

Ingeniería genética aplicada al café

Genetic engineering applied to coffee

Zoraya DE GUGLIELMO CRÓQUER

Laboratorio de Genética, Instituto de Oncología y Hematología, Universidad Central de Venezuela. Ciudad Universitaria, Los Chaguaramos, Caracas, Venezuela. E-mail: zdegugli@gmail.com

Recibido: 17/03/2009
Primera revisión recibida: 09/08/2009

Fin de primer arbitraje: 03/08/2009
Aceptado: 01/10/2009

RESUMEN

Café es el nombre común de las semillas provenientes de los arbustos del género *Coffea*, de la familia de las Rubiáceas, cuyo cultivo tiene gran importancia agronómica y comercial en el mundo. Esta planta está expuesta a distintos tipos de estrés biótico y abiótico que pueden afectar su rendimiento y productividad, ocasionando pérdidas económicas considerables. Debido a esto, se han realizado diversas investigaciones enfocadas en su mejoramiento tanto por métodos tradicionales como por ingeniería genética. En este trabajo se realizó una revisión sobre aspectos básicos de la aplicación de técnicas de biología molecular y cultivo de tejidos para el desarrollo de resistencia a factores biológicos y físicos que afectan al café.

Palabras clave: Café, ingeniería genética, transformación genética, cultivo *in vitro*

ABSTRACT

Coffee is the common name of seeds from bushes of the genus *Coffea*, family Rubiaceae, whose cultivation is of great agricultural and commercial importance on the world. This plant is exposed to various biotic and abiotic stress that can affect its performance and productivity, causing considerable economic losses. Because of this, there have been several investigations focused on its improving both by traditional methods such as genetic engineering. In this paper, a review was conducted on basic aspects of the application of molecular biology techniques and tissue culture for the development of resistance to biological and physical factors affecting the coffee.

Key words: Coffee, genetic engineering, genetic transformation, *in vitro* culture

INTRODUCCIÓN

Desde que el hombre comenzó a sembrar semillas silvestres y a escoger las plantas y frutos por su color, sabor, textura y conservación se produjo un proceso de selección que condujo a la modificación de las frecuencias alélicas en un cultivo. Posteriormente, se introdujo el mejoramiento formal con las hibridaciones entre individuos seleccionados, lo que permitió la transferencia de caracteres de interés entre especies e, incluso, de especies silvestres a las de interés agronómico. En los últimos años, con el auge de las técnicas moleculares y los sistemas de cultivo *in vitro* ha surgido la Ingeniería Genética de Plantas, la cual ha revolucionado las técnicas de mejoramiento convencionales, ya que con esta disciplina que tiene los mismos objetivos del fitomejoramiento clásico, se incrementa el rango de caracteres de interés a transferir a las especies vegetales: estos caracteres no sólo están codificados

por genes de origen vegetal, sino también animal o microbiano (Sánchez 2003). Todo esto para obtener mejoras cualitativas y cuantitativas en las plantas y sus productos, lo cual es de gran importancia para una población mundial cada vez más exigente, con elevados índices de desnutrición y que va aumentando considerablemente en el tiempo. Este trabajo es una revisión bibliográfica sobre la aplicación de técnicas de ingeniería genética al cultivo de café, una planta de gran interés agronómico y comercial en el mundo.

Mejoramiento genético del café y cultivo *in vitro*

Dadas las características del café en cuanto a crecimiento (planta semi-perenne de crecimiento lento que produce la primera cosecha a partir de los 3 años de edad), el mejoramiento mediante métodos tradicionales basados en la selección, cruces con individuos seleccionados y propagación de dichos individuos, puede implicar largos periodos de tiempo;

por ello, la combinación de métodos de mejoramiento tradicional y métodos de transformación genética (*Agrobacterium*, biobalística o electroporación) ofrece una alternativa para lograr el mejoramiento de esta planta (Etienne *et al.* 2002; Café Imperial-Venezuela, 2005).

Las técnicas de cultivo de tejidos están bien establecidas en algunas especies de cafeto, resaltando *Coffea arabica* y *Coffea canephora*, a partir de muestras obtenidas de la mayoría de los órganos. La propagación puede ser mediante microesquejes (por organogénesis) o por embriogénesis somática, siendo esta última la principal vía de regeneración por presentar la mayor tasa de multiplicación (Baumann y Neuenschwander 1990). Söndhal y Mónaco (1981) y Menéndez-Yuffá *et al.* (1994) señalan que este método fue establecido inicialmente por Staritsky en 1970 a partir de secciones de tallo de brotes ortotrópicos de *C. canephora*, donde los embriones somáticos se formaron por embriogénesis somática indirecta en la superficie de un callo compacto y amarillo desarrollado por el explante; sin embargo, la frecuencia embriogénica es mayor a partir de secciones foliares, resaltando el último par de hojas más cercanas al ápice de la rama, las cuales poseen mayor potencial embriogénico (Neuenschwander y Baumann 1992; Söndhal y Sharp 1977; Söndhal y Mónaco 1981). Las hojas utilizadas como explante inicial pueden provenir de vitroplantas o de plantas de invernadero; no obstante, se ha reportado que las primeras ofrecen mayor rendimiento embriogénico que las segundas (Menéndez-Yuffá y Hermoso-Gallardo 1998; Van Boxtel y Berthouly 1996).

La inducción de embriogénesis somática requiere la combinación de una auxina y una citoquinina (la segunda en mayor proporción respecto a la primera), aunque es posible tal inducción con el uso de una citoquinina solamente (García y Menéndez-Yuffá 1987; Hatanaka *et al.* 1991). Gatica *et al.* (2008^a) evaluaron el efecto del triacontanol (TRIA), un alcohol vegetal primario endógeno que incrementa el crecimiento y la productividad al elevar la producción de ATP y la fotosíntesis, observando que la combinación del TRIA con ácido indolacético (AIA) aumenta la formación de embriones somáticos en *C. arabica* cvs. Catuaí y Caturra. Otro factor importante en la producción de embriones somáticos es la concentración de CO₂; Barbón *et al.* (2008) estudiaron el efecto de este gas en la embriogénesis somática de *C. arabica* cv Caturra Rojo, reportando que la concentración más baja probada (2,5%)

estimuló la producción de embriones somáticos y su diferenciación en suspensiones celulares embriogénicas. Explicaron que este efecto se debe a que el CO₂ modifica el pH del medio.

