

**DESAFÍOS Y PERSPECTIVAS DE LA MEJORA GENÉTICA DEL CAFÉ (*Coffe* sp.) EN EL SUR DE MANABÍ**

AUTORES: Julio Gabriel Ortega<sup>1</sup>  
Blanca Indacochea Ganchozo<sup>2</sup>  
Carlos Castro Piguave<sup>3</sup>  
Alfredo Valverde Lucio<sup>4</sup>  
Fernando Ayón Villao<sup>5</sup>



DIRECCIÓN PARA CORRESPONDENCIA: ([julio.gabriel@unesum.edu.ec](mailto:julio.gabriel@unesum.edu.ec))

Fecha de recepción: 30/07/2021

Fecha de aceptación: 31/08/2021

**RESUMEN**

El objetivo de este trabajo de revisión fue dar a conocer el estado de arte de las metodologías y avances en la mejora genética de café a través del tiempo. El café (*Coffe* sp.) es uno un cultivo de alto valor por su consumo como bebida. Existen unas 130 especies de café, y las más cultivadas son: *Coffe arabica*, *C. canephora* y *C. liberica*. Los diferentes niveles de ploidía en el género *Coffea* obstaculizan la introducción de características agronómicas y de calidad de las especies diploides hacia las especies tetraploides. Por lo que el mejoramiento genético de café con base en las metodologías convencionales, es un proceso largo y tedioso, que puede durar hasta más de 30 años. Sin embargo, en las últimas décadas se desarrollaron técnicas biotecnológicas que bien pueden contribuir a introducir las características deseadas y a acelerar los procesos de mejora genética, estos métodos son descritos en el presente artículo, para finalmente hacer una discusión sobre los desafíos y perspectivas de la mejora genética del café en el Sur de Manabí.

**PALABRAS CLAVE:** Métodos, características, protoplastos, marcadores moleculares, híbridos, resistencia.

---

<sup>1</sup> Profesor investigador, Carrera Agropecuaria, Centro de Biotecnología, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Km 1½ vía Jipijapa-Noboa - Campus los Ángeles. <https://orcid.org/0000-0001-9776-9235>

<sup>2</sup> Profesora investigadora, Carrera Agropecuaria, Centro de Biotecnología, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Km 1½ vía Jipijapa-Noboa - Campus los Ángeles.

<sup>3</sup> Profesor investigador, Carrera Agropecuaria, Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Km 1½ vía Jipijapa-Noboa - Campus los Ángeles. <https://orcid.org/0000-0003-3180-2359>

<sup>4</sup> Profesor investigador, Carrera Agropecuaria, Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Km 1½ vía Jipijapa-Noboa - Campus los Ángeles. <https://orcid.org/0000-0002-9792-9400>

<sup>5</sup> Profesor investigador, Carrera Agropecuaria, Facultad de Ciencias Naturales y de la Agricultura, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Km 1½ vía Jipijapa-Noboa - Campus los Ángeles. <https://orcid.org/0000-0003-4772-9344>

## CHALLENGES AND PERSPECTIVES OF THE GENETIC IMPROVEMENT OF COFFEE (*Coffe sp.*) IN SOUTHERN MANABÍ

### ABSTRACT

The objective of this review work was to present the state of the art of methodologies and advances in coffee genetic improvement over time. Coffee (*Coffe sp.*) Is a highly valued crop for its consumption as a beverage. There are about 130 species of coffee, and the most cultivated are: *Coffe arabica*, *C. canephora* and *C. liberica*. The different levels of ploidy in the genus *Coffea* hinder the introduction of agronomic and quality characteristics from diploid species to tetraploid species. Therefore, the genetic improvement of coffee based on conventional methodologies is a long and tedious process, which can last up to more than 30 years. However, in recent decades biotechnological techniques have been developed that may well contribute to introducing the desired characteristics and accelerating genetic improvement processes. These methods are described in this article, to finally discuss the challenges and prospects for improvement. coffee genetics in the South of Manabí.

KEYWORDS: Methods, characteristics, protoplasts, molecular markers, hybrids, resistance.

### INTRODUCCIÓN

El café (*Coffeasp.*) es un cultivo importante a nivel mundial por su alto valor como bebida de consumo (Alemayehu, 2017). Entre los productos agrícolas, ocupa el segundo lugar en el comercio internacional luego del petróleo (Labouisse *et al.*, 2008). Se cultiva en las zonas tropicales y subtropicales del mundo, beneficiando directa y/o indirectamente a los ingresos de más de 125 millones de personas (Tran *et al.*, 2016). El género *Coffea*, comprende más de 130 especies, de las cuales las más cultivadas son *Coffearabica*, *C. canephora* y *C. liberica* (Fernández *et al.*, 2010). *C.arabica* es la especie más importante y la preferida en el mercado, teniendo una participación promedio entre las cosechas de 2014 a 2016 de 58,1 % en la producción mundial (ICAFFE, 2016; Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019). Genéticamente todas las especies de café, a excepción de *C. arabica*, *C. heterocalyx* y *C. anthonyi*, son auto incompatibles (Davis *et al.*, 2006), y *C. arabica*. es tetraploidealotetraploideautofértil ( $2n=4x=44$ ) (Mishra y Slater, 2012). Es un híbrido espontáneo entre *C. eugenoides* (hembra) y *C.canephora* (macho)(Lashermes *et al.*, 1999), con un tamaño de genoma de 1300 Mpb (Lashermes *et al.*, 2008). Los diferentes niveles de ploidía en el género *Coffea* obstaculizan la introducción de características agronómicas y de calidad de las especies diploides hacia las tetraploides. Por lo que el mejoramiento genético de café con base en las metodologías convencionales, es un proceso largo y tedioso, que puede durar hasta más de 30 años (Melese, 2016). Sin embargo, en las últimas décadas se han desarrollado técnicas biotecnológicas que bien pueden contribuir a introducir las características deseadas y a acelerar los procesos de mejora genética (Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019).

