

Cultivo de tejidos y transformación genética de café

Tissue culture and genetic transformation of coffee

Rafael Fernández (1)

rafaelfer2103@hotmail.com

Zoraya De Guglielmo (2)

zdegugli@gmail.com

Andrea Menéndez (3)

amenendez@cantv.net

(1) Universidad de Carabobo (Departamento de Biología)

(2) Instituto de Oncología y Hematológica-UCV

(3) Instituto de Biología Experimental (IBE-UCV)

RESUMEN

Se presenta una revisión sobre el cultivo del café, uno de los más importantes en el mundo, resaltando las técnicas de cultivo in vitro e ingeniería genética dirigidas a su mejoramiento, con las cuales se persigue obtener cultivares altamente productivos y resistentes a estrés biótico (enfermedades y plagas) o abiótico. En este sentido, se ha logrado establecer eficientes sistemas de regeneración in vitro, particularmente por embriogénesis somática indirecta a partir de secciones foliares, destacando la ventaja potencial de la embriogénesis somática secundaria en la regeneración de plantas transgénicas. La transformación genética se realiza tanto por métodos directos como indirectos, permitiendo ya en campo la obtención de plantas transformadas con el gen cry, el cual confiere resistencia al ataque del minador de la hoja. Este es un trabajo de apoyo a fitomejoradores en café, pudiendo ser más eficaces en el logro de nuevos cultivares con características agronómicamente importantes.

Palabras clave: *Café; transformación genética; cultivo in vitro*

ABSTRACT

Review about coffee, one of the most important plants on the world, highlighting the *in vitro* culture techniques and genetic engineering aimed at its improvement, in order to obtain highly productive cultivars resistant to biotic (diseases and pests) or abiotic stress. In this sense, it has managed to establish efficient *in vitro* regeneration systems, particularly for indirect somatic embryogenesis from leaf sections, emphasize the potential advantage of secondary somatic embryogenesis on the regeneration of transgenic plants. Genetic transformation has been achieved by both direct and indirect methods, to stand out in field the production of plants transformed with the cry gene, which confers resistance to attack leaf miner. In this context, this work will be of great help to breeders in coffee, may well be more effective in achieving new cultivars with agronomically important characteristics.

Key words: Coffee; genetic transformation; *in vitro* cultur

INTRODUCCIÓN

Café es el nombre común de las semillas provenientes de los arbustos del género *Coffea*, de la Familia de las Rubiáceas. De la treintena de especies que comprende este Género, solo tres son económicamente importantes: *Coffea arabica* (tetraploide $2n=44$), la cual produce aproximadamente el 90% del café comercializado en el mundo, seguido por *Coffea canephora* (café robusta, diploide $2n=22$) y *Coffea liberica* (diploide $2n=22$), que producen un aproximado de 9% y 1% respectivamente (Ascanio, 1994; Jaramillo, 1996).

Su cultivo es de gran importancia agronómica y comercial, por lo que ha sido blanco de mejoramiento mediante ingeniería genética. Este mejoramiento por medio de técnicas moleculares ha sido combinado con el mejoramiento tradicional (basado en cruzamientos) para facilitar la obtención de variedades mejoradas, debido a que esta planta es semi perenne y tomaría más de 30 años mediante el mejoramiento clásico obtener cultivares tolerantes a estrés biótico y abiótico que la afectan (Etienne, *et. al*, 2002).

Considerando la importancia histórica y económica del café, así como su potencial futuro como fuente de ingresos para Venezuela, en este trabajo se exponen aspectos relacionados al cultivo y la aplicación de técnicas de transformación genética a esta planta, con el fin de apoyar futuras investigaciones en el campo.

MÉTODO

Se refiere a una investigación de tipo documental fundamentada en una extensa revisión bibliográfica sobre el tema, para lo cual se seleccionaron revistas científicas especializadas nacionales e internacionales considerando como criterios para su selección los puntos a tratar y los autores e investigadores reconocidos en el área. La información histórica y estadística que se presenta se obtuvo de la revisión y procesamiento de la información en páginas *Web* de portales oficiales de la República Bolivariana de Venezuela.

RESULTADOS

El café constituye la segunda mercancía comercializada en el mundo, después del petróleo. El mayor productor es Brasil, especialmente el estado de Sao Paulo, donde se sitúa el primer puerto cafetalero del mundo, el puerto de Santos, seguido por Colombia y Vietnam, este último el productor más importante del café robusta.

Según Purseglove (1968), el café es originario del continente africano, la planta fue llevada por mercaderes a la península arábiga en fechas no conocidas, probablemente en el siglo XIII o el siglo XV d C (Sondahl y Lauritis, 1992; Coffee Universe -World of Coffee, 2002). La bebida revistió tal importancia que se abrieron establecimientos públicos denominados “cafés” para su consumo. El primer “café” fue abierto en Constantinopla (Estambul actual), alrededor de 1475 y en 1615 llega por primera vez al Continente Europeo, específicamente a Venecia, por

intermedio de los mercaderes venecianos que visitaban el Medio Oriente. Hacia 1650, en Roma, el Papa Clemente VIII permite su consumo en Italia (Hill, 1965; Coffee Universe -World of Coffee, 2002).

Se cree que el café llegó a Norte América en 1607, cuando el Capitán John Smith establece la Colonia de Virginia en Jamestown. En 1723, el joven oficial naval francés Gabriel Manthieu de Clieu trasladó plántulas de cafeto desde París hasta la isla de Martinica. Desde esta isla, el cultivo fue llevado por misioneros Jesuitas franceses al resto de las Antillas y, de allí, a América Central y del Sur, a mediados del siglo XVIII. A Brasil, el café llega desde la Guyana Francesa en 1720 y a Colombia, es introducido desde las Antillas Francesas en 1808 (Coffee History, 2002; Coffee Universe/Coffee Universe-ity/A brief History of Coffee, 2002). El cafeto llega a Venezuela en 1730, proveniente de Cayena y es el misionero Jesuita Gumilla quien establece plantaciones en las misiones de su Orden, en las riberas del río Orinoco. Para 1783 se lleva al Valle de Caracas, específicamente en lo que hoy se conoce como Chacao, estableciéndose las famosas haciendas Chacaeñas: “Blandín”, “San Felipe” y “La Floresta”, pertenecientes a Bartolomé Blandín (MAT, 1994). Posteriormente, en 1798, se llevó el cafeto a las Vegas, Estado Táchira, donde el cultivo se dispersa por los Andes y el resto del país (op cit, 1994; Jaramillo, 1996; Coffee Universe/World of Coffee, 2002). El café fue el primer producto de exportación desde 1820 hasta 1925, cuando fue desplazado por el petróleo; no obstante, siguió siendo el principal rubro agrícola de exportación y segundo en producción después del maíz (Bustillo, 1998; Briceño, 1999), existiendo varios cultivares en Venezuela (ver Cuadro 1).

