

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA



ESCUELA DE BIOLOGÍA

Evaluación de los factores que afectan la regeneración *in vitro* y la transformación genética en café (*Coffea arabica* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Proyecto de graduación presentado a la Universidad de Costa Rica para optar por el título de Licenciatura en Biología con énfasis en Biología Molecular y Biotecnología

LAURA ROJAS LORZ

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

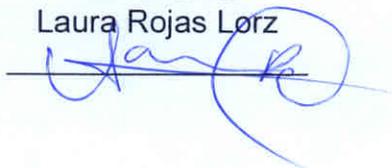
SAN JOSÉ COSTA RICA

2018

HOJA DE APROBACIÓN

Evaluación de los factores que afectan la regeneración *in vitro* y la transformación genética en café (*Coffea arabica* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

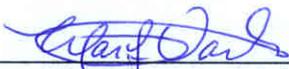
Sustentante
Laura Rojas Lorz



Miembros del tribunal

Andrés Gatica

Dr. Andrés M. Gatica Arias
Escuela de Biología, UCR
Director de tesis



Dra. Marta Valdez Melara
Escuela de Biología

molecular

Lectora UCR



Dr. James Karkashian Córdoba
Lector externo
UCR



M. Sc. Griselda Arrieta Espinoza
Centro investigación Biología Celular y

Lectora UCR



Dr. German Vidaurre Fallas
Decanato de Ciencias Básicas
UCR

DEDICATORIA

Deseo agradecer a mi papá, mamá y hermana por su apoyo incondicional cuya guía y apoyo me han ayudado a convertirme en lo que soy. Asimismo, quisiera agradecer a mis amigos Jimmy Villalta, Miguel Benavides y César Vargas y todas las personas que me brindaron su colaboración y apoyo durante el proyecto sin los cuales la realización del mismo hubiese sido imposible.

Laura

RECONOCIMIENTOS

La autora desea agradecer a las siguientes instituciones y personas por su colaboración en el presente trabajo:

A la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR) por la excelente formación recibida y por permitirme la ejecución del proyecto en sus instalaciones.

Al Dr. Andrés Gatica Arias por su guía, enseñanza y apoyo incondicional durante el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Marta Valdez Melara, por su guía y apoyo durante la realización del proyecto.

A la profesora M. Sc. Griselda Arrieta Espinoza por su guía y apoyo durante la realización de este proyecto.

A la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica y MKTPLACE por el apoyo financiero al proyecto No. 111-B3-206.

INDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN DEL PROYECTO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
RECONOCIMIENTOS.....	iii
INDICE GENERAL.....	iv
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE CUADROS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
INTRODUCCION.....	1

REVISION DE LITERATURA

Generalidades del café	2
Importancia económica del café	3
Enfermedades del café	3
Cultivo in vitro de café.....	4
Transformación genética en café	6
<i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i>	8

JUSTIFICACIÓN	9
----------------------------	----------

HIPÓTESIS.....	12
-----------------------	-----------

OBJETIVO GENERAL	12
-------------------------------	-----------

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
-----------------------------------	-----------

METODOLOGÍA

Ubicación experimental.	13
Material vegetal.....	13
Plásmidos.	14
Inducción de embriogénesis somática directa	16
Aclimatación de plantas de <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra obtenidas a partir del proceso de embriogénesis somática directa (ESD).....	17

Análisis histológico.....	17
Protocolo general de transformación genética con <i>A. tumefaciens</i>	19
Optimización del protocolo de transformación genética con <i>A. tumefaciens</i> ATHV: 1303	20
Transformación de <i>Eschericia coli</i> y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el gen <i>cry10Aa</i> presente en el plásmido B427.....	21
Comprobación mediante técnicas moleculares la presencia del gen de interés (<i>cry10Aa</i>) en las bacterias <i>E. coli</i> Dh5 α y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepas ATHV, C58 y GV3101.....	22
Transformación genética de segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra con el gen <i>cry10Aa</i> de <i>Bacillus thuringensis</i>	23
Protocolo de extracción de ADN.....	24
Confirmación de la integración del gen <i>cry10Aa</i> en el genoma del café.....	24
Análisis estadístico.....	28