El objetivo de este trabajo de revisión fue dar a conocer el estado de arte de las metodologías y avances en la mejora genética de café a través del tiempo, y finaliza dando algunos elementos sobre los desafíos y las perspectivas de la mejora genética para la zona Sur de Manabí en Ecuador.

### Importancia del café en el Sur de Manabí

Ponce Vaca *et al.* (2018) mencionan que, para los ecuatorianos, el café tiene importancia económica, social, ambiental, institucional y en la salud humana. Económicamente, es una fuente de divisas e ingresos para los actores de las cadenas de valor del café. En lo social, se involucran productores de 23 provincias de Ecuador. En lo ambiental, se cultiva en sistemas agroforestales, en una amplia diversidad de suelos y climas. En lo institucional el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) impulsa el proyecto de reactivación de la caficultura para beneficiar a las estructuras organizativas de los productores; y en la salud humana, su consumo contribuye en la disminución del riesgo por diabetes tipo 2, daño hepático y enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson (Gotteland y Saturnino, 2007).

En Ecuador se cultivan las especies de *C.arabica* y *C. canephora* (Ponce Vaca *et al.*,2018). Se generaron tecnologías de producción que permitieron elevar la productividad a 3  $th^{-1}$  en *C. arabica* y 5  $tha^{-1}$  en *C. canephora* en ciertos sitios innovadores. Sin embargo, la producción nacional es muy baja está en alrededor de 0,27  $tha^{-1}$  (Ponce Vaca *et al.*,2018). En el año 2014, se cultivó una superficie 140000 ha, de los cuales 100000 ha fueron de *C. arabica*, con una productividad de 0,23  $tha^{-1}$  y 105 000 ha de *C. canephora* (robusta) con una productividad de 0,25  $tha^{-1}$ . Esta baja producción nacional es debida a diversas causas entre las que se destacan la prevalencia de cafetales viejos, la no disponibilidad de cultivares de alto rendimiento y tecnología de manejo(Ponce Vaca *et al.*,2018).

### Mejoramiento genético convencional

Para el café *C.arabica*, se utilizaron metodologías de mejora genética como la hibridación, selección genealógica y selección por cruza y retro cruza interespecíficas, con el fin de transferir resistencia a patógenos y plagas, mejorar la adaptación y el rendimiento del cultivo (Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019). También, se utilizó la introducción y selección cultivares, cruza artificiales con parentales seleccionados y de mutágenos obtenidos por radiación en las semillas (Solano, 2001). El híbrido Timor (*C. arabica* x *C. canephora*), fue utilizado por su resistencia a la roya (*Hemileiavastatrix*), derivada de cuatro genes mayores de resistencia de *C. canephora*(Villalta-Villalobos y Gatica-Arias, 2019). De esta manera, la cruza entre Timor y el mutante natural Caturra Rojo dio origen al cultivar Catimor (resistente a roya). El vigor de Catimor, se obtuvo por retrocruza de Catimor x Catuaí. En Brasil se obtuvo el cultivar Icatu resistente a la roya, antracnosis de los frutos y nematodos, del cruzamiento de dos cultivares tetraploides de *C.arabica* y *C. canephora* (Berthouly, 1997). En Kenia, se liberó el híbrido Ruiru 11, resistente a roya, antracnosis del fruto, de alta producción y calidad (Agwanda, 1999). Desde 1991 en Centroamérica se desarrolla un programa de mejoramiento genético de café, con participación de PROMECAFE, los institutos de café de los países centroamericanos, instituciones nacionales de investigación en café, la cooperación francesa (CIRAD, ORSTOM, MAE) y el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). La finalidad es lograr cruzar de las especies silvestres de Etiopía y Sudán (*C. canephora*), como fuentes de resistencia a roya, nematodos, buen vigor y alta productividad(Albarrán, 1999).

## DESARROLLO

### Aplicación biotecnológica

#### *Cultivos de tejidos en café*

A diferencia de las técnicas de propagación tradicional, el cultivo de tejidos permite 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 (Fernández *et al.*, 2010).

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

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 fue establecida 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. arabica*, a partir de secciones de hoja, fue presentado por Söndahl y Sharp (1981), encontrándose que, a diferencia de otros explantes, las secciones foliares tenían una mayor frecuencia embriogénica (Söndahl & Monaco, 1981). Las hojas más cercanas al ápice de la rama (último par) son las que poseen el mayor potencial embriogénico, según lo señalado por Noceda *et al.* (1998).

Las plantas de café pueden ser micropropagados por SE y microcortes (Dublín 1980). Ambas metodologías tienen ventajas y desventajas (Dublín, 1984). El primer intento exitoso de micropropagación de *C. arabica* por proliferación de yemas axilares fue realizado por Custers (1980) utilizando medio MS suplementado con 6,64  $\mu\text{M}$  BA en el primer paso y 13,29  $\mu\text{M}$  BA y 1,445  $\mu\text{M}$  de ácido giberélico en el segundo paso. Como en muchas otras especies, el uso de altas concentraciones de BA rompe la latencia de las yemas axilares y aumenta el porcentaje de explantes productores de brotes (de García y Rafael 1989).

El avance más reciente de la propagación clonal de café es a través del uso de sistemas de inmersión temporal (SIT), misma que fue desarrollada por el grupo de investigación del CIRAD, Montpellier, Francia (Etienne y Berthouly 2002). Con este sistema, utilizando sales basales de MS, vitaminas del medio de Morel (Morel y Wetmore 1951) y 4,43  $\mu\text{M}$  BA, la multiplicación de *C. arabica* se logró en ocho semanas. Recientemente, Albarrán *et al.* (2005) mostró que aumentar la frecuencia de inmersiones cortas durante la producción de embriones somáticos elimina la hiperhidricidad que se encuentra a menudo con este sistema con un aumento concomitante, alcanzando hasta el 75% en la conversión del embrión somático en plántulas (Santana-Buzzy *et al.*, 2007).