Los embriones formados por embriogénesis somática pasan por los mismos estadios que los embriones cigóticos: globular, corazón y torpedo, y la diferenciación es asincrónica ya que suelen observarse las tres formas de embriones simultáneamente sobre la superficie del callo. Los embriones del tipo torpedo, a punto de entrar al estado cotiledonar, pueden dar origen a embriones somáticos secundarios que se observan en la zona basal del hipocotilo, lo que es indicativo del alto potencial de regeneración de este cultivo (Menéndez-Yuffá y García 1997). Por otra parte, en estudios sobre expresión de proteínas, se han reportado diferencias en los patrones electroforéticos de callo embriogénico y no embriogénico, así como entre embriones globulares, corazón y torpedo; esto sería indicativo de una expresión diferencial de proteínas que estaría correlacionada con diferencias histológicas a nivel de callo y con las distintas fases de desarrollo de los embriones somáticos (Menéndez-Yuffá *et al.* 1994).

En cuanto a la adaptación a tierra de las plantas obtenidas *in vitro*, se ha señalado que tal adaptación 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-Etienne *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 vitroplantas y afectar negativamente el proceso de adaptación *ex vitro*. Al respecto, Menéndez-Yuffá y García (1998) estudiando el material genético de plantas obtenidas *in vitro*, encontraron que en casi el 80% de las células analizadas la mitosis ocurría en forma normal; pero hubo un bajo porcentaje con alteraciones en el número cromosómico, lo cual es desfavorable para la conservación de las características de las plantas y pudiera estar involucrado en las pérdidas durante la adaptación *ex vitro*.

También se ha establecido con éxito el cultivo en suspensión, en el cual se generan embriones somáticos en gran escala y se producen metabolitos secundarios (Zamarripa 1991; Menéndez-Yuffá y

García 1998); las suspensiones celulares ofrecen ventajas como sistema de propagación masiva de plantas por las altas tasas de multiplicación que presentan, una mayor homogeneidad en las condiciones de cultivo y la posibilidad de automatización (Hermoso-Gallardo y Menéndez-Yuffá 2000). La automatización llevó al desarrollo del Sistema de Inmersión Temporal o RITA, concebido por el CIRAD, en el cual el contacto de los explantes con el medio de cultivo líquido se reduce a pocos minutos por día, lo que permite eliminar desórdenes fisiológicos ligados a la inmersión permanente propia de los biorreactores clásicos y los frascos Erlenmeyer, incluyendo el desarrollo asincrónico de la población de embriones, anomalías morfológicas y heterogeneidad del tamaño; mediante este sistema, para *C. arabica*, se ha señalado la obtención de 7500 a 15000 plantas aclimatadas por gramo de suspensión embriogénica puesto a regenerar después de 9 meses de cultivo, de los cuales 6 transcurrieron *in vitro* (Etienne *et al.* 1999).

Cabe destacar que el cultivo *in vitro* es muy importante para la preservación del germoplasma, considerando que las semillas de café pierden viabilidad con el tiempo. El desarrollo e implementación de esta técnica permite mantener el germoplasma en espacios reducidos, facilita su transporte y reduce los riesgos fitosanitarios (Menéndez Yuffá y García 1998). Además, el cultivo de tejidos *in vitro* es pilar fundamental para la regeneración y, en consecuencia, el éxito del mejoramiento vegetal mediante transformación genética. En el caso particular de la embriogénesis somática secundaria, la formación de embriones somáticos secundarios a partir de tejidos potencialmente transformados (callo embriogénico, embriones torpedos y hojas de vitroplantas) es interesante, no solo desde el punto de vista regenerativo, sino también por la posibilidad de eliminar fenómenos de expresión genética en mosaico, lo cual, según Bastar *et al.* (2004) se refiere a que células individuales en tejidos vegetales transformados poseyendo la misma constitución genética y aparentemente la misma información tejido específica, expresen silenciamiento del gen en una parte del tejido. Tal posibilidad tendría lugar considerando el origen unicelular de los embriones, la formación de embriones secundarios a partir de células potencialmente transformadas y la regeneración de plantas a partir de estos embriones secundarios (las cuales, en consecuencia, expresarían al transgen uniformemente).

Esto pone en evidencia la importancia de la embriogénesis somática secundaria en los programas de mejoramiento vegetal a través de métodos de transformación genética, puesto que las plantas transgénicas pueden ser propagadas masivamente a partir de tejidos potencialmente transformados, manteniendo su fidelidad genética (Fernández *et al.* 2005).

Características de la transformación genética del café

A pesar del éxito reportado en relación a la introducción de genes foráneos (reporteros y/o de selección) en café por distintos investigadores 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.

Los estudios sobre transformación genética de café se han llevado a cabo mediante métodos biológicos (*Agrobacterium*) y métodos físicos (polietilenglicol, electroporación y biobalística) con la finalidad de estandarizar los parámetros de transformación y de introducir genes para la resistencia a antibióticos, herbicidas y plagas.

Genes foráneos introducidos en café

Los genes introducidos en café para la evaluación de métodos de transformación genética, son básicamente de origen bacteriano (*gus*, *nptII*, *hpt*, *bar*, *rol*, *aux*, *nos*, *cryIac*), aunque también se han empleado genes de origen vegetal (*csr 1*).