RESULTADOS

Inducción de embriogénesis somática directa (ESD) mediante nitrato de plata ($AgNO_3$) en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> , variedad Caturra.....	29
Estandarización de los factores (densidad óptica (DO_{600}) de la bacteria, temperatura y tiempo de co-cultivo) en la introducción de genes de interés en el genoma de café utilizando <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV:: pCAMBIA 1303.....	33
Comprobación mediante técnicas moleculares la presencia del gen de interés (<i>cry10Aa</i>) en las bacterias <i>E. coli</i> Dh5 α y <i>Agrobacterium tumefaciens</i> cepas ATHV, C58 y GV3101.....	38
Comprobación de la presencia de <i>cry10Aa</i> en muestras co-cultivadas con <i>A. tumefaciens</i> C58:B427 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101:B427.....	44
DISCUSION.....	48
CONCLUSIONES.....	50
RECOMENDACIONES.....	51
BIBLIOGRAFÍA.....	53

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mapa del vector binario pCAMBIA 1303, utilizado en transformación genética de tejido vegetal de café mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV.....	14
Figura 2. Mapa del vector binario B427p6o35S-Cry, utilizado en transformación genética de tejido vegetal de café mediante <i>A. tumefaciens</i> :C58 y <i>A. tumefaciens</i> :GV3101.....	15
Figura 3. Evaluación del proceso de embriogénesis somática directa en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> variedad Caturra a las 8 semanas de haber sido introducidos.....	30
Figura 4. Embriones de <i>C. arabica</i> variedad Caturra los 5 meses de haber sido introducidos en el tratamiento 2 con AgNO ₃	31
Figura 5. Línea de tiempo del proceso de embriogénesis somática directa de segmentos de hoja variedad Caturra hasta su aclimatación en invernadero a los 6 meses (A, C), 7 meses (B) y 12 meses (D).....	32
Figura 6. Línea de tiempo del proceso de embriogénesis somática directa de segmentos de hoja variedad Caturra hasta su aclimatación en invernadero.....	32
Figura 7. Proceso de aclimatación de una planta de <i>C. arabica</i> variedad Caturra.....	34
Figura 8. Transformación mediante <i>A. tumefaciens</i> ATHV:: pCAMBIA 1303 en segmentos de hoja de la variedad Caturra a temperaturas y tiempos de co-cultivo de 25 ° C por 2 días, 25 ° C, por 4 días, 28° C por 2 días y 28° C por 4 días.....	36
Figura 9. Transformación de prueba (1) mediante <i>A. tumefaciens</i> ATHV (D.O ₆₀₀ = 0,866) en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> variedad Caturra.....	37
Figura 10. Transformación de prueba (2) mediante <i>A. tumefaciens</i> ATHV (D.O ₆₀₀ =0762) en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> variedad Caturra.....	37
Figura 11. Introducción del plásmido B427 en <i>E.coli</i> Dh5-α.....	38
Figura 12. Electroforesis con productos de restricción de plásmido B427en <i>E. coli</i> DH5-α con las enzimas de restricción XbaI/BamHI y EcoRI/BamHI.....	39
Figura 13. Presencia del gen <i>hptII</i> (producto esperado de 500 pb) en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> C58 transformada con el plásmido B427.....	40
Figura 14. Electroforesis en gel con productos de la digestión de plásmido B427en <i>A. tumefaciens</i> GV3101 con las enzimas de restricción EcoRI/BamHI.....	40
Figura 15. PCR de comprobación para la presencia de <i>virG</i> en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra transformados con <i>A. tumefaciens</i> C58:B427 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101:B427.....	43

Figura 16. PCR para determinar gradiente de temperatura (52°-62°C) para 3 pares de primers del gen <i>cry10Aa</i>	44
Figura 17. PCR de comprobación para la presencia de <i>cry10Aa</i> (utilizando el primer par de primers) en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra co-cultivados con <i>A. tumefaciens</i> C58:B427 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101:B427.....	45
Figura 18. PCR de comprobación para la presencia de <i>cry10Aa</i> (utilizando el segundo par de primers) en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra co-cultivados con <i>A. tumefaciens</i> C58:B427 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101:B427.....	45
Figura 19. PCR de comprobación para la presencia de <i>cry10Aa</i> (utilizando el tercer par de primers) en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra co-cultivados con <i>A. tumefaciens</i> C58:B427 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101:B427.....	46