### **Marcadores moleculares**

Entre los principales marcadores moleculares utilizados en cultivares de importancia comercial están las al enzimas, RFLP (RestrictionFragmentLengthPolymorphic), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), SNP (Single Nucleotide Polymorphism) y microsatélites SSR (Simple SequenceRepeats) (Azofeifa, 2006). Los marcadores moleculares en café fueron usados para evaluar la diversidad genética de las especies y construir mapas genéticos (De-Kochket *al.*, 2010), evaluación de introgresión, determinar la herencia de la resistencia a enfermedades y plagas, evaluar la calidad de bebida y analizar genes poligénicos cuantitativos (QTL)(Melese, 2016). La selección asistida por marcadores moleculares (MAS) fue aplicado porGichuruet *al.* (2008) para identificar ocho AFLP y dos marcadores de microsatélites, en *C. canephora*, para encontrar genes de resistencia a *Colletotrichumkahawae*.

#### *Fusión de protoplastos*

La hibridación somática o fusión de protoplastos es una técnica biotecnológica para el mejoramiento genético de cultivos vegetales (Levituset *al.*, 2010). Su uso se basa en el aislamiento y unión de dos células somáticas que carecen de pared celular (protoplastos), para formar una única célula híbrida que tiene el potencial de regenerar y desarrollar una planta completa usando técnicas de cultivo in vitro(Levituset *al.*, 2010).Para desproveer a la célula de su pared celular y obtener los protoplastos (citoplasma y núcleo rodeados por una membrana plasmática), se utilizan tres vías: i) digestión enzimática con pectinasas, celulasas, hemicelulosas individualmente o en combinación, ii) disrupción mecánica con las fuerzas de corte (sonicadores, homogenizadores de alta presión y molinos de perlas) que deforman las células hasta el rompimiento de sus cubiertas, y iii) combinación de las vías anteriores (Levituset *al.*, 2010). Con el empleo de químicos como polietilenglicol (PEG) o procedimientos que involucran una fuente eléctrica, los protoplastos de diversas plantas donadoras pueden fusionarse y generar híbridos somáticos, que luego pueden regenerar en plantas y generar nuevos genotipos como resultado de la combinación de especies incompatibles sexualmente (Levituset *al.*, 2010). En la fusión se da la coexistencia de dos núcleos y de los citoplasmas de ambos protoplastos, lo cual genera una etapa de heterocariosis. Si se da la fusión de núcleos durante la mitosis, la producción de las células híbridas se completa (Montero y Jiménez, 2009). En café existen algunos casos en los que esta técnica fue implementada con propósitos de estandarización y posteriores usos en mejoramiento genético(Sondahlet *al.*, 1980; Orozco y Schieder, 1982; Schopkeet *al.*; 1987; Spiral y Petiard, 1991; Acuña y DePeña,1991; Grézeset *al.*, 1994; Barros *et al.*, 2000).

### **Ingeniería genética**

La ingeniería genética de plantas ha revolucionado las técnicas de mejoramiento genético convencionales, ya que a pesar de tener los mismos objetivos (identificación, selección, incorporación y herencia de rasgos a la siguiente generación), posee las grandes ventajas de aumentar el rango de caracteres de interés a transferir a las especies que pueden ser de origen vegetal, animal o microbiano, y de modificar puntualmente a los organismos al integrar uno o pocos genes, y no el genoma completo (De-Gluglielmo, 2009, Levituset *al.*, 2010).

En café, la ingeniería genética se enfocó en dos objetivos: i) elucidar la función, regulación e interacción de genes agronómicos importantes e ii) introducir nuevos caracteres en genotipos élite, desarrollar nuevos cultivares con resistencia a plagas, enfermedades, herbicidas, sequía y heladas; y mejoramiento de la calidad de tasa (Fernández *et al.*, 2010). Se usaron métodos biológicos como el uso de bacterias del género *Agrobacterium* físicos comola electroporación y biobalística (Gatica *et al.*, 2009).

La electroporación, se basa en la permeabilización de las membranas celulares al aumentar la conductividad eléctrica(Levituset *al.*, 2010).Esto ocasiona que las membranas se desestabilicen y generen poros momentáneos y reversibles, por los cuales ocurre la absorción por parte de las células del ácido desoxirribonucleico (ADN) foráneo que contiene el o los genes de interés (Díaz y Chaparro, 2012). Además de la inserción de ácidos nucleicos, se pueden ingresar drogas, colorantes o proteínas a las células (Mishra y Slater, 2012). En café la electroporación se utilizó inicialmente por Barton *et al.* (1991), quienes electroporaron protoplastos de *C. arabica* con los genes nptII y gus, bajo el control del promotor pGA472, y lograron regenerar los embriones somáticos y las plantas resistentes a kanamicina; sin embargo, por su débil desarrollo radical las plantas no sobrevivieron. Posteriormente, Van-Boxtel (1994) logró la inserción del gen gus en protoplastos aislados de suspensiones celulares no embriogénicas, pero solo obtuvo una expresión transitoria del transgen.

Embriones somáticos en etapa torpedo se pretrataron por una hora con una solución enzimática bajo el control del promotor duplicado CAMV35S, mediante electroporación a 375 V y 900  $\mu$ F (Fernández y Menéndez, 2003). El estudio mostró una regeneración máxima a través de embriogénesis somática secundaria, y se observaron los puntos de color azulado de un resultado positivo de expresión transitoria con la prueba histoquímica del gen gus; además, se obtuvieron las amplificaciones respectivas para ambos transgenes mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa(Fernández y Menéndez, 2003). En el 2011, suspensiones celulares de *C. arabicacv.* Caturra roja se electroporaron con el plásmido pDBGUS-INT (gus y bar) bajo el control del promotor CAMV35S, con el objetivo de determinar el efecto de la capacitancia y fuerza de campo sobre la vitalidad de las células, 24, 48 y 72 h posteriores a su aplicación, y para determinar la influencia del buffer de electroporación utilizado sobre la expresión transitoria del transgen gus (Barbón *et al.*, 2011).