El gen *gus* o *uida* obtenido de *Escherichia coli* es utilizado como gen reportero, ya que permite monitorear a corto plazo el resultado del procedimiento de transformación genética, a partir de la producción de color en los explantes transformados consecuencia de la acción de la enzima β -glucuronidasa (codificada por dicho gen) sobre su sustrato, el X-gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-glucuronido). La prueba de expresión transitoria de este gen reportero se ha realizado mediante la reacción histoquímica GUS, según el protocolo descrito por Jefferson *et al.* (1987). Esta reacción ha sido empleada en estudios de estandarización a partir

de la expresión transgénica transitoria. Tales pruebas de estandarización son la base para la puesta a punto de un protocolo de transformación eficiente donde se ha maximizado la cantidad de células competentes en las que ocurren, de manera simultánea en una misma célula, tres procesos necesarios para obtener una planta transgénica: transferencia del transgen al interior de la célula, integración del transgen al ADN celular y regeneración de una planta completa en la que se verificaron los pasos anteriores (Díaz *et al.* 2004). Esto es muy importante considerando que células y explantes de distinto genotipo, e incluso explantes diferentes de un mismo genotipo, tienen diferente competencia o capacidad de respuesta para cada uno de los procesos mencionados. Al respecto, Gahakwa *et al.* (2000) señalan que con diversas especies vegetales, especialmente de interés agronómico, se han realizado pruebas de transformación con genes marcadores y reporteros, lo cual constituye en la mayoría de los casos el primer paso para la transformación con genes de interés; estas pruebas proveen información útil sobre la herencia y expresión de los genes utilizados en plantas transgénicas, pero es importante confirmar si los resultados obtenidos usando genes marcadores o reporteros pueden ser extrapolados a genes agronómicamente importantes. Estos autores, trabajando con arroz y utilizando genes marcadores (*bar*), reporteros (*gus*) y con actividad insecticida (*cryIac*, *cry2a*) encontraron que tales resultados eran extrapolables. Igualmente, Chen *et al.* (1998) reportaron una correlación positiva entre expresión transitoria e integración estable con el uso del bombardeo de micropartículas. Por su parte, Tian y Seguin (2004) explican que la relación entre expresión transitoria e integración estable de genes introducidos no es simple y que si bien la expresión transitoria no es el único factor determinante para la transformación estable, constituye el de mayor peso, por lo que los resultados de pruebas de expresión transitoria son frecuentemente utilizados como indicadores para el desarrollo de transformación estable en muchas plantas y tejidos.

Los genes *nptIII* y *hpt* se han usado como marcadores de selección en base a la resistencia a antibióticos. El primero proviene de *E. coli* y codifica a la enzima neomicina fosfotransferasa, la cual confiere resistencia a la kanamicina y la paramomicina. Este gen fue colocado bajo el control de un promotor no funcional en bacterias, a pesar de lo cual es un sistema de selección altamente eficiente; esto le confiere ventajas a nivel de bioseguridad en

comparación a otros genes de resistencia bajo el control de promotores funcionales en bacterias, ya que se elimina el riesgo de expresión o de flujo genético horizontal de genes de resistencia a antibióticos desde la planta transgénica a las bacterias entéricas o del suelo. Libiakova *et al.* (2001) insertaron el intrón IV2 de un gen de papa en el centro de la secuencia codificante *nptIII* para prevenir la expresión de este gen procarionota en bacterias entéricas y animales domésticos como consecuencia del flujo genético desde las plantas transformadas. Dicho intrón contiene numerosos codones de terminación que, entonces, interrumpen el marco de lectura abierto de *nptIII*. También se ha señalado que este gen no es alergeno (Courvalin 1998). Por su parte, el gen *hpt* codifica a la enzima higromicina fosfotransferasa y confiere resistencia a la higromicina; proviene de la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*.

Los genes *bar*, *pat* y *csrl-1* confieren resistencia a herbicidas. Los primeros provienen de *S. hygroscopicus* y *S. viridochromogenes*, respectivamente, y codifican a la enzima fosfinotricina acetiltransferasa para la resistencia al glufosinato de amonio, herbicida conocido como Basta o Bialaphos; el tercero, también llamado *ahas*, ha sido aislado de *Arabidopsis thaliana* y confiere resistencia al herbicida clorosulfurón a partir de la enzima acetolactatosintetasa.

El gen *nos* proviene de *A. tumefaciens* y los genes *rol* y *aux* provienen de *A. rhizogenes*; se han usado como marcadores de selección de transformantes a partir de la morfogénesis.

Para la resistencia a lepidópteros, como el minador de la hoja del café *Leucoptera coffeella*, se ha utilizado el gen *cryIac* aislado de *Bacillus thuringiensis*. En el caso particular de esta plaga, considerada como la de mayor infestación del café arábigo (Mondragón *et al.* 2004) es de gran interés la transformación genética para su control, ya que el daño es producido en la fase de larva, la cual tiene un desarrollo endocárpico estricto, por lo que el rocío de formulaciones químicas pierde practicidad. Además, se ha señalado que la proteína codificada por el gen *cryIac* es un biopesticida específicamente tóxico para larvas de lepidópteros, inocua para el ambiente y otros seres vivos, a diferencia del control químico que tiene un amplio rango de acción y efectos contaminantes considerables (Guerreiro *et al.* 1998). La secuencia codificante nativa del gen *cryIac* ha

sido modificada mediante técnicas de Ingeniería Genética para favorecer su expresión en plantas; esta modificación consistió en el aumento del contenido de pares de base G+C, de 37% a 47,7%, con lo que se incrementó la homología entre el gen y el genoma vegetal, sin alterar las características del producto final del gen (Sardana *et al.* 1996).

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).