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS)(1962).....	13
Cuadro 2. Tratamientos para la inducción de embriogénesis somática directa de segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> , variedad Caturra.....	16
Cuadro 3. Pares de primers utilizados para comprobar la presencia del gen <i>cry10Aa</i> en segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra transformados mediante <i>A. tumefaciens</i> C58:B427 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101:B427.....	25
Cuadro 4. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen <i>cry10Aa</i>	25
Cuadro 5. Programa de PCR para la estandarización de la temperatura de <i>annealing</i> óptima para los primers correspondientes al gen de interés <i>cry10Aa</i>	25
Cuadro 6. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen <i>hptII</i>	26
Cuadro 7. Programa de PCR para la amplificación del gen <i>hptII</i>	26
Cuadro 8. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen <i>virG</i>	27
Cuadro 9. Programa de PCR para la amplificación del gen <i>virG</i>	27
Cuadro 10. Número de embriones por explante, obtenido para cada tratamiento en el proceso de embriogénesis somática directa en <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra.....	29
Cuadro 11. Promedio de segmentos de hoja variedad Caturra, co-cultivados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303 a diferentes densidades ópticas (DO ₆₀₀) de bacteria.....	33
Cuadro 12. Promedio de segmentos de hoja variedad Caturra, co-cultivados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV:: pCAMBIA 1303 a diferentes temperaturas y tiempos de cultivo	35
Cuadro 13. Condiciones óptimas para la introducción de genes de interés en el genoma de café utilizando <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA.....	37
Cuadro 14. Concentración y calidad de ADN de segmentos de hoja <i>C. arabica</i> L. variedad Caturra co-cultivados con <i>A. tumefaciens</i> C58:B427 y <i>A. tumefaciens</i> GV3101:B427.....	42
Cuadro 15. Presencia de los genes <i>virG</i> y <i>cry10Aa</i> (3 pares de primers) en ADN extraído de segmentos de hoja de <i>C. arabica</i> variedad Caturra.	

LISTA DE ABREVIATURAS

AIA: Ácido indolacético

AgNO₃: Nitrato de plata

BA: N⁶ Bencil adenina.

DO₆₀₀: Densidad óptica medida a 600 nm.

ESD: Embriogénesis somática directa

ESI: Embriogénesis somática indirecta

LB: Medio de cultivo Luria Bertani

MS: Medio de cultivo Murashigue y Skoog

Evaluación de los factores que afectan la regeneración *in vitro* y la transformación genética en café (*Coffea arabica* L.) mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Laura Rojas Lorz

Resumen

El café es uno de los productos agrícolas más comercializados en los mercados internacionales y en Costa Rica es el segundo producto de exportación. El 70 % del café cultivado mundialmente corresponde a la especie *C. arabica*, la cual es susceptible a una amplia variedad de enfermedades y plagas. Las técnicas convencionales para el mejoramiento genético del café requieren un mínimo de 30 años para el desarrollo de nuevas variedades, por lo que la ingeniería genética representa una herramienta útil para la creación de nuevas variedades resistentes a plagas y enfermedades basándose en técnicas como el cultivo *in vitro* y la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Una de las mayores limitantes en los protocolos de transformación genética es el tiempo necesario para la regeneración bajo condiciones *in vitro* de una planta completa a partir de células modificadas genéticamente. Entre los procesos de regeneración de plantas, la embriogénesis somática directa ha sido considerada como un método efectivo por tener un período para la formación de embriones somáticos. Por esta razón, el objetivo de este trabajo es evaluar los factores que afectan la inducción de embriogénesis somática directa y la introducción de genes de que confieren resistencia contra patógenos en el genoma de café utilizando *Agrobacterium tumefaciens* (como cepa de bacteria, temperatura y tiempo de co-cultivo, entre otros).

Se observó un efecto positivo en la combinación de bencil adenina (BA), ácido indolacético (AIA) y nitrato de plata (AgNO_3) en la inducción de embriogénesis somática directa en los segmentos de hoja de café a partir de 8 semanas, obteniéndose una mayor cantidad de embriones por segmento de hoja ($3,30 \pm 0,73$) en el tratamiento complementado con $6,6 \mu\text{M}$ de BA, $40 \mu\text{M}$ de AgNO_3 y $2,85 \mu\text{M}$ de AIA. La aclimatación de plántulas de café se llevó a cabo en 5 semanas hasta su establecimiento exitoso en