La biobalística es uno de los métodos directos de transformación más ampliamente utilizado en plantas, y se basa en el uso de partículas de metales pesados biológicamente inertes como el oro o el tungsteno para transportar las moléculas de ácidos nucleicos (Levituset *al.*, 2010). Se da un paso conocido como bombardeo o disparo, en el que estas partículas son aceleradas a gran presión con gases como helio o nitrógeno bajo condiciones establecidas (presión y distancia del disparo, cantidad de ácido nucleico) hacia el tejido blanco, lo cual permite la penetración de los ácidos nucleicos al genoma vegetal (López *et al.*, 2013). En café, el primer estudio con la técnica biobalística se remonta a 1995, con diferentes tipos de explantes como hojas, embriones somáticos y suspensiones celulares de *C. arabica* y *C. canephora*, y se determinó la expresión transitoria del gen gus controlada por dos promotores: EF1 $\alpha$ -A1 de *Arabidopsisthaliana* y CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor (*Brassicaoleraceavar. botrytis* L.). Se obtuvo una expresión observable en hojas y el promotor EF1 $\alpha$ -A1, además, se concluyó que suspensiones celulares y embriones somáticos son poco apropiados para estudios de expresión transitoria gus, por presentar actividad endógena (Van Boxtel *et al.*, 1995). Otras experiencias sobre el uso de

plásmidos vectores en café fueron reportadas por diversos autores (McCown y Lloyd, 1981; Barros *et al.*, 2000; Cunha y Barros, 2002; McCown y Lloyd, 1981, Rosillo *et al.*, 2003, Ribas *et al.*, 2005).

En Costa Rica se determinaron las condiciones óptimas de presión de helio (900 y 1550 psi) y distancia del disparo (9 y 12 cm), para realizar transformación mediante biobalística. Con el empleo de callos embriogénicos de *C. arabicacv.* Catuaí, a una presión de 900 psi y una distancia de 9 cm(Gatica *et al.*, 2008).

En 2009, callos embriogénicos derivados de segmentos de hoja de *C. arabica* se bombardearon con el vector pBI426 (nptII y gus) dirigido por el promotor doble CaMV35S. Posteriormente, en medio de selección con kanamicina se obtuvieron embriones somáticos que resultaron positivos para la prueba histoquímica gus, y amplificaron un fragmento específico del gen nptII por PCR. Finalmente, los embriones somáticos se desarrollaron a plantas, en las que las flores y frutos fueron positivas para la prueba gus, demostrando una transformación estable (Albuquerque *et al.*, 2009).

Se bombardearon embriones somáticos de *C. arabicacv.* Catimor en estado torpedo con el gen reportero gus, con el fin de determinar las condiciones óptimas de presión, distancia de disparo, supervivencia, así como el efecto de una pre-incubación de los embriones en medio líquido de regeneración suplementado con 8 mg.l-1 de ácido naftalenacético (ANA) antes de su regeneración en medio sólido (De-Guglielmo *et al.*, 2010b).

Se logró inhibir enzimas de insectos, como la  $\alpha$ -amilasa de la broca del café (*Hypothenemushampei* Ferrari), al transformar por biobalística callos embriogénicos de *C. arabica* con el plásmido pBIN19 $\alpha$ AI-1 que contenía el gen inhibidor de amilasa  $\alpha$ AI-1 proveniente de *Phaseolusvulgaris* L. controlado por un promotor específico de semilla (PHA-L)(Barbosa *et al.*, 2010).

### Transgénicos

En protocolos de transformación genética por medios biológicos se utilizaron las bacterias *Agrobacteriumtumefaciens* y *Agrobacteriumrhizogenes*. Estas son bacterias Gram negativas, encapsuladas y con forma de bastón (bacilo), con una temperatura óptima de crecimiento de 25-28 °C, las cuales son fitopatógenos del suelo (Nester, 2015). *A. tumefaciens* fue estudiada ampliamente, ya que logra transferir naturalmente secciones específicas de su ADN a células huésped (Morillo, 2011), causando el tumor del cuello o agalla que crece en la unión de la raíz y el tallo (cuello), la cual es una enfermedad agronómica importante que afecta en su mayoría a plantas dicotiledóneas. La región de ADN transferida (ADN-T) se encuentra alojada en la bacteria dentro del plásmido inductor de tumores Ti (en *A. tumefaciens*) y dentro del plásmido Ri (en *A. rhizogenes*), los cuales codifican genes relacionados con la síntesis de reguladores de crecimiento (auxinas y citocininas), y producción de opinas (octopinas, nopalinas, lisopinas), las cuales son fuentes de carbono y nitrógeno para la bacteria (Llop, 2003). Con el conocimiento básico sobre cómo se da la transferencia del ADN-T a las plantas, se han desarrollado vectores con el fin de introducir genes foráneos en plantas cultivadas(Valderrama *et al.*, 2005).

La especie bacteriana *Agrobacteriumrhizogenes* se utilizó en café, mayoritariamente para el análisis funcional de genes relacionados con resistencia al nematodo de la raíz

(*Meloidogynecoffeicola*) (Alpizaret *et al.*, 2007). Fue utilizada inicialmente en este cultivo en el año 1993 (Spiralet *et al.*, 1993) y luego en 1997 (Leroy *et al.*, 1997), en estos trabajos se transformaron embriones somáticos de *C. canephora* con la cepa A4 (genes *gus* y *nptII*), obteniéndose plantas transgénicas.