Promotores y terminadores

Los genes introducidos al café en los estudios de transformación genética han sido colocados bajo el control de promotores constitutivos, como el CaMV35S y EF1 α . Es importante considerar que a pesar de que los promotores constitutivos actúan en todos los tejidos, cada vez que se insertan genes regulados por este tipo de promotores se observan diferencias en cuanto a la especificidad para el tejido o el grado de expresión de los genes bajo su control. En consecuencia, aún cuando se activan los genes, no siempre se activan en el mismo grado en todos los tejidos (Rodríguez y Chamberlin 1982). El EF1 α ha sido obtenido de *A. thaliana*. El más utilizado ha sido el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S), considerado como un promotor fuerte (también puede regular la expresión genética en organismos no relacionados). El CaMV es el principal miembro de los caulimovirus, que además son los únicos virus vegetales conocidos que poseen ADN de doble cadena. Ha mostrado ser menos eficiente en la transformación de monocotiledóneas del tipo cereales, en las cuales han resultado más efectivos los promotores Act I de arroz y Ubi I de maíz. El efecto

contrario se ha reportado para monocotiledóneas no cereales, donde la efectividad del promotor CaMV35S incrementa considerablemente cuando se le emplea duplicado (Kanno *et al.* 2000). En este sentido, la duplicación de dicho promotor parece tener un efecto intensificador sobre su función a nivel de expresión. A pesar de que el promotor CaMV35S es, al parecer, más fuerte que otros promotores constitutivos, los promotores Act I y Ubi I tienen la ventaja, desde el punto de vista de la bioseguridad, de ser de origen vegetal; algunos investigadores también han reportado que, si bien el número de transformantes iniciales obtenidos con el promotor CaMV35S es más elevado que con el Ubi I o el Act I, con el primero pudiera ser igualmente mayor el eventual silenciamiento observado (Dahleen *et al.* 2001).

Leroy *et al.* (2000) trabajando en transformación de café utilizaron el promotor CaMV35S duplicado, con lo cual reportaron un efecto intensificador en la regulación de la expresión del gen *csr1-1* aislado de *A. thaliana*, el cual confiere resistencia al herbicida clorosulfurón, que fue usado como marcador de selección. También usaron el promotor EF1 α de *A. thaliana*, cuya eficiencia ya había sido probada por Van Boxtel *et al.* (1995), junto con la secuencia intensificadora llamada Ω' derivada del virus del mosaico del tabaco. Sin embargo, la eficiencia de transformación fue mayor con el promotor CaMV35S duplicado.

Por su parte, Van Boxtel (1994) y Van Boxtel *et al.* (1995), colocaron al gen reportero *gus* bajo el control de los promotores EF1 α , CaMV35S y Ubi I de maíz, encontrando un incremento de la expresión transitoria con el primero, en comparación a lo observado con los otros dos.

También se han realizado ensayos con promotores propios del café, incluyendo el promotor de la α -tubulina (nro. de accesoión al Genbank AF363630) y de la proteína de almacenamiento 11S de *C. arabica* (nro. de accesoión al Genbank AF055300), para dirigir la expresión del gen *gus* en suspensiones celulares transformadas por biobalística, obteniéndose resultados similares en comparación a la expresión observada al utilizar el promotor CaMV35S, pero con las ventajas que ofrece el uso de secuencias propias de la planta al nivel de bioseguridad (Rosillo *et al.* 2003).

En cuanto a las secuencias terminadoras, se ha utilizado frecuentemente el terminador de la nopalina sintetasa NOS de *Agrobacterium*.

Métodos utilizados en la transformación genética de café

Como se mencionó, la transformación genética de café se ha llevado a cabo mediante métodos físicos y biológicos que incluyen *Agrobacterium*, polietilenglicol, electroporación y biobalística.

De Peña (1995) y Carneiro (1999) hacen referencia a la transformación de protoplastos de *C. arabica* cv. Colombia mediante tratamiento con polietilenglicol, registrándose expresión transitoria del gen reportero *gus* y resistencia a la kanamicina a partir de la expresión del gen *nptII* utilizado como marcador de selección. Sin embargo, no se reporta regeneración de plantas transformadas. Esto probablemente se deba a la vulnerabilidad de los protoplastos; en este sentido, Díaz *et al.* (2004) explican que el cultivo de protoplastos es la metodología más sofisticada del cultivo *in vitro* de plantas por lo cual representa gran complejidad experimental, no estando disponible más que para algunas especies y, dentro de ellas, particularmente en genotipos modelo. Por ello se desarrollaron metodologías alternativas de transformación directa, como electroporación y bombardeo de micropartículas o biobalística.

La transformación de protoplastos de café también se ha llevado a cabo mediante electroporación. Barton *et al.* (1991) electroporaron protoplastos de *C. arabica*, reportando la obtención de embriones somáticos transformados y la regeneración de plantas que fueron seleccionadas en base a la resistencia a kanamicina. Sin embargo, estas plántulas no sobrevivieron debido a un sistema radicular pobremente desarrollado. Van Boxtel (1994) señala la expresión del gen *gus* en distintos genotipos electroporados de café, pero sin la sobrevivencia del material regenerado. Por otra parte, Fernández y Menéndez (2003) optimizaron los parámetros de transformación de tejidos intactos de café mediante electroporación, reportando la regeneración del material transformado con resultados positivos en la reacción GUS y en la PCR para los genes introducidos (*gus* y *bar*); los mejores resultados fueron obtenidos al electroporar embriones torpedos

que previamente fueron tratados para la digestión parcial de la pared celular.