La superficie cultivada de café, por Entidad Federal, se distribuye de la siguiente manera: Lara (40.416 ha), Táchira (32.665 ha), Portuguesa (33.327 ha), Mérida (28.648 ha) y Trujillo (28.220 ha); en cuanto al rendimiento (Kg/ha), el primer lugar es del Estado Lara (544), seguido por Trujillo (436), mientras, que Táchira rinde 351 Kg/ha y Mérida 343 Kg/ha (MAT, 2008; OCEI, 2000).

Composición del grano y ecología del café

El grano de café crudo contiene aproximadamente 6% de ácidos cafeicos y clorogénicos, ácido tánico, trigonelina (que se transforma en ácido nicotínico durante el proceso de torrefacción), 8% de azúcares diversos, alrededor de 15% de lípidos y 1 a 2% de cafeína, según las especies (Cartay y Ablan, 1997).

Según el nivel de cafeína (% de peso seco), el café se ha organizado en tres grupos: alto (1.61-2,2%), representado por *C. canephora*; medio (0.74-1.09%), representado por *C. arabica*, *C. dewevrei*, *C. racemosa*; y bajo (0.57-0.23%), que incluye las especies *C. eugenoides*, *C. liberica* y *C. salvatrix* (Mazzaferret, *et. al.*, 1997).

Cuadro 1. Principales cultivares de café presentes en Venezuela

Cultivar	Características
Bourbón	Cultivar de porte alto, proveniente de la isla Ramoni, antes llamada Bourbón. En este cultivar destaca la línea Bourbón Salvadoreño, altamente productivo y vigoroso.
Caripe	Cultivar de porte alto originado en Caripe, al oriente del país
Catimor	Cruce de Caturra con el híbrido de Timor, de porte bajo y resistente a la roya del café
Catuai	Cultivar de porte bajo, originario de Brasil, obtenido por el cruzamiento artificial de Caturra con Mundo Novo. Se adapta fácilmente a las condiciones del país y tiene alto rendimiento
Caturra	Cultivar de porte bajo, originario de Brasil, obtenido probablemente por una mutación ocurrida en plantas de Bourbón. Ofrece buen rendimiento bajo manejo y condiciones agroecológicas adecuadas
Cavimor	Cruce del Catuai con el híbrido de Timor, de corte bajo y resistente a la roya del café
Criollo o Typica	Cultivar de café americano de porte alto
Híbrido de Timor	Cultivar de porte alto, empleado para efectuar cruces que aseguren una mayor resistencia contra la roya del café
Maragogipe	Cultivar de porte alto, con granos grandes

Cultivar	Características
Mundo Novo	Cultivar de porte alto, muy vigoroso y productivo, originario del Brasil. Resulta de un cruce natural entre Bourbon y Sumatra
Pacas	Cultivar de porte bajo, originario de El Salvador, muy parecido al Caturra
Pache	Cultivar de porte bajo y compacto, originario de Guatemala
Robusta	Cultivar de <i>C. canephora</i> que produce un café de sabor fuerte por su mayor contenido de cafeína
S. Bernardo	Cultivar de porte bajo, originario de Centroamérica
Sarchimor	Cruce, de porte bajo, entre Villa Carchi y el híbrido de Timor
Semperflorens	Cultivar de porte alto
Villa Carchi	Cultivar de porte bajo originario de Costa Rica, producto de una mutación del cultivar Bourbon, vigoroso y con alta producción
Villalobos	Cultivar de porte bajo o compacto

La rentabilidad del cultivo de café depende de una serie de factores agroclimáticos: macroclima, microclima y topoclima. El primero está determinado por la altitud, latitud, precipitación y temperatura, mientras que el segundo se refiere a los factores que inciden directamente en la plantación y, por último, el topoclima se relaciona con la configuración del terreno (plano, inclinado, cóncavo, convexo, etc) (Jaramillo, 1996).

El café se cultiva en lugares con una precipitación que varía desde los 750 mm anuales (7.500 m³/ha) hasta 3000 mm (30.000 m³/ha), con altitudes de 1300 a 1700 metros y temperatura media anual de 16°C a 22°C. El cultivo requiere una lluvia (o riego) abundante y uniformemente distribuida desde comienzos de la floración hasta finales del verano para favorecer el desarrollo del fruto y de la madera. Después es conveniente un periodo de sequía que induzca la floración del año siguiente (Agroinformación, 2004).

La planta del café se propaga en gran escala por medio de semillas, o vegetativamente por medio de injertos o estacas que prosperan

en un suelo profundo, bien drenado, que no sea ni demasiado ligero, ni demasiado pesado. Los limos volcánicos son ideales. La reacción del suelo debe ser más bien ácida. Además, los diferentes niveles de clorofilas, carotenoides, alcaloides, etc., se ven modificados en función de las temperaturas, de la humedad y de la intensidad lumínica (Damatta, *et. al.*, 1997). La producción es mayor a plena exposición solar, siempre y cuando se lleven a cabo correctas prácticas culturales (emplear otras plantas que proporcionen sombra parcial, con el fin de atenuar la intensa evaporación de agua del suelo).

Con el fin de controlar la incidencia del gran número de enfermedades y plagas que afectan al café, es necesario implementar un programa de control riguroso de tipo preventivo, químico, biológico y biotecnológico. El control preventivo representa esencialmente a las prácticas culturales, el químico representa la aplicación de pesticidas (insecticidas, nematocidas y fungicidas), mientras que el biológico se fundamenta en la utilización de competidores o patógenos específicos de las plagas o agentes causales de las enfermedades. El recurso biotecnológico incluye las técnicas de cultivo de tejidos y la transformación genética, permitiendo obtener cultivares tolerantes o resistentes a diferentes patógenos o plagas, como la roya y o el minador de la hoja del café respectivamente.

Cultivo de tejidos en café

A diferencia de las técnicas de propagación tradicional, las de cultivo de tejidos permiten la micropropagación clonal de un determinado genotipo vegetal en un tiempo relativamente corto, útil en programas de mejoramiento genético convencional o por transformación genética. Estas técnicas también son poderosas herramientas para el estudio fisiológicos, de crecimiento y desarrollo, morfogénesis, criopreservación, producción de semillas artificiales, producción industrial de diferentes compuestos químicos, preservación del germoplasma de genotipos élite o la producción de metabolitos secundarios (Menéndez-Yuffá y García, 1998).

El cultivo *in vitro* de distintas especies de cafeto está registrado a partir de tejidos aislados de todos los órganos, con excepción de la raíz (Baumann y Neuenschwander, 1990) (ver Cuadro 2).

La propagación *in vitro* del café puede ser por organogénesis (microesquejes) o embriogénesis somática (Dublin, 1984; García y Rafael, 1989), siendo la última la principal vía de regeneración, ya que presenta la mayor tasa de multiplicación (Baumann y Neuenschwander, 1990); la cual se estableció a partir de distintos explantes, tales como secciones de tallo, hojas, ovarios y estambres (Dublin, 1981).