el invernadero. En cuanto a las estandarización de condiciones óptimas de DO₆₀₀ de bacteria (0,0.5 0.75 y 1.0), temperatura (25 y 28°C) y tiempo de co-cultivo (2 y 4 días) para la tintroducción de genes mediante *A. tumefaciens* ATHV:1303, el tratamiento con mayor cantidad de explantes con expresión transitoria del gen *uidA*, fue el tratamiento de 28° C por 4 días (0.82 ±0.07, p<0.05). Sin embargo, en este último se observó la mayor contaminación por *A. tumefaciens* dada la alta densidad óptica de bacteria utilizada (DO₆₀₀: 1.0), por lo que se determinó que 25-28 ° C por 2 días era el mejor tratamiento a utilizar.

Se logró determinar la presencia del plásmido B427 (el cual contiene los genes *hptII* y *cry10Aa*), en las cepas GV3101 y C58 de *A. tumefaciens*, más no se logró la introducción del plásmido en la cepa ATHV. Razón por la cual se continuó trabajando con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427. La temperatura óptima de amplificación el gen *cry10Aa* se encontró entre los 52 y los 62°C. Se encontró a su vez la presencia de los genes *virG* y *cry10Aa* en ADN extraído de segmentos de hoja de café transformados con *A. tumefaciens* C58:B427 y GV3101:B427, pero no se encontró la presencia del gen *hptII* en ninguno de los segmentos de hoja transformados.

Palabras clave: *Coffea arabica*, embriogénesis somática directa, *Agrobacterium tumefaciens*, expresión transitoria, *cry10Aa*

INTRODUCCION

El café (*C. arabica* L.) es una planta nativa de las tierras altas del suroeste de Etiopía, con poblaciones adicionales en el sur de Sudán (Boma Plateau) y el norte de Kenia. Del género *Coffea* L. las especies de mayor importancia económica corresponden a *C. arabica* L., *C. canephora* Pierre ex Froehner y *C. liberica* de las cuales *Coffea arabica* L. posee la mayor importancia comercial (de A. Bojórquez-Quintal et al., 2014). El café es una de las bebidas más consumidas alrededor del mundo (Mangal, 2007), razón por la cual posee gran interés económico en la actualidad. El café es susceptible a diferentes enfermedades y plagas. Una de las mayores amenazas de la producción son la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), la roya (*Hemileia vastatrix*), el minador de la hoja (*Leucoptera coffeella*), y algunos hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* que causan afecciones importantes al cultivo (Waller et al., 2007).

Principalmente, el control de dichas enfermedades se da mediante el uso de pesticidas químicos, con la desventaja de causar altos riesgos a la salud de los agricultores y además contribuir a la degradación de la capa de ozono (Ferreira et al., 2006). La ingeniería genética es una herramienta muy valiosa en campos de investigación vegetal, ya que esta tecnología abre una ventana de posibilidades al introducirse rasgos de diferentes especies como la resistencia a insectos y herbicidas, calidad y la tolerancia a estrés abiótico como sequía y frío, con lo que se pueden obtener características que serían imposibles de lograr por técnicas de cultivo tradicional (Kumar et al., 2016).

Entre las técnicas de ingeniería genética se encuentra la transformación genética, la cual en café se ha llevado a cabo tanto por métodos biológicos como el uso de bacterias del género *Agrobacterium* o físicos como la electroporación y la biobalística (Kumar et al., 2016). A pesar que los protocolos de transformación disponibles utilizan mayoritariamente la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* por ser un método barato que puede transferir segmentos relativamente largos de ADN y con un número bajo de copias del gen integradas, su eficiencia y reproducibilidad son muy bajas, lo que limita su uso rutinario en los laboratorios (Ferreira et al., 2006).

Una de las mayores limitantes que se han tenido que enfrentar en los protocolos de transformación genética de café es el tiempo necesario para la regeneración de una planta completa. Entre los procesos de regeneración de plantas, la embriogénesis somática directa ha sido considerada como uno de los métodos más efectivos por tener un período para la formación de embriones menor comparado con otros protocolos de regeneración (Fernández-Da Silva & Menéndez-Yuffá, 2003). Por esta razón, el objetivo de este trabajo es evaluar los factores que afectan la inducción de la embriogénesis somática directa y la introducción de genes de interés en el genoma de café mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

REVISION DE LITERATURA

Generalidades del Café

El café pertenece a la familia Rubiaceae, la cual está compuesta aproximadamente por 500 géneros y 5000 especies (Waller et al., 2007). Las semillas están contenidas en el fruto que en estado de madurez toma un color rojizo denominado cereza (Monaco et al., 1997). Los primeros registros del uso de la planta como bebida se han encontrado en Yemen desde el siglo XIV, desde donde se piensa se diseminó a otras partes de África, Asia y Europa (Reich, 2010). El café es una fuente primaria de cafeína, la cual es una sustancia estimulante (Mangal, 2007).