La transformación por biobalística se ha llevado a cabo con los genes *gus*, *bar* 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) evaluaron los parámetros de transformación de café mediante biobalística en base a la expresión transitoria del gen reportero *gus*. Ellos probaron varios explantes (callo, suspensiones celulares, hojas de vitroplantas y de plantas de invernadero, embriones somáticos y suspensiones celulares); también probaron el efecto de incubaciones pre bombardeo con antioxidantes (cafeína, polivinilpirrolidona y sulfito de sodio) y post bombardeo con auxinas en la expresión transitoria de dicho gen. Ninguno de los antioxidantes probados favoreció tal expresión. Los mejores resultados los obtuvieron al usar hojas de vitroplantas, dadas las características morfológicas y regenerativas de este explante. La incubación post bombardeo en medio líquido suplementado con una auxina favoreció tanto la recuperación del material bombardeado como la expresión del gen *gus*, debido a una reducción en la oxidación y la necrosis tisular. Se ha señalado que esta incubación disminuye la oxidación del tejido después del bombardeo al disminuir la liberación de polifenoles y favorecer la recuperación frente al daño mecánico sufrido; también puede realizarse antes del bombardeo, como un pretratamiento osmótico dirigido a facilitar la penetración de las micropartículas. La incubación en medio líquido posterior al procedimiento de transformación también fue señalada como favorable por Fernández y Menéndez (2003) en la recuperación y regeneración de explantes de café transformados por electroporación, al permitir un mejor intercambio gaseoso, uniformidad en la disponibilidad de nutrientes y rápida incorporación de estos y otros metabolitos a las células, así como la difusión al medio de compuestos fenólicos que pudieran interferir negativamente en la activación del potencial embriogénico del tejido.

Rosillo *et al.* (2003) bombardearon suspensiones celulares de *C. arabica* cv. Colombia con plásmidos de la serie pCAMBIA (Centre for the Application of Molecular Biology to International Agriculture-Canberra, Australia), variando parámetros físicos en la pistola de bombardeo (distancia hasta el explante y presión de helio) y la duración y concentración de tratamientos osmóticos

prebombardeo. Reportan expresión transitoria del gen reportero *gus*, la cual incrementó considerablemente en el material preincubado durante 4 horas con manitol y sorbitol, bombardeado a 900 psi con una distancia de 9 cm o 1550 psi con 12 cm de distancia. Sin embargo, no reportan la regeneración de plantas. Gatica-Arias *et al* (2008^b) también bombardearon agregados de suspensiones celulares de *C. arabica* cvs Caturra y Catuaí con el gen *gus*, y lograron la regeneración vegetal via embriogénesis somática indirecta.

Barros *et al.* (2001) realizaron la transformación mediante biobalística de embriones cigóticos de *C. arabica* con el gen *ahas*, logrando la selección del material transformado en base a la resistencia al herbicida Imazapyr, pero tampoco lograron la obtención de plantas.

Cunha *et al.* (2004) señalan la transformación de callo embriogénico de *C. arabica* utilizando los genes *gus* y *nptIII*, con la selección de callo transformado en base a la resistencia a kanamicina y la regeneración de plantas que fueron positivas en la expresión transitoria del gen reportero y en la PCR para los genes foráneos. Ribas *et al.* (2005) también reportan la regeneración de plantas resistentes al herbicida Basta, a partir del bombardeo de explantes de *C. canephora* con los genes *gus* y *bar*.

En cuanto a la transformación por *Agrobacterium*, se han utilizado las especies *tumefaciens* y *rhizogenes*, utilizando genes propios de estas bacterias, así como foráneos (*gus*, *nptIII*, *hpt*, *csrI* y *cryIac*). Ocampo y Manzanera (1991) lograron la infección de hipocótilos de *C. arabica* germinados de semillas *in vitro* con *A. tumefaciens*, sin la regeneración de plantas. Spiral *et al.* (1993) transformaron embriones somáticos torpedos de *C. canephora* (a los que se les hizo cortes superficiales con un bisturí) usando *A. rhizogenes* portando los genes *gus* y *bar*; reportaron la obtención de plantas positivas en la prueba histoquímica GUS y en la PCR para los genes mencionados. Sugiyama *et al.* (1995) reportaron la transformación de café con el gen *rol* de *A. rhizogenes*, cuya presencia en los tejidos transformados fue confirmada mediante PCR; sin embargo, no lograron la regeneración de plantas. Hatanaka *et al.* (1999) transformaron callo embriogénico de *C. canephora* y Leroy *et al.* (2000) transformaron distintos explantes de *C. arabica* y *C. canephora* con *A. tumefaciens* portando los genes *gus*, *nptIII*, *cryIac* y *csrI*, logrando la regeneración de

plantas con evaluación positiva a nivel de expresión transitoria GUS y PCR y Southern Blot para los genes involucrados. Kumar *et al.* (2006) describen la transformación de *C. canephora* con *A. rhizogenes* portando los genes *gus* y *hpt*, logrando la regeneración del material transformado sin el fenotipo de raíz en cabellera y con evaluación positiva para la resistencia al agente de selección, la prueba histoquímica GUS y mediante PCR. Por su parte, Alpizar *et al.* (2008) transformaron *C. arabica* utilizando *A. rhizogenes* y observaron la integración de los oncogenes *rol* y *aux* del T-DNA del plásmido Ri en la evaluación de la transformación por PCR.

Selección del material transformado

Esta selección se produce generalmente a partir de un gen marcador de resistencia a un antibiótico o a un herbicida, el cual cumple un papel muy importante en el proceso de transformación genética, ya que le confiere a las células transformadas, con respecto a las no transformadas, la ventaja de crecer en presencia del agente de selección correspondiente. Como algunas especies pueden poseer resistencia natural a un agente de selección dado, es importante escoger el agente y la magnitud de la presión selectiva adecuados para la especie de interés, independientemente del sistema de transformación que se utilice.

Van Boxtel *et al.* (1997) evaluaron el efecto de 5 agentes de selección, incluyendo resistencia a herbicidas y a antibióticos (clorosulfurón, glifosato, glufosinato de amonio, higromicina y kanamicina) en explantes de diferentes genotipos de café. Encontraron que 100 mg L⁻¹ de kanamicina y 3 mg L⁻¹ de glufosinato inhibieron el crecimiento de suspensiones embriogénicas de *C. canephora*. Concentraciones mayores a 90 mg L⁻¹ de glifosato no inhibieron el crecimiento del callo o de las suspensiones. Con la kanamicina la inhibición fue variable, mientras que la higromicina y el clorosulfurón causaron una fuerte necrosis en callo. Concluyeron que la sensibilidad a los agentes selectivos era genotipo dependiente y que el glufosinato de amonio era el agente más efectivo en la inhibición de la formación y crecimiento de callo en secciones foliares de *C. arabica*, Arabusta (híbrido de *C. arabica* y *C. canephora* cv. Robusta) y *C. canephora*, con ausencia de necrosis tisular; Arabusta mostró la mayor resistencia a los distintos agentes probados, en tanto que *C. canephora* mostró la mayor sensibilidad.