El primero en establecer exitosamente la regeneración *in vitro* del café fue Staritsky (1970), a partir de secciones de tallo de brotes ortotrópicos utilizando el proceso de embriogénesis somática indirecta. El primer señalamiento de regeneración por embriogénesis somática en *C. arábica*, a partir de secciones de hoja, fue presentado por Söndahl y Sharp (1977), encontrándose que, a diferencia de otros explantes, las secciones foliares tenían una mayor frecuencia embriogénica (Sondahl & Monaco, 1981). Las hojas más cercanas al ápice de la rama (último par) son las que poseen el mayor potencial embriogénico, según lo señalan Londoño y Orozco (1986a) y Noceda *et. al.* (1998).

Cuadro 2. Explantes utilizados para el cultivo *in vitro* de *Coffea spp*

Explante	Especie	Resultado	Referencia
Secciones de ramas ortotrópicas	<i>C. canephora</i> , <i>C. arabica</i> , <i>C. liberica</i>	ES, Br, Callo	Staritsky (1970), Buckland (1972); De Voort y Townsley (1974) y Townsley (1974) en Herman y Haas (1975); Custer (1980) en Sondahl y Monaco, 1981), Nassuth <i>et. al.</i> (1980), Berthouly <i>et. al.</i> (1987), García y Rafael (1989)

Explantante	Especie	Resultado	Referencia
Secciones foliares	<i>C. arabica</i> , <i>C. eugenioides</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. heterocalys</i>	Callo, ES	Crocomo et. al. (1975) en Sondahl y Monaco, 1981); Dublin (1981); Herman y Haas (1975), García y Menéndez (1987); Michaux-Ferriere et. al.(1989); Marques (1993); Samson et. al.(2006)
Meristemo	<i>C. arabica</i>	Br	Kartha et. al.(1981), Londoño y Orozco (1986a,b); Zok y Dublin (1991)
Tejido endospermico	<i>C. arabica</i>	Callo	Keller et. al. (1972) en Herman y Haas, 1975
Tejido perispermico	<i>C. stenophylla</i> , <i>C. congensis</i>	Callo, ES	Monaco et. al. (1974) en Sondahl y Monaco, 1981; Sreenath et. al.(1995)
Pericarpio	<i>C. canephora</i> ; <i>C. arabica</i>	Callo	Keller et. al. (1972) en Herman y Haas, 1975
Fruto verde	<i>C. arabica</i>	Callo	Sharp et. al.(1973), Sondahl y Monaco, 1981
Antera	<i>C. arabica</i> , <i>C. canephora</i> , <i>C. liberica</i> , <i>C. racemosa</i>	Callo	Sharp et. al.(1973), Sondahl y Monaco, 1981
Ovarios	<i>C. canephora</i>	ES	Dublin (1981, 1984)
Óvulos	<i>C. canephora</i>	ES	Lanaud (1981)
Embriones cigóticos	<i>C. arabica</i> ; <i>C. congensis</i> ; <i>C. canephora</i> ; <i>C. liberica</i> ; <i>C. racemosa</i>	G, ES	Montes (1982), Bertrand-Desbrunais et. al. (1991), Naidu y Sreenivasan (2004)
Semillas	<i>C. arabica</i>	Callo	Sharp et. al. (1973)

Callo: sólo se desarrolla el callo; **ES:** regeneración por embriogénesis somática indirecta; **Br:** regeneración a través de brotes; **G:** Desarrollo de plántula.

El desarrollo embriogénico se presenta tanto en secciones foliares de vitro-plantas como en plantas de invernadero, aunque el rendimiento es mayor en las primeras (Menéndez-Yuffá y Hermoso, 1998; Hermoso y Menéndez, 2000). El callo puede ser de dos tipos: embriogénico y no embriogénico. El primero es friable y de color amarillo, y el segundo puede ser de color blanco o marrón (Dublin, 1981), observándose que en la mayoría de los casos los embrioides se diferencian a partir del marrón (García y Menéndez, 1987).

El callo se forma por proliferación de células en la zona de corte del explante, desarrollándose en la zona periférica de las células del parénquima esponjoso después de seis días (Söndahl, *et. al.*, 1979), o del mesófilo esponjoso. Es importante destacar que el rendimiento del proceso regenerativo estará influenciado por el genotipo (Bieysse, *et.al.*, 1993) y que el origen de los embriones en café es unicelular, tal como lo señalan Menéndez-Yuffá y García (1997) y Quiroz-Figueroa, *et. al.*, (2002).

Los embriones que se forman por embriogénesis somática pasan por los estadios embriogénicos típicos de los embriones cigóticos: globular, corazón y torpedo. Generalmente se pueden observar todos los estadios simultáneamente sobre la superficie lisa del callo, por lo cual la diferenciación de éstos es asincrónica. También se puede observar con frecuencia el desarrollo de nuevos embriones sobre la superficie de los embriones somáticos de mayor desarrollo, tal como lo señala Marques (1993), específicamente en la zona basal del hipocotilo, lo que pone en evidencia la gran capacidad de embriogénesis somática secundaria de este cultivo (Menéndez-Yuffá y García, 1997; Menéndez-Yuffá, *et al.*, 1994).

En general, la inducción de embriogénesis somática requiere que el medio tenga la combinación de una auxina (ácido 2,4-diclorofenoxiacético: 2,4-D) y una citoquinina (cinetina: KIN; ó Bencilaminopurina: BAP), siendo ésta última la de mayor concentración, incrementándose la frecuencia embriogénica al emplear BAP (García y Menéndez, 1987; Neuenschwander y Baumann, 1992; Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996). Sin embargo,

Yasuda, *et al.*, (1985); Hatanaka, *et al.*, (1991, 1995); Fuentes, *et al.*, (2000); Fernández, *et al.*, (2005) y Giridhar, *et al.*, (2004) obtuvieron una alta frecuencia de embriogénesis somática empleando como único regulador de crecimiento una citoquinina (KIN, BAP, iso-pentiladenina o Tidiazuron (TDZ).

Los embriones somáticos formados bajo estas condiciones pasan por un proceso directo (sin la formación previa de callo), a partir de las células mesofilares en las zonas de corte del explante foliar (Quiroz-Figueroa, *et al.*, 2006; Gatica, *et al.*, 2007; Pereira, *et al.*, 2007; Costa de Rezende *et al.*, 2008), mientras que al utilizar dos hormonas (auxina 2,4-D y citoquina KIN) se distingue una embriogénesis indirecta (Quiroz-Figueroa, *et al.*, 2002).

Por otra parte, Lanaud (1981) logró obtener plantas haploides por embriogénesis somática a partir de óvulos de *C. canephora*. Sin embargo, se ha obtenido más éxito en la regeneración de haploides a partir de anteras, sometiendo los callos a bajas temperaturas (5°C) por 24-48 h (Ascanio y Arcia, 1994). También se ha incrementado la eficiencia del proceso suplementando el medio de cultivo con 16% de agua de coco (Neuenschwander y Baumann, 1995) y trabajando con microsporas, al pre-tratarlas por 48 h con colchicina (Herrera, *et al.*, 2002).

