Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. En: Roca, WM y Mroginski, LA (Eds.), *Cultivo de Tejidos en la Agricultura*, pp. 127-141. CIAT. Cali
- Zamarripa A (1993). Etude et développement de l'embryogenèse somatique en milieu liquide du caféier (*Coffea canephora* P., *Coffea arabica* L. et l'hybride Arabusta). These présentée devant: L'Ecole Nationale Supérieure Agronomique de Rennes pour obtenir le titre de Docteur de L'ensar. Préparéedan le Centre de Biotechnologie Végétale FRANCERECO
- Zamarripa A (1996) La biotecnología aplicada en la producción de plantas de café a gran escala. XVII Simposio sobre Caficultura Latinoamericana, San José. Costa Rica
- Zamarripa, A, Ducos JP, Tesserau H, Bollon H, Dufour M y Petiard V (1991) Production d'embryons somatiques de caféier en milieu liquide. Effets densité d'inoculation et renouvellement du milieu. *Café Cacao Thé* 35: 233-244
- Zamarripa, A, Ducos JP, Tesserau H, Bollon H, Eskes AB y Petiard V (1990) Développement D'un procédé de multiplication en masse du caféier par embryogenèse somatique en milieu liquide. ASIC. Conference. France
- Ziv, M, Kahany S, Kozai T, Zimmerman RH, Kitaya Y y Fujiwara K (1995) Somatic embryos and bulblet development from bioreactor regenerated meristematic clusters of Nerine. *Acta Horticulturae* 393: 203-212