Los protocolos de transformación disponibles en café utilizan mayoritariamente *Agrobacteriumtumefaciens*, por ser un método barato que transfiere segmentos largos de ADN y con un número bajo de copias del gen integradas (Ribas *et al.*, 2006c). Las investigaciones con esta bacteria en café iniciaron en los años noventa, cuando Ocampo y Manzanera (1991) infectaron hipocótilos de *C. arabica* con *A. tumefaciens* (cepa no especificada) sin lograr la regeneración de plantas. Además, en 1999, Hatanaka *et al.* (1999) reportaron la transformación de callos embriogénicos de *C. canephora* P. con los genes *gus*, *hpt* y *nptII*.

Uno de los trabajos iniciales más importantes en transformación de este cultivo con genes de interés agronómicos fue logrado por Leroy *et al.* (2000), al obtener plantas transgénicas resistentes al minador de la hoja, mediante la transformación de embriones somáticos de *C. arabica* y *C. canephora* con *A. tumefaciens* LBA4404 portadora del gen *cryIac* de *Bacillusthuringiensis*. Además, se publicó una metodología de transformación de callos embriogénicos y embriones somáticos de dos genotipos de *C. arabica* (Dufour *et al.*, 2000). En 2002, Mishra *et al.* (2002), transformaron segmentos de hoja, hipocótilos, embriones cigóticos y somáticos de *C. canephora* con un plásmido que contenía el gen *gus*, y se analizó por medio de la prueba histoquímica *gus* la localización de la expresión transitoria en los explantes.

Mediante el uso de *A. tumefaciens*, también se estudió la ruta metabólica de síntesis de cafeína. Se introdujeron ARN de interferencia en plantas de *C. arabica* L. y *C. canephora* P., por medio de *A. tumefaciens* para suprimir la expresión de los genes *CaMXMT1*, *CaXMT1* y *CaDXMT1* (Ogita *et al.*, 2004).

En la Guyana Francesa se llevaron a cabo pruebas controladas de campo con plantas de *C. canephora* transformadas con el gen *cryIAc* de *Bacillusthuringiensis* (Bt), gen de resistencia al minador de la hoja (*Leucoptera coffeella*), dirigido por el promotor constitutivo *pEF1 $\alpha$* . Se sembraron veinte plantas transformadas y sesenta plantas control no transformadas, durante un período de cuatro años desde su siembra se realizaron seis liberaciones de *L. coffeella*, durante las cuales se contó el número de minas o áreas necróticas características del ataque del minador. Las plantas transformadas presentaron menos del 10 % del número promedio de minas de las plantas control, con lo que se concluyó que se estaba dando una expresión estable del transgen (Perthuiset *et al.*, 2005), (Villacreses Pin, 2017; Indacochea Chilán, 2018; Lucas Suárez, 2018; Parrales Parrales, 2021).

En 2006 se obtuvieron plantas transgénicas de *C. canephora* resistentes al herbicida glufosinato de amonio (Ribas *et al.*, 2006b).

## CONCLUSIONES

Para la zona Sur de Manabí a la vez que es un desafío el lograr nuevos cultivares mejorados de mejor calidad y rendimiento, tiene una importante perspectiva, debido a que existen muchos escenarios cafetaleros con cultivos de café de más de 50 años que aún son productivos, mismos que han sufrido a través del tiempo proceso de selección y coevolución, por lo que se constituyen en germoplasma altamente valioso. Además la Universidad Estatal del Sur de Manabí conserva

cultivares mejorados de alto valor genético, que fueron evaluados en los últimos años para diversos factores los que se constituyen en un valioso recursos genético para emprender un programa de mejora genética; a esto se suma la reciente implementación de un moderno Centro de estudios de Biotecnología, que está en proceso de implementación y fortalecimiento. En este laboratorio se podrían innovar muchas de las tecnologías reportadas como exitosas en la en la micropropagación de plantas de café como el cultivo de tejidos y el uso del un sistema de inmersión temporal para acelerar procesos para obtener plantas de alta calidad genético-sanitarias.

Consideramos que todos estos aspectos aunados con la oportunidad de no haber un programa similar a nivel del Sur de Manabí es una oportunidad para desarrollar cultivares más acordes a las necesidades de los productores y recuperar ese valioso espacio de ser una zona productora de café de calidad, que contribuya a que la zona Sur de Manabí logre el sitio que le corresponde; y además dar mejores oportunidades de negocio a los productores cafetaleros de la zona. Está claro que la genética no solucionará completamente la problemática del café en Ecuador, pero contribuye a la mejora de la misma.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, J.R.; De-Peña, M. (1991). Plantre generation from protoplastsofembryogeniccell suspensionsof *Coffea arabica* L. cv. Caturra. *Plant Cell Rep.* 10:345-348. doi:10.1007/BF00193156
- Agwanda, C.O. (1999). Twentysevenyearsofcoffeebreeding in Kenya: prospectsforthereleaseof new varieties. 18th International ScientificColloquiumonCoffee. ASIC, FIN. <https://www.asic-cafe.org/conference/18th-international-scientific-colloquium-coffee/twenty-seven-years-coffee-breeding-kenya>.
- Albarrán, J.; Bertrand, B.; Lartaud, M.; Etienne, H. (2005). Cyclecharacteristics in a temporaryimmersionbioreactoraffectregeneration, morphology, water and mineral status ofcoffee (*Coffea arabica*) somaticembryos. *Plant Cell TissueOrganCult.* 81:27-36.
- Albarrán, J.G. (1999). Influencia de los factores químicos y físicos sobre la regeneración de embriones somáticos de *Coffea arabica* en biorreactor simplificado. Tesis MSc., CATIE, Turrialba, CRI.
- Albuquerque, E.V.; Cunha, W; A. Barbosa, P. Costa, J. Teixeira, G. Vianna, G. Cabral, D. Fernandez., Grossi, M. (2009). Transgeniccoffee fruitsfrom *Coffea arabica* genetically modifiedby bombardment. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 45:532-539 doi:10.1007/s11627-009-9254-2
- Alemayehu, D. (2017). Reviewongeneticdiversityofcoffee (*Coffea arabica* L) in Ethiopia. *Int. J. Forest. Hort.* 3(2):18-27. doi:10.20431/2454-9487.0302003
- Alpizar, E., Dechamp, E.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Etienne, H. (2007). Transgenicrootsforfunctionalgenomicsofcoffee resistance genes toroot-knotnematodes. In: AssociationforScience and InformationonCoffee, editor, Proceedingsofthe 21st International ConferenceonCoffeeScience. AssociationforScience and InformationonCoffee, Montpellier, FRA. p. 653-659.
- Alpizar, E., Dechamp, E.; Espeout, S.; Royer, M.; Lecouls, A.; Nicole, M.; Bertrand, B.; Lashermes, P.; Etienne, H. (2006). Efficientproductionof *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plantsforstudying gene expression in coffeeroots. *Plant Cell Rep.* 25:959-967 doi:10.1007/s00299-006-0159-9
- Azofeifa, A. (2006). Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agron. Mesoam.* 17:221-242. doi:10.15517/am.v17i2.5163