Cultivos en suspensión, metabolitos secundarios y sistemas de inmersión temporal

Los cultivos en suspensión son de gran interés, ya que se puede ejercer un mejor control en las condiciones de cultivo, permitiendo dos potenciales aplicaciones: la producción de metabolitos secundarios y la generación de embriones somáticos en gran escala (Menéndez-Yuffá y García, 1998).

La concentración de los gases es importante para el logro de una alta regeneración por embriogénesis somática a partir de suspensiones

embriogénicas de *C. arábica*. En cuanto a la concentración de oxígeno, se ha encontrado que a un 80% de oxígeno se obtiene gran cantidad de agregados de células embriogénicas, embriones en estadio globular y corazón, mientras que a bajas concentraciones (50%), las formas globulares y corazón disminuyen, pero se incrementan los niveles de embriones tipo torpedo (Jiménez y *et. al.*, 1998). Este proceso se optimiza empleando biorreactores, en donde se asegura con alta eficiencia la regeneración de plantas completas por embriogénesis somática (Afreeen, *et. al.*, 2002; Ethienne, *et. al.*, 2001; Ethienne. *et.al.*, 2002), obteniéndose hasta un 75% de conversión de plantas normales (Albarrán, *et.al.*, 2005). En el caso del dióxido de carbono, Barbón, *et .al.*, (2008) señalaron que a una concentración de 2,5% de CO₂ es posible encontrar la mayor proliferación de embriones somáticos.

Otras condiciones que influyen en un mayor rendimiento en la producción de embriones somáticos son la consistencia del medio y la incidencia de la luz. En este sentido, se ha encontrado una gran proporción embriogénica con un medio semisólido (2% gelrite), en oscuridad continua o a dieciséis horas de fotoperiodo (Gatica, *et. al.*, 2008a).

Con respecto a la producción de metabolitos secundarios en café, se ha producido cafeína a partir del cultivo de callo de *C. arabica* luego de doce a trece días de iniciado (Frischknecht, *et. al.*, 1977; Frischknecht y Baumann, 1980; Baumann y Rohrig, (1989), mientras que a partir de cultivo en suspensión inmovilizado en cubos reticulados de poliuretano, se ha logrado eficientemente la transformación de tebromide en cafeína (Furuya, *et. al.*, 1991).

Sin embargo, mediante la utilización de biorreactores se produce el metabolito con mayor eficiencia (más de nueve veces), tomando en consideración el tamaño del inóculo, la concentración de oxígeno y la tasa de recirculación de los gases solubles (Baumann y Neuenschwander, 1990; Dubuis, *et. al.*, 1995). A través del cultivo en suspensión también se pueden obtener protoplastos, los cuales constituyen un material que puede utilizarse para el intercambio de material genético, ya sea por

hibridación somática o por ingeniería genética mediante métodos directos o indirectos (Potrykus y Shillito, 1988; Puite, 1992; Cocking, 2000).

Otra vía para obtener altos rendimientos en la producción de embriones somáticos de *Coffea arabica* es el sistema de inmersión temporal (IT), a partir del cual se obtienen embriones torpedo que se desarrollan rápidamente (seis semanas) en plántulas, en un substrato estéril (no especificado); de éste modo se evita el paso de germinación *in vitro* en medios con agar, lo cual minimiza la vitrificación y reduce el costo en medios y mano de obra (Ethienne-Barry, *et. al.*, 1998, 1999).

Efectos de las condiciones del cultivo *in vitro*

Se ha señalado que la adaptación a tierra de las plantas de café obtenidas *in vitro* es exitosa y que el crecimiento es igual al de las plantas obtenidas a partir de semilla (Peña, 1983; Peña y Serna, 1984). Sin embargo, Barry, *et. al.*, (2002) indican que la fase de aclimatación *ex vitro* puede ser problemática y ocasionar pérdidas. Es posible que esto se relacione al uso excesivo de reguladores de crecimiento, lo que a su vez pudiera causar alteraciones en el material genético de las vitro-plantas y afectar negativamente el proceso de adaptación *ex vitro*. Otra causa de variantes somaclonales es la edad del cultivo celular, observándose que a medida que se hace más viejo, se obtienen de 80-90% de variantes (Etienne y Bertrand, 2003). Asimismo, su potencial embriogénico está concatenado a la variación del ADN nuclear, tal como se demostró mediante citometría de flujo (Zorinians *et. al.*, 2003).

Cabe mencionar que para evaluar eventos morfo-genéticos en el proceso regenerativo *in vitro* se utilizan técnicas moleculares como RFLP, AFLP y RAPD, así como análisis de isoenzimas y patrones de proteínas (Menéndez-Yuffá, *et. al.*, 1994; Menéndez-Yuffá y García, 1996; Rani, *et. al.*, (2000).

Cultivo *in vitro*, criopreservación y bancos de germoplasma

El cultivo *in vitro* es muy importante para la preservación del germoplasma, ya que las semillas de café tienen la desventaja de perder su viabilidad con el tiempo. Estos métodos permiten mantener el germoplasma en espacios reducidos, transportarlo fácilmente y garantizar un alto grado de limpieza desde el punto de vista fitosanitario (Menéndez-Yuffá y García, 1998). Se ha logrado criopreservar eficientemente (con nitrógeno líquido) embriones cigóticos de *C. arabica* y *C. canephora*, (Esquivel, *et. al.*, 1992). También se han producido semillas artificiales, encapsulando embriones cigóticos de *C. arabica* en una solución de 6% de alginato de sodio, logrando de 20-30% de supervivencia y regeneración por embriogénesis somática (Muniswamy y Sreenath, 2000).

Antecedentes de la transformación genética de café

A pesar del éxito reportado por diversos investigadores, en relación a la introducción de genes foráneos (reporteros y/o de selección) en café utilizando diferentes métodos de transformación, el registro de regeneración del material transformado y la obtención de plantas transgénicas es limitado. Es solo en los últimos años, después de diferentes pruebas y modificaciones que se han realizado en las distintas metodologías, cuando se ha logrado la regeneración del material sometido a transformación genética.

En cuanto a la transformación por *Agrobacterium*, se han utilizado las especies *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*, así como los genes *gus*, *nptII*, *hpt*, *csr1* y *cry1ac* (Spiral, *et. al.*, 1993; De Peña, 1995 en Carneiro, 1999; Ribas, *et. al.*, 2006). Hatanaka, *et. al.*, (1999), LeRoy, *et. al.*, (2000), Perthuis, *et. al.*, (2005) y Kumar, *et. al.*, (2006) reportan regeneración del material transformado con evaluación positiva al nivel de fenotipo y mediante PCR.

En la transformación por electroporación se han empleado los genes *gus* y *bar* (van Boxtel, 1994 en Fazouli, *et. al.*, 2000); destaca el trabajo de Fernández y Menéndez (2003), quienes reportan la regeneración del material transformado con resultados positivos en la reacción GUS y en la PCR para los genes mencionados. La transformación por biobalística se ha llevado a cabo con los genes *gus*, *bar*, *nptII* y *ahas*, con resultados positivos en la expresión transitoria del gen *gus* y en la PCR para los genes introducidos (Van Boxtel, *et. al.*, 1995; Noceda, *et. al.*, 1998; Barros, *et. al.*, (2001); Ribas, *et. al.*, 2005).