Giménez *et al.* (1996) evaluaron el nivel de resistencia a kanamicina de distintos explantes de *C. arabica*. Encontraron que 25-30 mg L⁻¹ del antibiótico inhibían la germinación de los embriones y que las hojas se afectaban con concentraciones más bajas, mientras que las suspensiones celulares eran prácticamente insensibles (la inhibición se observó en concentraciones superiores a los 300 mg L⁻¹). Para el callo, la inhibición se observó al utilizar 100 mg L⁻¹ de kanamicina. Los autores concluyeron que el gen *nptII* puede ser utilizado como marcador de selección efectivo en hojas y embriones somáticos de *C. arabica*, realizando la selección en medio solidificado con agar. Por su parte, Hatanaka *et al.* (1999) y Ogita *et al.* (2004) emplearon exitosamente la higromicina como agente selectivo de embriones somáticos transformados. Leroy *et al.* (2000) seleccionaron tejido embriogénico transformado en base a la resistencia al herbicida clorosulfuron y Ribas *et al.* (2005) en base a la resistencia al glufosinato.

En cuanto a selección positiva, Samson *et al.* (2004) evaluaron la capacidad de crecimiento de distintos genotipos de café en medios con manosa o xilosa como fuente de carbono. Observaron el crecimiento y la formación de embriones somáticos en presencia de manosa, pero no en presencia de xilosa, lo cual señala al gen de la xilosa isomerasa *xyla* de *Streptomyces rubiginosus* como un posible marcador de selección positiva en el mejoramiento de café mediante transformación genética. Este gen ya ha sido utilizado con éxito en sistemas de transformación de papa, tabaco y tomate (Bailey y Kaepler, 2001).

Contenido de cafeína e ingeniería genética

La ingeniería genética también ha sido utilizada para modificar el contenido de cafeína, lo cual es importante considerando la sensibilidad de algunos consumidores a este alcaloide y que el café descafeinado ha superado el 10% del café comercializado en el mundo (Silvarolla *et al.* 2004; NCA 2009). Ogita *et al.* (2003) utilizaron la tecnología del ARN de interferencia ARNi para la obtención de plantas transgénicas con una tasa de síntesis de cafeína reducida. Las funciones fisiológicas del sistema ARNi son variadas; actúa como un mecanismo importante en la regulación de la expresión genética endógena, en el mantenimiento de la población de células madre embrionarias por medio de procesos desconocidos, como sistema de defensa contra virus, control de transposones o elementos

genéticos anómalos, a nivel terapéutico para silenciar ARNm virales y oncogénicos, como herramienta de estudio de la función celular y en la identificación de genes esenciales en procesos celulares (Ruíz y Muñoz, 2005). Ogita *et al.* (2003) mediante esta técnica inhibieron la expresión de un gen (*CaMXMT1*) que codifica a una de las enzimas N-metiltransferasas (theobromine synthasa) involucrada en la biosíntesis de la cafeína, utilizando 2 vectores ARNi idénticos con el fragmento espaciador del gen *gus* bajo el control del promotor CaMV35S y el terminador de la nopalina sintetasa NOS. En *C. canephora* el contenido final de cafeína se redujo por encima del 70% y en *C. arabica* entre un 65-85%.

Pruebas en campo de plantas transgénicas de café

El primer reporte de plantas transgénicas de café con una característica agrónomicamente importante (resistencia al minador de la hoja del café) probadas en invernadero y en campo ha sido realizado por Leroy *et al.* (2000). En invernadero realizaron bioensayos, exponiendo las plantas seleccionadas en base a la resistencia al agente de selección, la detección de la proteína *cryIac* en extractos foliares mediante Western Blot y la evaluación positiva a 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 4 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).

Actualmente no existen medidas regulatorias internacionales para café modificado genéticamente. Sin embargo, hay un amplio consenso en la industria cafetalera para evitar su comercialización e incentivar la investigación y búsqueda de conocimiento en relación con el genoma de café, incluyendo el análisis funcional de sus genes mediante el uso de metodologías transgénicas (Etienne *et al.* 2008).

CONCLUSIÓN

La Ingeniería Genética ha permitido ampliar el campo del mejoramiento vegetal a partir del manejo y la transferencia de genes de interés, aplicándose especialmente en plantas de importancia agronómica y comercial, como el café. Esta planta ha sido la base de estudios y pruebas que incluyen el cultivo *in vitro* y la transformación genética con métodos físicos y biológicos, logrando la expresión de genes foráneos (de origen vegetal y bacteriano) y la modificación de la expresión de genes endógenos (como los que regulan la maduración del grano y el contenido de cafeína). El fruto de estas investigaciones puede ser utilizado para incrementar la producción, el rendimiento y la calidad de esta planta de gran demanda internacional, e incluso para estimular y potenciar su cultivo en países con tradición cafetalera, como Venezuela. Sin embargo, es necesaria la creación de un marco legal y de regulación nacional e internacional para el café transgénico, de manera que ninguno de los eslabones de la industria cafetalera, desde el cultivo como tal, pasando por los pequeños, medianos y grandes productores, hasta llegar al consumidor, se vean perjudicados.