- Barbón, R., Jiménez, E.; Capote, A.; Gil, V.; Ocaña, B. (2011). Transformación genética de Coffea arabica cv. Caturra rojo mediante la electroporación de suspensiones celulares embriogénicas. *Biotecnol. Veg.* 11(1):33-42.
- Barbosa, A.E., Albuquerque, E.; Silva, M.; Souza, D.; Oliveira, O.; Valencia, A.; Rocha, T.; Grossi, M. (2010).  $\alpha$ -Amylase inhibitor-1 gene from *Phaseolus vulgaris* expressed in Coffea arabica plants inhibits  $\alpha$ -amylases from the coffee berry borer pest. *BMC Biotech.* 10:44. doi:10.1186/1472-6750-10-44
- Barros, E.V., Araujo, G.B.; Brasileiro, A. (2000). Transformação genética de Coffea arabica através de bombardeamento. *SBI Café, BRA.* <http://www.sbicafe.ufv.br/handle/123456789/652>
- Barton, C.; Adams, T.; Zarowitz, M. (1991). Stable transformation of foreign DNA into Coffea arabica plants. In: Association for Science and Information on Coffee, editor, Proceedings of the 14th International Conference on Coffee Science. ASIC, San Francisco, CA, USA. p. 460-464.
- Baumann, T y Neuenschwander, B (1990). Tissue culture in coffee biotechnology. *Café Cacao Thé*, 24(2): 159-164
- Berthouly, M. (1997). Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en Coffea arabica. En: E.L. Ibarra, editor, Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura. IICA-PROMECAFE, San José, CRI. p. 25-49.
- Cunha, W.G.; Barros, E. (2002). Transformação genética de calos embriogênicos de Coffea arabica via biobalística e seleção em canamicina. Embrapa, BRA. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/28564/1/tales2002.pdf>
- Cunha, W.G.; Machado, F.; Vianna, G.; Teixeira, J.; Albuquerque, V. (2004). Obtenção de Coffea arabica genéticamente modificadas por bombardeamento de calos embriogênicos. *Boletim de Pesquisa e desenvolvimento.* Embrapa, BRA. <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CENARGEN/28286/1/bp073.pdf>
- Custers, J. B. M. (1989). Clonal propagation of Coffea arabica L. by nodal culture. Paris; In: 9<sup>e</sup> Colloque Scientifique Internationale sur le Café, Association Scientifique Internationale du Café: 588-596.
- Davis, A.; Govaerts, R.; Bridson, D.; Stoffelen, P. (2006). An annotated taxonomic conspectus of the genus Coffea (Rubiaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 152:465-512. doi:10.1111/j.1095-8339.2006.00584.x
- de Garcia, E.; Rafael, M. (1989). Propagación clonal de plantas de café (Coffea arabica L. "Catimor") a partir de microesquejes cultivados in vitro. *Agron. Trop.* 39:249-268.
- De-Guglielmo, Z.; Fernández, R.; Heroso, L.; Altosaar, I.; Menéndez, A. (2010b). Optimización de los parámetros de transformación genética de café mediante biobalística con el gen reportero gus. *Acta Biol. Venez.* 30(1-2):23-34.
- De-Kochko, A., Akaffou, S.; Andrade, A.C.; Campa, C. Crouzillat, D.; Guyot, R.; Hamon, P.; Ming, R.; Mueller, L.A.; Poncet, V.; Tranchant, C.; Hamon, S. (2010). Advances in Coffea genomics. *Adv. Bot. Res.* 53:23-63. doi:10.1016/s00065-2296(10)53002-7
- Díaz, C.; Chaparro, A. (2012). Métodos de transformación genética de plantas. *Rev. U.D.C.A Actual. Divulg. Cient.* 15(1):49- 61.
- Dublin, P (1981). Embryogenèse 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
- Dublin, P. (1980). Induction de bourgeons néoformés et embryogenèse somatique. Deux voies de multiplication végétative in vitro des caféiers cultivés. *Café Cacao Thé*. XXIV:121-130.
- Dublin, P. (1984). Techniques de reproduction végétative in vitro et amélioration génétique chez les caféiers cultivés. *Café Cacao Thé*. XXVIII:231-244.