Más recientemente se ha logrado la transformación de *C. arábica* cv Catimor mediante biobalística con el gen *cry 1ac* de *Bacillus thuringiensis* utilizando un plásmido completo y un bloque o cassette genético constituido por la secuencia promotora, el gen *cry 1ac* y la secuencia terminadora; con este tipo de construcciones es menor la cantidad de genes o secuencias foráneas que se introducen en el material bombardeado y se disminuye o elimina el posible riesgo de transferencia (horizontal o vertical) de genes de resistencia a antibióticos o herbicidas usados como genes marcadores de selección en el procedimiento de transformación, lo cual es ventajoso al nivel de la bioética y la bioseguridad (De Guglielmo, *et. al.*, 2010).

Dentro de la transformación por biobalística Rosillo, *et. al.*, (2003) bombardearon suspensiones celulares de *C. arábica* cv. Colombia con varios plásmidos de la serie pCAMBIA (Centre for the Application of Molecular Biology to International Agriculture-Canberra, Australia); los autores lograron la expresión transitoria del gen reportero *gus*, sin embargo, no reportan la regeneración de plantas. Gatica-Arias y col. (2008b) también bombardearon agregados de suspensiones celulares de *C. arabica* cvs Caturra y Catuaí con el gen *gus*, y lograron la regeneración vegetal vía embriogénesis somática indirecta.

Las técnicas de Ingeniería Genética también se han usado en café para modificar el contenido de cafeína; Ogita, *et. al.*, (2004), mediante la tecnología del ARN de interferencia (ARNi) inhibieron la expresión del gen *CaMXMT1* que codifica a la N-metiltransferasa teobromina sintetas,

involucrada en la biosíntesis del alcaloide, reduciendo el contenido final de cafeína en un 70% y entre 65-85% en *C. canephora* y *C. arabica*, respectivamente.

En relación al control de la maduración del grano de café, proceso fundamental a nivel de la calidad y el valor del producto, se han clonado dos genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de etileno, la amino 1-ciclopropano carboxílico sintetasa o ACC sintetasa y la amino 1-ciclopropano carboxílico oxidasa o ACC oxidasa, los cuales se perfilan como elementos claves para el establecimiento de sistemas de transformación genética de café con el objetivo de controlar el proceso de maduración del grano (Pereira, *et. al.*, 2005).

Respecto a la tolerancia a estrés abiótico (condiciones de sequía, salinidad, fitotoxicidad por metales y frío) se han producido plantas transformadas con factores de transcripción que, inducidos por cualquiera de estas condiciones, activan una familia de genes que incrementan la tolerancia del café; esta familia incluye los genes *cor15a*, *cor6.6*, *rd29A*, *kin1* y *rd17* (Kasuga, *et. al.*, 1999).

En la transformación genética del café se han utilizado promotores de origen viral, como el CaMV35S del virus del mosaico del coliflor, así como de origen vegetal, incluyendo el promotor de la ubiquitina del maíz, el EF1a de *A. thaliana*, el de la actina de arroz y promotores propios del café, incluyendo el promotor de la α -tubulina (nro. de acceso al Genbank AF363630) y de la proteína de almacenamiento 11S de *C. arabica* (nro. de acceso al Genbank AF055300). Con estos últimos se han obtenido resultados similares a los registrados con promotores foráneos en cuanto a la expresión de los genes de interés introducidos, pero con las ventajas que ofrece el uso de secuencias propias de la planta al nivel de bioseguridad (Rosillo, *et. al.*, 2003).

Finalmente, en relación a las pruebas en campo de plantas transgénicas de café, el primer reporte fue con la resistencia al minador de la hoja del café (LeRoy, *et. al.*, 2000). En invernadero, realizaron bioensayos

exponiendo las plantas seleccionadas en base a la resistencia al agente de selección, detección de la proteína *cry1ac* en extractos foliares mediante Western Blot y evaluación positiva al nivel de ADN (PCR y Southern Blot), a las larvas del insecto, encontrándose una considerable reducción en el número de minas y en la defoliación en las plantas transgénicas, en comparación a lo observado en las no transgénicas (plantas controles). Las plantas que mostraron alta resistencia al minador en las pruebas realizadas en invernadero, fueron seguidamente evaluadas en campo en la Guayana Francesa durante cuatro años consecutivos, encontrándose que el 70% de las plantas fue resistente a la plaga en estas condiciones. No se evidenciaron diferencias entre el crecimiento de estas plantas con respecto al de las plantas controles durante el periodo de estudio. Sin embargo, el experimento fue interrumpido forzosamente debido a la acción de grupos ecologistas (CIRAD, 2001; Perthuis, *et. al.*, 2005).

De la misma manera, Perthuis, *et. al.*, (2005) reportan un estudio de cuatro años consecutivos en un campo plurianual de la Guayana Francesa, donde sembraron plantas de *Coffea canephora* transformadas mediante *A. tumefaciens* y *A. rhizogenes* con el gen *cry 1ac* y han llevado a cabo seis infecciones con el minador de la hoja, encontrando una reducción significativa en el número de minas observadas en las plantas transformadas, en comparación al control (café robusta no transformado). Esto indica la expresión de resistencia estable a la plaga durante el periodo de estudio. Los investigadores señalan la necesidad de prolongar el periodo de evaluación y la realización de investigaciones complementarias en estas plantas de café.

CONCLUSIONES

El café representa un gran potencial económico a nivel mundial, lo que ha determinado la búsqueda constante del mejoramiento de su rendimiento como cultivo. Para ello se han utilizado diversas técnicas biotecnológicas que abarcan desde el cultivo *in vitro* hasta la transformación genética.

La revisión documental de la información y análisis de los trabajos de investigación seleccionados sobre el café, su historia, cultivos y elementos de su transformación genética representa un aporte como recurso referencial para docentes y estudiantes en los diferentes cursos de Biología.

De igual forma, representa un aporte para el establecimiento de novedosos programas de investigación y mejoramiento dirigidos a la obtención de nuevos cultivares con características agroecológicamente importantes en países productores de café, como Venezuela, ya que se sintetizan aspectos relevantes requeridos para tal fin.