LITERATURA CITADA

- Alpizar E.; E. Dechamp, F. Lapeyren Montes, C. Guilhaumon, B. Baertrand, C. Jourdan. *et al.* 2008. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of Coffee (*C. arabica*): Conditions for long-term proliferation and morphological and molecular characterization. *Ann Bot* 101 (7): 929-940.}
- Bailey M y H. Kaeppler. 2001. Alternative markers for plant transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 37: 101-102.
- Barbón R.; E. Jiménez and W. Preil. 2008. Influence of *in vitro* environment on somatic embryogenesis of *C. arabica* L. cv. Caturra rojo: the effects of carbon dioxide on embryogenic cell suspensions. *Plant Cell Tiss Org Cult* 95 (2): 155-161.
- Barros E. V.; W. G. da Guntha and A. C. Miranda. 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. 137 p.
- Barton C.; T. Adams and M. Zarowitz. 1991. Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants. *In: Proceedings of the 14th ASIC colloquium*. San Francisco USA, p 460-464.
- Barry Etienne D.; B. Bertrand, N. Vasquez and H. Etienne. 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.
- Bastar M.; Z. Luthar, S. Skof and B. Bohanec. 2004. Quantitative determination of mosaic *GFP* gene expression in tobacco. *Plant Cell Rep* 22: 939-944.
- Baumann T. and B. Neuenschwander. 1990. Tissue culture in coffee biotechnology. *Café, Cacao, Thé* 24 (2): 159-164.
- CIRAD. 2001. Coffee genetic transformation. [ON LINE]: <http://www.cirad.fr/>
- Carneiro M F. 1999. Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechNet*, vol 1, ABN 006. [ON LINE]: <http://www.agbiotech.net/reviews/jan99/html/Carneiro.htm>
- Café Imperial, Venezuela. 2005. Conociendo más sobre el café [ON LINE]: http://www.cafeimperial.com/conociendo_esp.php
- Courvalin P. 1998. Plantas transgénicas y antibióticos. *La Recherche* (Mayo). p. 309-313.
- Cunha W.; F. Machado, G. Vianna, J. Texeira and E. Barros. 2004. Obtencao de *Coffea arabica* genéticamente modificadas por bombardeamento de calos embriogénicos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 73. EMBRAPA, Brasilia. 15 p.
- Chen L.; S. Zhang, R. Beachy and C. Fauquet. 1998. A protocol for consistent, large scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Rep* 18: 25-31.
- Dahleen L.; P. Okubara and A. Blechl. 2001. Transgenic approaches to combat Fusarium Head Blight in wheat and barley. *Crop Science* 41: 628-637.
- De Peña M. 1995. Development of a stable transformation procedures for the protoplasts of

- Coffea arabica* cv. Colombia. Tesis Doctoral. University of Purdue. pp 75.
- Díaz M.; D. Zappacosta, P. Franzone and R. Ríos. 2004. Transformación genética, parte III. In: Biotecnología y mejoramiento vegetal, Ediciones INTA, Argentina. p 109-123.
- Etienne H, D. Barry Etienne, N. Vásquez and M. Berthouly. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café. In: Bertrand B, Rapidel B (eds). Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Agroamerica, Costa Rica. p. 457-485.
- Etienne H. ; F. Anthony, S. Dussert, D. Fernandez, P. Lashermes and B. Bertrand. 2002. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.). In Vitro Cell Dev Biol Plant 38: 129-138.
- Etienne H.; P. Lashermes, A. Menéndez Yuffá, Z. De Guglielmo Cróquer, E. Alpizar and H. L. Screenath. 2008. Coffee. In: Kole C, Hall T C (eds). A Compendium of Transgenic Crops Plants. Volumen 8, Wiley-Blackwell, New Delhi-India. Blackwell Publishing, Oxford, UK. p 57-84.
- Fernández R. and A. Menéndez Yuffá. 2003. Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. E. J. Biotech 6: 29-38.
- Fernández R.; L. Hermoso and A. Menéndez Yuffá. 2005. Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. Interciencia 30 (11): 694-698.
- Gahakwa D.; S. Maqbool, X. Fu, D. Sudhakar, P. Christou and A. Kohli. 2000. Transgenic rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behaviour in diverse genetic backgrounds. Theor Appl Genet 101: 388-399.
- García E. de, and A. Menéndez Yuffá. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto "Catimor". Café Cacao Thé 31: 15-22.
- Gatica Arias A.; G. Arrieta and A. Espinoza. 2008a. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *C. arabica* L. cvs. Caturra and Catuai. E. J. Biotech 11 (1): 12.
- Gatica Arias A.; G. Arrieta and A. Espinoza. 2008b. 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.
- Gimenez C.; A. Menéndez Yuffá y E. de García. 1996. Efecto del antibiótico Kanamicina sobre diferentes explantes del híbrido de café (*Coffea* sp) Catimor. Phytom 59 (1/2): 39-46.
- Guerreiro O.; P. Denolf, M. Peferoen, B. Decazy, A. Eskes and R. Frutos. 1998. Susceptibility of the Coffee Leaf Miner (*Perileucoptera* spp) to *B. thuringiensis* α -endotoxins: A model for transgenic perennial crops resistant to endocarpic insects. Current Microbiology 36: 175-179.
- Hatanaka J.; O. Arakawa, T. Yasuda, N. Ushida and I. Yamaguchi. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. Plant Cell Rep 10: 179-182.
- Hatanaka T.; Y. E. Choi, T. Kusano and H. Sano. 1999. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation. Plant Cell Rep 19 (2): 106-110.
- Hermoso Gallardo L and A. Menéndez Yuffá. 2000. Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante el cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. Act. Cient. Ven. 51 (2): 90-95.
- Jefferson R. A.; T. A. Kavanagh and M. W. Bevan. 1987. GUS fusions: β -glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J. 6 (13): 3901-3907.
- Kanno T.; S. Naito and K. Shimamoto. 2000. Post-transcriptional Gene Silencing in Cultured Rice Cells. Plant Cell Physiol 41 (3): 321-326.
- Kasuga M.; Q. Liu, S. Miura, K. Y. Shinozaki and K. Shinozaki. 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.; K. Satyanarayana, S. Sarala, E. Indu, P. Giridhar, A. Chandrashekar and G. Ravishankar. 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.
- Leroy T.; A. Henry, M. Royer, I. Altosaar, R. Frutos and R. Phillippe. 2000. Genetically modified coffee plants expressing the *B. thuringiensis cryIAC* gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep* 19: 382-389.
- Libiakova G.; B. Jorgensen, G. Palmgren, P. Ulvskor and E. Johansen. 2001. Efficacy of an intron-containing kanamicin resistance gene as a selectable marker in plant transformation. *Plant Cell Rep* 20: 610-615.
- Menéndez Yuffá, A.; E. de García and N. Segura. 1994. Comparative study of protein electrophoretic patterns during embryogenesis in *Coffea arabica* cv Catimor. *Plant Cell Rep* 13: 197-202.
- Menéndez Yuffá, A., and E. de García. 1997. Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma* 199: 208-214.
- Menéndez Yuffá, A. y E. de García. 1998. La biotecnología aplicada al café. *Mem IBE* 1: 165-168.
- Menéndez Yuffá A. and L. Hermoso Gallardo. 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, 515 p.
- Mondragón, M.; R. Silva y G. Rodríguez. 2004. Estrategias para el manejo integrado del minador de la hoja y la broca del fruto del café. FONAIAP, Maturín, Estado Monagas, Venezuela. [ON LINE]: <http://www.ceniap.gov.ve/publica/divulga/fd60/broca.html>
- National Coffee Association-USA. [ON LINE]: <http://www.ncausa.org>
- Neuenschwander B. And T. Baumann. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 10: 608-612.
- Ocampo C. and L. Manzanera. 1991. Advances in genetic manipulation of the coffee plant. *In Proceedings of the 14th ASIC colloquium*. San Francisco USA, p. 460-464.
- Ogita S.; H. Uefuji, Y. Yamaguchi, N. Koizumi and H. Sano. 2003. RNA interference: Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* 423: 823.
- Ogita S.; H. Uefuji, M. Morimoto and H. Sano. 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*. *In: Simposio sobre ferrugens do cafeeiro*, Octubre 17-20, Oeiras, Portugal, p. 493-512.
- Peña M. and H. Serna. 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.; R. Galvao, A. Kobayashi, S. Cacao and L. Vieira. 2005. Ethylene production and ACC oxidase gene expression during fruit ripening of *C. arabica* L. *Braz. J. Plant Fisiol.* 17: 283-289.
- Perthuis B.; J. Pradon, C. Montagnon, M. Dufour T. Leroy. 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.
- Ribas A.; A. Kobayashi, L. Pereira and L. Vieira. 2005. Genetic transformation of *Coffea canephora* P. by particle bombardment. *Biol Plant* 49: 493-497.
- Rodríguez R. and M. Chamberlin. 1982. *Promoters*. Praeger Publishers, Nueva York, 524 p.
- Rosillo A.; J. Acuña, A. Gaitán and M. de Pena. 2003. Optimised DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 74: 45-49.
- Ruiz A. and R. Muñoz. 2005. RNAi: la revolución silenciosa. *Encuentros en Biología* 101: 6-8.