- Dufour, M.; Leroy, T.; Carrasco, C.; Philippe, R.; Fenouillet, C. (2000). Coffee (*Coffea* sp.) genetic transformation for insect resistance. In: T. Sera et al., editors, *Coffee biotechnology and quality*. Springer, Dordrecht, NLD. p. 209-217. doi:10.1007/978-94-017-1068-8\_18
- Etienne, H.; Berthouly, M. (2002). Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 69:215–231.
- Fernández, R.; De Guglielmo, Z.; Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación* 71(34): 57-84. [http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1010-29142010000300004&script=sci\\_abstract](http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S1010-29142010000300004&script=sci_abstract)
- Fernandez, R.; Menéndez, A. (2003). Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electron. J. Biotechnol.* 6:29-35. doi:10.2225/vol6-issue1-fulltext-6
- 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.M.; Arrieta, G.; Espinoza, A. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs Caturra and Catuai. *Electron. J. Biotechnol.* 11:1-11. doi:10.2225/vol11-issue1-fulltext-9
- Gichuru, E., Agwanda, C.O.; Combes, M.C.; Mutitu, E.W.; Ngugi, E.C.; Bertrand, B.; Lashermes, P. (2008). Identification of molecular markers linked to a gene conferring resistance to coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in *Coffea arabica*. *Plant Pathol.* 57:1117-1124. doi:10.1111/j.1365-3059.2008.01846.x
- Gotteland, M.; Saturnino, P. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista Chilena de Nutrición*, 34 (2). <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182007000200002>
- Grézes, J.; Thomasset, B.; Thomas, D. (1994). Factors influencing protoplast isolation from *Coffea arabica* cells. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 36:91-97. doi:10.1007/BF00048319
- Hatanaka, T.; Choi, Y.; Kusano, T.; Sano, H. (1999). Transgenic plants of coffee (*Coffea canephora*) from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.* 19:106-110. doi:10.1007/s002990050719
- ICAFFE (Instituto Del Café de Costa Rica). (2016). Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. ICAFFE, Heredia, CRI. [http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/informacion\\_mercado/informes\\_actividad/anteriores/2016.pdf](http://www.icafe.cr/wp-content/uploads/informacion_mercado/informes_actividad/anteriores/2016.pdf)
- [Indacochea Chilan, L.L.](#) (2018). Análisis de la tolerancia a la presencia de cuatro enfermedades foliares en 20 variedades e híbridos de café arábigo (*Coffea arabica*). Tesis, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/1281>
- Kumar, V., Satyanarayana, K.; Sarala, S.; Indu, E.; Giridhar, P.; Chandrashekar, A.; 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.* 25:214-222. doi:10.1007/s00299-005-0045-x
- Labouisse, J.P.; Bellachew, B.; Kotecha, S.; Bertrand, B. (2008). Current status of coffee (*Coffea arabica* L.) genetic resources in Ethiopia: implications for conservation. *Genet. Resour. Crop Evol.* 55:1079-1093. doi:10.1007/s10722-008-9361-7
- Lashermes, P.; Carvalho, A.; Etienne, H. (2008). Genomics of coffee, one of the world's largest traded commodities. In: P.H. Moore, and R. Ming, editors, *Genomics of tropical crop plants*. Vol. 1. *Plant genetics and genomics: Crops and models*. Springer, NY, USA. p. 203-226. doi:10.1007/978-0-387-71219-2\_9

- Lashermes, P.; Combes, M.C.; Robert, J.; Trouslot, P.; Hont, A.D.; Anthony, F.; Charrier, A. (1999). Molecular characterization and origin of the *Coffea arabica* L. genome. *Mol. Gen. Genet.* 261:259-266. doi:10.1007/s004380050
- Leroy, T., A. Henry, M. Royer, I. Altosaar, R. Frutos, D. Duris, and R. Philippe. (2000). Genetically modified coffee plant expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Rep.* 19:382-389. doi:10.1007/s002990050744
- Leroy, T.; Royer, M.; Paillard, M. (1997). Introduction de gènes d'intérêt agronomique dans l'espèce *Coffea canephora* Pierre par transformation avec *Agrobacterium* sp. Fr: Association for Science and Information on Coffee, editor, Dix-septième colloque scientifique international sur le café. ASIC, Paris, FRA. p. 439-446
- Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E.; Mroginski, L. (2010). Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Argenbio, INTA. 643 p. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/BiotecnologiayMejoramientovegetalII.pdf>
- Llop, P. (2003). Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens*. Tesis Dr., Universitat De Valencia Servei de Publicacions, Valencia, ESP.
- López, K.; Rodríguez, D.; Vaca, J. (2013). Optimización de las condiciones de inoculación por biobalística de un Begomovirus en tomate y tabaco. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 15(2):8-17. doi:10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41261
- Lucas Suárez, V.M. (2018). Evaluación de la producción de variedades e híbridos de *Coffea arabica* (café arábigo). Tesis, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/1283/1/UNESUM-ECUADOR-AGROPECUARIA-2018-13.pdf>
- McCown, B.H.; Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM)-A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortSci.* 16:453-453
- Melese, K. (2016). The role of biotechnology on coffee plant propagation: A current topics paper. *J. Biol. Agric. Healthcare* 6(5):13-19. <https://core.ac.uk/download/pdf/234661918.pdf>
- Mishra, M.K.; Slater, A. (2012). Recent advances in the genetic transformation of coffee. *Biotechnol. Res. Int.* 2012:580857. doi:10.1155/2012/580857
- Mishra, M.K.; Sreenath, H.; Srinivasan, C. (2002). *Agrobacterium*-mediated transformation of coffee: an assessment of factors affecting gene transfer efficiency. In: Association for Science and Information on Coffee, editor, Proceedings of the 15th Plantation Crops Symposium Placrosym XV. ASIC, Mysore, IND. p. 251-255.
- Morel, G.; Wetmore, R. H. (1951). Tissue culture of monocotyledons. *Am. J. Bot.* 38:138-140.
- Morillo, S.X. (2011). Evaluación del control de *Agrobacterium tumefaciens* mediante la aplicación de agentes antibióticos en rosas. Informe Ing. Agropecu., Universidad de Fuerzas Armadas ESPE, Sangolquí, ECU
- Noceda, C; Jiménez, E; Barbón, R; Capote, A; Quijál, 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
- Ocampo, C.A.; Manzanera, L. (1991). Advances in genetic manipulation of coffee plant. In: Association for Science and Information on Coffee, editor, Proceedings of 14th Colloquium of International Coffee Science Association. ASIC, San Francisco, CA, USA. p. 378-382.
- Ogita, S.; Uefuji, H.; Morimoto, M.; 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. doi:10.1007/s11103-004-0393-x
- Orozco, F.J.; Schieder, D. (1982). Aislamiento y cultivo de protoplastos a partir de hojas de café. *Cenicafé* 33(4):129-136.