REFERENCIAS

- Afreen, F., Zobayed, S. y Kozai, T. (2002). Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: development of bioreactor for large-scale plantlet conversion from cotyledonary embryos. *Ann. Botany* 90:21929.
- Agro-información, (2004). Cultivo del café. Disponible en: www.infoagro.com/herbaceos/industriales/café.asp [Consulta: 20/07/2005]
- Albarrán, J, Bertrand, B, Lartaud, MyEtienne, H (2005). Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell, Tiss and Organ Cult*, 81:27-36
- Ascanio, D. E. (1994). *Biología del café*. Universidad Central de Venezuela, Caracas-Venezuela, ediciones de la biblioteca
- Ascanio, C. E. y Arcia, M. A., (1994). Efecto de un shock térmico sobre la androgénesis en *Coffea arabica* L. Var Garnica. *Agron Trop*, 2: 165-177
- Barbón, R, Jiménez, E. y Preil, W. (2008). Influence of in vitro environment on somatic embryogenesis of *C. arabica* L. cv. Caturra rojo: effects of carbon dioxide on embryogenic cell suspensions. *Plant Cell, Tiss and Organ Cult*, 95(2): 155-161

- Barros, E. V., da Guntha, W. G. y Miranda, A. C. (2001). Transient and stable expresión of GUS gene in the meristematic region of *C. arabica* embryos at different stages of in vitro cultivation. (RESUMEN). IX Encontro Latino-Americano de Biotecnología Vegetal (REDBIO), Goiás Brasil, p. 137
- Barry, D; Bertrand, B; Vasquez, N y Etienne, H (2002). Comparison of somatic embryogenesis- derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. *Ann. Bot*, 90: 77-85
- Baumann, T y Neuenschwander, B (1990). Tissue culture in coffee biotechnology. *Café Cacao Thé*, 24(2): 159-164
- Baumann, T W y Rohrig, L (1989). Formation and intracellular accumulation of caffeine and chlorogenic acid in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Phytochemistry*, 28 (10): 2667-2669
- Berthouly, M y Michaux-Ferriere, N M (1996). High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 44: 169-176
- Berthouly, M ; Guzman, N y Chatelet, P (1987). Micropropagation in vitro de diferentes lignées de *Coffea arabica* V. Catimor. ASIC, 12° Colloque, Montreux. pp: 462-467
- Bertrand-Desbrunais, A.; Noirot, M y Charrier, A (1991). Minimal growth *in vitro* conservation of coffee (*Coffea* spp). 1. Influence of low concentrations of 6-benzyladenine. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 27: 333-339
- Bieysse, D, Gofflot, A y Michaux-Ferriere, N (1993). Effect of experimental conditions and genotype variability on somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Can J Bot*, 71:1496-1502
- Briceño, G (1999). Cadena productiva del café; análisis de la cadena y propuestas de política. Ministerio de Producción y Comercio BID, p. 88.
- Bustillo, G (1998). Atlas de Venezuela. Edit. Larense. Caracas, Venezuela, p. 315
- Carneiro, M F (1999). Advances in coffee biotechnology. *Ag BiotechNet*, 1(1):1-14. Disponible en: <http://www.agbiotech.net/reviews/jan99/html/Carneiro.htm>. [Consulta: 01/03/2007]

- Cartay, R y Ablan, E (1997). Diccionario de Alimentación y Gastronomía en Venezuela. Fundación Polar. Caracas, Venezuela, p. 312
- Cirad, (2001). Coffee genetic transformation. [ON LINE]: <http://www.cirad.fr/>
- Cocking, E (2000). Plant protoplast. *In Vitro Cell Dev Biol*, 36: 77-82.
- Coffee Universe/ Coffee Universe-ity/ A brief history of coffee (2002). Disponible en: http://www.coffeeuniverse.com /university_hist.html [Consulta: 01/03/2002]
- Coffee Universe/ World of coffee (2002). Disponible en: http://www.coffeeuniverse.com /world_coffee_latin.html [Consulta: 01/03/2002]
- Conociendo más sobre café (2005). Disponible en :http://www.cafeimperial.com/conociendo_esp.php [Consulta: 01/03/2007]
- Costa de Rezende, J., Ferreira, E., Pasqual, M., Villa, F., Bothelo, C. y Pereira, S.(2008). Development of *C. arabica* L. seedlings obtained from direct somatic embryogenesis. *Coffee Science*, 3(1): 30-37
- Damatta, F; Maestri, M y Barros, R (1997). Photosynthetic Performance of two coffee species under drought. *Photosynthetica*, 34: 257-264
- De Guglielmo, Z; Altosaar, I; Zaidi, M y Menéndez, A. (2010). Transformation of coffee (*Coffea arabica* cv. Catimor) with the *cryIac* gene by biolistic, without the use of markers. *Brazilian Journal of Biology*, 70(3). En prensa
- Dublin, P (1981). Embryogenése somatique directe sur fragments de feuilles de caféier arabusta. *Café Cacao Thé*, 25 (4): 237-242
- Dublin, P (1984). Techniques de reproduction végétative in vitro et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé*, 28 (4): 231-244
- Dubuis, B.; Kut, O M y Prenosil, J E (1995). Pilot –scale culture of *Coffea arabica* in a novel Loop fluidised bed reactor. *Plant Cell, Tiss and Organ Cult*, 43: 171-183
- Dufour, M., Leroy, T., Carasco-Lacombe, C., Philippe, R. & Fenouillet, C. (2000). Coffee (*Coffea* sp.) genetic transformation for insect resistance, pp. 209-218. In: Coffee Biotechnology and Quality. Proceeding of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-Industry, Londrina, Brazil. Sera, T; Soccol, C. R.; Pandey, A. and Roussos, Kluwer Academic Publishers, Netherlands

- Esquivel, A A; Villalobos, V y Engelmann, F (1992). Cryopreservation of zygotic embryos of *Coffea* spp. *Cryo Lett*, 13: 297-302
- Etienne-Barry, H; Sotano, W; Vazquez, N, Teisson, C; Berthouly, M; Bertrand, B y Etienne, H (1998). Mass production of *Coffea arabica* somatic embryos in a bioreactor with temporary immersion and direct sowing in the nursery. CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement)
- Etienne-Barry, D, Bertrand, B, Vasquez, V y Etienne, H (1999). Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Rep*, 19(2): 111-117
- Etienne, D. y Bertrand, B. (2001). Trueness-to-type and agronomic characteristics *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. *Tree Physiol* 21:1031-1038
- Etienne, H.; Anthony, F.; Dussert, S.; Fernandez, D.; Lashermes, P y Bertrand, B (2002). Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). *In Vitro Cell, Dev Biol Plant*, 38: 129-138
- Etienne, D y Bertrand, B (2003). Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol*, 23:419-426
- Fazuoli, L., Maluof, M., Gerreiro-Filho, O., Medina-Filho, H. y Silvarolla, M. (2000). Coffee breeding, tissue culture and genetics, pp: 27-46. In: Coffee Biotechnology and quality. Proceeding of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the coffee Agro-Industry, Londrina, Brazil, Sera, T., Soccol, C., Pandey, A. & Roussos, S., kluwer Academics Publishers, Netherlands. p. 537
- Fernández, R y Menéndez, A (2003). Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electronic J Biotechnol*, 6: 29-38
- Fernández, R; Hermoso, L y Menéndez, A (2005). Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. *Interciencia*, 30(11): 694-698
- Ferreira, A., Kobayashi, A. K., Besspalhok, J. C., Pereira, L. F. P., Galvao, R. M. y Vieira, L. G. E. (2001). Transformation of *Coffea canephora* using particle bombardment. (RESUMEN). IX Encontro Latino-