- Sánchez M. 2003. Biotecnología: ventajas y desventajas para la agricultura. *Revista Científica UDO Agrícola* 3 (1): 1-11.
- Samson N.; C. Campa, M. Noirot and A. Kochko. 2004. Potencial use of D-Xylosa for coffee plant transformation. *In: Proceedings of the 19th ASIC Colloquium*. Bangalore, India, p. 707-713.
- Sardana R.; S. Dukiandjiev, X. Cheng, K. Cowan and I. Altosaar. 1996. Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences *cryIA b* and *c* by expression in maize endosperm culture. *Plant Cell Rep* 15: 677-681.
- Silvarolla M.; P. Mazzafera and L. Fazuoli. 2004. *Plant Biochemistry: A naturally decaffeinated arabica coffee*. *Nature* 429: 826.
- Söndhal M. and W. Sharp. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica* L. *Z Pflanzenphysiol* 81: 395-408.
- Söndhal M. and L. Mónaco. 1981. *In vitro* methods applied to coffee. *In: Thorpe, T A (ed). Plant tissue culture methods and applications in agriculture*, Academic Press, USA, p. 325-347.
- Spiral J.; C. Thierry, M. Paillard et V. Petiard. 1993. Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. *Comp Rend Acad Sci Paris* 316: 1-6.
- Sugiyama M.; C. Matsuoka and T. Takagi. 1995. Transformation of *Coffea* with *Agrobacterium rhizogenes*. Pp 853-859. *In: Proceedings of the 16th ASIC Colloquium*, Kyoto, Japón.
- Tian L. and A. Seguin. 2004. Microprojectile particle effect on stable transformation of black spruce via bombardment. *Plant Mol. Biol. Rep.* 22: 199a-199f.
- Van Boxtel, J. 1994. Studies on genetic transformation of coffee by using electroporation and biolistic method. [ON LINE]: <http://library.wur.nl/WebQuery/wda/lang?dissertatie/nummer=1880>.
- Van Boxtel J.; M. Berthouly, C. Carasco and A. Eskes. 1995. Transient Expresión of β -Glucuronidase Following Biolistic Delivery of Foreign DNA into Coffee Tissues. *Plant Cell Rep.* 14: 748-752.
- Van Boxtel J. And M. Berthouly. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves: Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44: 7-17.
- Van Boxtel J.; A. Eskes and M. Berthouly. 1997. Glufosinate as an efficient inhibitor of callus proliferation in coffee tissue. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 33: 6-12.
- Zamarripa A.; J. P. Ducos, H. Bollon, M. Dufour et V. Petiard. 1991. Production D' embryons somatiques de cafféier en milieu liquide: effets densité d' inoculation et renouvellement du milieu. *Café Cacao Thé*, 25: 233-244.