- Parrales Parrales, T.E. (2021). Severidad de cuatro enfermedades foliares en 20 cultivares de café arábigo (*Coffea arábica*). Tesis, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. <http://repositorio.unesum.edu.ec/handle/53000/2936>
- Perthuis, B.; Pradon, J.; Montagnon, C.; Dufour, M.; 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. doi:10.1007/s10681-005-8003-9
- Ponce Vaca, L.; Orellana Suarez, K.; Acuña Velásquez, I.; Alfonso Alemán, J.; Fuentes Figueroa, T. (2018). Situación de la caficultura ecuatoriana: perspectivas. *Estudios del Desarrollo Social: Cuba y América Latina* 15(1): 307-325. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2308-01322018000100015&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-01322018000100015&lng=pt&nrm=iso)
- Ribas, A.F., Galvão, R.M.; Pereira, E.F.P.; Vieira, L.. (2006<sup>a</sup>). Transformação de *Coffea arabica* com o gene da ACC-oxidase em orientação antisense. Em: Association for Science and Information on Coffee, editor, Proceedings of the 50th Congresso Brasileiro de Genética. ASIC, São Paulo, BRA. p. 492-493.
- Ribas, A.F.; Kobayashi, A.; Pereira, L.; Vieira, L. (2005). Genetic transformation of *Coffea canephora* by particle bombardment. *Biol. Plantarum* 49:493-497. doi:10.1007/s10535-005-0038-1
- Ribas, A.F.; Protasio, L.; Gonzaga, L.; Vieira, L. (2006c). Genetic transformation of coffee. *Plant Physiol.* 18:83-94. doi:10.1590/S1677-04202006000100007
- Rosillo, A.G.; Acuna, J.; Gaitan, A.; De-Pena, M. (2003). Optimised DNA delivery into *Coffea arabica* suspension culture cells by particle bombardment. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74:45-49. doi:10.1023/A:1023314128543
- Santana-Buzzy, N.; Rojas-Herrera, R.; Galaz-Ávalos, R.M.; Ku-Cauich, J.R.; Mijangos-Cortés, J.; Gutiérrez-Pacheco, L.C.; Canto, A.; Quiroz-Figueroa, F.; Loyola-Vargas, V.M. (2007). Advances in coffee tissue culture and its practical applications. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 43:507-520. DOI 10.1007/s11627-007-9074-1
- Schopke, C.; Muller, L.; Kohlenbach, H. (1987). Somatic embryogenesis and regeneration of plantlets in protoplast cultures from somatic embryos of coffee (*Coffea canephora* P. ex Fr). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 8:243-248. doi:10.1007/BF00040951
- Solano, W. (2001). Efecto de las características de cultivo en suspensión celular y en biorreactor con inmersión temporal sobre la propagación masiva de *Coffea arabica* por embriogénesis somática. Tesis Lic., Universidad de Costa Rica, Turrialba, CRI.
- Sondahl, M.R.; Champman, M.; Sharp, N. (1980). Protoplast liberation, cell wall construction and callus proliferation in *Coffea arabica* L. callus tissues. *Turrialba* 30:161-165.
- 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
- Spiral, J.; Petiard, V. (1991). Protoplast culture and regeneration in coffee species. In: Association for Science and Information on Coffee, editor, Proceedings of the 14th International Conference on Coffee Science. ASIC, San Francisco, CA, USA. p. 383-391.
- Spiral, J.; Thierry, C.; Paillard, M.; Petiard, V. (1993). Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. *Compt. Rend. l'Academ. Sci. Paris* 316(1):1-6
- Staritsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neerl.* 19 (4): 509-514
- Tran, H.T., Slade, L.; Furtado, A.; Smyth, H.; Henry, R. (2016). Advances in genomics for the improvement of quality in coffee. *J. Sci. Food Agric.* 96:3300-3312. doi:10.1002/jsfa.7692
- Valderrama, A.M., Arango, R.; Afanador, L. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: "Ingeniería Genética Natural Aplicada". *Rev. Fac. Nal. Agr.* 58:2569-2585.

- Van-Boxtel, J.V. (1994). Studiesongenetictransformationofcoffeebyusingelectroporation and thebiolisticmethod. PhD. Diss., Univesityof Wageningen, NLD.
- Van-Boxtel, J.V.; Berthouly, M.; Carasco, M.; Dufour, M.; Eskes, A. (1995). Transientexpressionof  $\beta$ -glucuronidasefollowingbiolisticdeliveryofforeign DNA intocoffeetissues. Plant Cell Rep. 14:748-752. doi:10.1007/BF00232915
- Villacreses Pin, J.I. (2017). Estudio de las enfermedades que afectan a la producción del cultivo de café arábico (*Coffeaarabiga*). Tesis, Universidad Estatal del Sur de Manabí, Jipijapa, Ecuador. <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/7111/1/UNESUM.ECU-AGROPE-2017-14.pdf>
- Villalta-Villalobos, J. y Gatica-Arias, A. (2019). Una mirada en el tiempo: mejoramiento genético de café mediante la aplicación de la biotecnología. Agronomía Mesoamericana 30(2):577-599. doi:10.15517/am.v30i2.34173