- Americano de Biotecnología Vegetal (REDBIO), Goiás Brasil. Pp: 125
- Freire, A. V., Lighfoot, D. A. y Preece, J. E. (1994). Genetic transformation of coffee (*Coffea arabica* L.) by *Agrobacterium* spp. *Hort Science*, 29 (5): 454
- Frischknecht, P M; Baumann, T W y Wanner, H (1977). Tissue culture of *Coffea arabica* growth and caffeine formation. *Planta Medica*, 31: 344-350
- Frischknecht, P M y Baumann, T W (1980). The pattern of purine alkaloid formation in suspension cultures of *Coffea arabica*. *Planta Medica*, 40: 245-249
- Fuentes, S; Calheiros, M; Maneti-Filho, J y Vieira, L (2000). The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 60: 5-13
- Furuya, T; Orihara, Y y Koge, K (1991). Biotransformation of theobromine to caffeine in suspension and polyurethane foam immobilized coffee (*Coffea arabica* L.) cells. *Plant Cell Rep*, 9: 659-662
- García, E de y Menéndez-Yuffá, A (1987). Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto "Catimor". *Café Cacao Thé*, 31: 15-22
- García, E y Rafael, M (1989). Control de la oxidación y contaminación en microesquejes de café (*Coffea arabica* L. Catimor) cultivados *in vitro*. *Agron Trop*, 40 (4-6): 281-290
- Gatica, A ;Arrieta, G y Espinoza, A M (2007). Comparison of three *in vitro* protocols for direct somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. cvs. Caturra ana Catuai. *Agronomía Costarricense*, 31(1):85-94
- Gatica, A., Arrieta, G. y Espinoza, A. (2008^a). Direct somatic embryogenesis in *C. arabica* L. cvs. Caturra and Catuai: effect of triacontanol, light condition and medium consistency. *Agronomía Costarricense*, 32(1): 139-147
- Gatica, A., Arrieta, G. y Espinoza, A. (2008^b). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *C. arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. *E J Biotech*, 11(1). pp 12

- Giridhar, P; Kumar, V; Indu, E; Ravishankar, G y Chandrasekar, A (2004). Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex. Fr. *Acta Bot Croat*, 63(1):25-33
- Hatanaka, J; Arakawa, O; Yasuda, T; Ushida, N y Yamaguchi, I (1991). Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Rep*, 10: 179-182
- Hatanaka, T; Sawabe, E; Azuma, T; Uchida, N y Yasuda, T (1995). The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. *Plant Sci*, 107: 199-204
- Hatanaka, T; Choi, Y; Kusano, T y Sano, H (1999). Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation. *Plant Cell Rep*, 19 (2): pp.106-110
- Herman, E. y Haas, G (1975). Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. *Hortscience*, 10 (6): 588-590
- Hermoso, L. y Menéndez, A (2000). Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acta Científica Venezolana*, 51: 90-95
- Herrera, J.; Moreno, L; Acuña, J.; De Peña, M y Osorio, D (2002). Colchicine-induced microspora embryogenesis in coffee. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 71:89-92.
- Hill, A (1965). Botánica Económica. Plantas útiles y productos vegetales. Omega, Barcelona, España, p. 616
- Jaramillo, J (1996). El café en Venezuela. Universidad Central de Venezuela, ediciones de la biblioteca, Caracas-Venezuela. p. 280
- Jimenez, E; Fera, M; Preil, W; Barbón, R; Capote, A y Chávez, M (1998). Uso de biorreactores para la producción de embriones somáticos de café (*Coffea arabica* L.) (Resumen). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba. p. 515
- Kartha, K; Mroginski, L; Pahl, K y Leung, N (1981). Germplasm preservation of coffee (*Coffea arabica* L.) by in vitro culture of shoot apical meristems. *Plant Science Lett*, 22: 301-307
- Kasuga, M; Liu, Q; Miura, S; Shinozaki, K Y y Shinozaki, K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech*. 17: 287-291

- Kumar, V; Satyanarayana, K; Sarala, S; Indu, E; Giridhar, P; Chandrashekar, A y Ravishankar, G (2006). Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. By *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. *Plant Cell Rep*, 25(3): 214-222
- Lanaud, C (1981). Production de plantules de *C. Canephora* par embryogénese somatique réalisée á partir de culture *in vitro* d'ovules. *Café Cacao Thé*, 25 (4): 231-236
- Leroy, T; Henry, A; Royer, M; Altosaar, I; Frutos, R y Phillipe, R (2000). Genetically modified coffee plants expressing the *B. thuringiensis cry1Ac* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep*, 19: 382-389
- Londoño, L y Orozco, F (1986a). Métodos de propagación de cafetos mediante cultivo *in vitro*. *Cenicafé*, 37 (4): 119-133
- Londoño, L y Orozco, F (1986b). El cultivo *in vitro* de células y tejidos del cafeto. *Cenicafé*, 37(4):135-146
- MAT (1994). Hace 211 años comenzamos a beber café. El Agricultor Venezolano. LII, (266): 20-21
- MAT (2008). Anuario estadístico agropecuario. Dirección de estadística e informática. p. 319
- Mazzafera, P; Silvarolla, M; De Lima, M y Filho, H (1997). Caffeine content of diploid coffee species. *Ciência e Cultura J Brazilian Asso Adv Sci*, 49(3): 216-218
- Marques, D (1993). Induction of somatic embryogenesis on *Coffea eugenioides* moore by *in vitro* culture of leaf explants. *Café Cacao Thé*, 37 (3): 251-255
- Menéndez-Yuffá, A; García, E de y Segura, N (1994). Comparative study of protein electroforetic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Rep*, 13: 197-202
- Menéndez-Yuffa, A y García, E (1996). Análisis de patrones isoenzimáticos en callos embriogénicos y no embriogénicos de café. *Phyton*, 58(1/2): 15-22
- Menéndez-Yuffá, A y García, E de (1997). Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma*, 199: 208-214
- Menéndez-Yuffá, A y García, E de (1998). La biotecnología aplicada al café. *Mem IBE*, 1: 165-168

- Menéndez-Yuffá, A y Hermoso-Gallardo, L (1998). Estudio comparativo de la embriogénesis somática en café a partir de secciones de hojas de plantas de invernadero y vitroplantas (resumen). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana pp. 515
- Michaux-Ferriere, N ; Bieysse, D.; Alvard, D y Dublin, P (1989). Etude histologique de L'embryogenése somatique chez *Coffea arabica*, induite par culture sur milieux uniques de fragments foliaires de génotypes différents. *Café Cacao Thé*, 33 (4): 207-217
- Montes, S (1982). Cultivo *in vitro* de embriones de *Coffea arabica* L. Variedad Caturra. *Cultivos Tropicales*, 4(1):49-55
- Muniswamy, B y Sreenath, H. (2000). Standardization of encapsulation technique for producing synthetic seeds in coffee, pp. 135-142. In: Coffee Biotechnology and Quality. Proceeding of the 3rd International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agro-Industry, Londrina, Brazil. Sera, T., Soccol, C. R., Pandey, A. & Roussos, Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Naidu, M y Srenivasan, C (2004). Effect of abscisic acid and cytokininins on cultured zygotic embryos of *Coffea arabica* c.v. Cauvery (Catimor). *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 79:279-284.
- Nassuth, A; Wormer, T; Bouman, H y Staristky, G (1980). The histogenesis of callus in *Coffea canephora* stem explants and the discovery of early embryoid initiation. *Acta Bot Neerl*, 29(4):49-54
- Neuenschwander, B y Baumann, T (1992). A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep*, 10: 608-612.
- Neuenschwander, B. y Baumann, T (1995). Increased frequency of dividing microspores and improved maintenance of multicellular microspores of *Coffea arabica* in medium with coconut milk. *Plant Cell Tiss and Organ Cult*, 40:49-54
- Noceda, C; Jiménez, E; Barbón, R; Capote, A; Quiala, E; Chávez, M; Pérez, N y Pérez, J (1998). Estudio del potencial embriogénico en diferentes explantes foliares de *Coffea canephora* Cv. Robusta (Resumen). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana, Cuba. p. 515
- Ogita, S; Uefuji, H; Morimoto, M y Sano, H (2004). Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine

- biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant Mol Biol*, 54: 931-941
- Peña, M (1983). The somatic embryo induction and plant regeneration from *Coffea canephora* and *Coffea arabica*. En: Simposio sobre ferrugens do cafeeiro, Octubre 17-20, 1983, Oeiras, Portugal, pp 493-512
- Peña, M y Serna, H (1984). Adaptación de plantas de *Coffea arabica* var. Mundo Novo, obtenidas por embriogénesis somática, a cultivo bajo condiciones de campo. *Cenicafé*, 33(3): 66-76
- Pereira, L; Galvao, R; Kobayashi, A; Cacao, S y Vieira, L (2005). Ethylene production and ACC oxidase gene expression during fruit ripening of *C. arabica* L. *Braz. J Plant Fisiol*, 17: 283-289
- Pereira, A; de Carvalho, S; Pasqual, M y Santos, F (2007). Embriogénesis somática direta em explantes foliares de *Coffea arabica* L. Cv. Acaia Cerrado: Efeito de cinetina e ácido giberélico. *Cienc Agrotec Lavras*, 31(2):332-336
- Perthuis, B; Pradon, J; Montagnon, C; Dufour, M y Leroy, T (2005). Stable resistance against the leaf miner *Leucoptera coffeella* expressed by genetically transformed *Coffea canephora* in a pluriannual field experiment in French Guiana. *Euphytica*, 144: 321-329
- Potrykus, I y Shillito, R (1988). Protoplasts: isolation, culture, plant regeneration, pp. 543. In: Methods for plant molecular biology, Weissbach, A, Weissbach, H (eds), Harcourt Brace Jovano vich publishers, San Diego, California (USA)
- Puite K (1992). Progress in plant protoplast research. *Physiol Plant*, 85: 403-410
- Purseglove, J (1968). Tropical crops dicotyledons. V.2. edit. Longmans, London-Grat Britain. Pp 458-492
- Quiroz-Figueroa, F; Fuentes-Cerda, C; Rojas-Herrera, R y Loyola-Vargas, V (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep*, 20 (12): 1141-1149
- Rani, V; Singh, K; Shiran, B; Nandy, S; Goel, S; Devarumath, R; Sreenath, H y Raina, S (2000). Evidence for new nuclear and mitochondrial genome organizations among high-frequency somatic

- embryogenesis-derived plants of allotetraploid *Coffea arabica* L. (Rubiaceae). *Plant Cell Rep*, 19: 1013-1020
- Ribas, A; Kobayashi, A; Pereira L y Vieira, L (2005). Genetic transformation of *Coffea canephora* P. by particle bombardment. *Biol Plant*, 49: 493-497
- Ribas, A; Pereira, L y Vieira, L (2006). Genetic transformation of coffee. *Braz J Plant Physiol*, 18(1): 83-94
- Rosillo, A; Acuña, J; Gaitán, A y de Pena, M (2003). Optimised DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. *Plant Cell Tissue and Organ Cult*, 74 (1): 45-49
- Samson, N; Campa, C; Gal, L; Noirot, M; Thomas, G.; Lokeswari, T y de Kochko, A (2006). Effect of primary culture medium composition of high frequency somatic embryogenesis in different *Coffea* species. *Plant Cell, Tiss and Organ Cult*, 86:37-45
- Sharp, W; Caldas, L; Crocomo, O; Monaco, L y Carvalho, A (1973). Production of *Coffea arabica* callus of three ploidy levels and subsequent morphogenesis. *Phyton*, 31 (2): 67-74
- Söndahl, M; Salisbury, J y Sharp, W (1979). SEM characterization of embryogenic tissue and globular embryos during high frequency somatic embryogenesis in coffee callus cells. *Z Pflanzenphysiol*, 94: 185-188
- Söndhal, M y Mónaco, L (1981). *In vitro* methods applied to coffee. En: Thorpe, T.A. Plant tissue culture methods and applications in agriculture, Academic Press, USA. Pp: 325-347
- Söndahl, M y Lauritis, J (1992). Coffee. In: Biotechnology of perennial fruit crops, edited by F. A. Hammerschlag and R.E. Litz C. A. B. International, England, UK, n°8. pp. 530
- Spiral, J; Thierry, C; Paillard, M y Petiard, V (1993). Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. *Comp Rend Acad Sci Paris*, 316: 1-6
- Sreenath, H., Shanta, H., Baku, K. y Naidu, M. (1995). Somatic embryogenesis from integument (perisperm) cultures of coffee. *Plant Cell Rep*. 14:670-673
- Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neerl.* 19 (4): 509-514

- Sybenga, J. 1960. Genética y Citología del café. Una revisión de literatura. *Turrialba*, 10(3): 83-137
- Van Boxtel, J.; Berthouly, M.; Carasco, C. y Eskes, A. (1995). Transient Expresión of b-Glucuronidase Following Biolistic Delivery of Foreign DNA into Coffee Tissues. *Plant Cell Rep*, 14: 748-752
- Yasuda, T; Fujii, Y y Yamaguchi, T (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benzyladenine. *Plant Cell Physiol*, 26: 595-597
- Zorinants, S; Nosov, A; Monforte-González, M; Mendes-Zeel, M y Loyola-Vargas, V (2003). Variation of nuclear DNA content during somatic embryogenesis and plant regeneration of *Coffea arabica* L. using cytophometry. *Plant Sci*, 164:141-146
- Zok, S y Dublin, P (1991). Multiplication vegetative *in vitro* par culture de l'apex chez *Coffea arabica* L.: action de solutions minérales et de régulateurs de croissance. *Café Cacao Thé*, 25 (4): 245-256