El café es una de las bebidas más consumidas alrededor del mundo (Mangal, 2007), de ahí su interés económico. *Coffea arabica* L. y *C. canephora* Pierre ex Froehner, corresponden a las especies de mayor importancia comercial, siendo un 70 % del café cultivado mundialmente *C. arabica* y el 30 % restante *C. canephora* (de A. Bojórquez-Quintal et al., 2014). En Costa Rica se cultiva solamente *C. arabica* L., principalmente las variedades Caturra y Catuaí, ya que éstas producen un grano de mayor calidad y una taza con mejores características organolépticas (agradable, aromática y fina) que *C. canephora* (ICAFÉ, 2015).

Importancia económica del café

El café es uno de los principales productos de origen agrícola comercializados en los mercados internacionales y a menudo supone una gran contribución a las exportaciones de las regiones productoras. Para la cosecha 2014-2015 se ha reportado una producción mundial total de 143.25 millones de sacos de 60 kg (ICAFÉ, 2015). Costa Rica ocupa el 14^{vo} lugar entre los países productores de café del mundo (ICAFÉ, 2015). En Costa Rica, es el segundo producto de exportación superado solamente por el banano y durante la cosecha 2014-2015 generó ingresos al país por un monto aproximado de \$ 322 365 000 en puerto de carga convenido (FOB) (ICAFÉ, 2015).

Enfermedades del café

El café es altamente susceptible a plagas y enfermedades, reto que ha tenido que ser confrontado seriamente dado que es un cultivo de gran importancia comercial (Mondego et al., 2011). Además de conferir resistencia contra patógenos, el mejoramiento genético de café ha incluido otras características deseables como uniformidad en la maduración, ciclos de maduración más cortos, mayor tamaño de semilla y cualidades más relacionados con el consumidor como niveles de cafeína más bajos, mejor sabor y aroma (Indu, 2004).

El café es susceptible a una amplia variedad de plagas, entre las cuales se pueden mencionar la broca del café (*Hypothenemus hampei*), el minador de la hoja (*Leucoptera coffeella*) y la cochinilla de raíces (*Dysmicoccus* spp) (Waller et al., 2007). El minador de la hoja (*Leucoptera coffeella*, Lyonetiidae), es una plaga de amplia distribución en la región neotropical atacando el cultivo en todos los países de Centro y Suramérica (Constantino et al., 2012). Es una plaga muy dañina que ocasiona la defoliación de las plantas y ha obligado a los agricultores al uso de insecticidas. Es conocida como una especie monófaga porque sólo ataca al género *Coffea*. Los daños son causados durante su estado de larva y si concurren varias larvas en una sola hoja puede llegar a causar necrosamiento en el 90% de su estructura (Perthuis et al., 2005).

Por otra parte, la polilla de la raíz incluye varias especies: *Dysmicoccus alazon*, *D. brevipes* y *D. criptus*, que generalmente están asociadas con el hongo *Septobasidium* y las hormigas del género *Solenopsis*. Se encuentra ampliamente distribuida en países cafetaleros como Colombia, Costa Rica, Honduras, Brasil, Guatemala y Cuba (Montelie-Montelie et al., 2012), generando en conjunto síntomas externos en el árbol similares a los producidos por un ataque de llagas, que ocasionan el marchitamiento generalizado de la planta (Waller et al., 2007). La roya es una enfermedad causada por el hongo *Hemileia vastatrix*, la cual está entre las enfermedades que ha dejado mayores pérdidas en los últimos 100 años. Esta enfermedad se encuentra distribuida tanto en América como en África y Oceanía (Montelie-Montelie et al., 2012). El alto impacto se debe a que la pérdida es inmediata, ya que los frutos caen o no maduran debido al deterioro de las plantas (Montes et al., 2012).

La broca del café es una de las plagas más dañinas que afecta el cultivo del café, ya que se encuentra ampliamente distribuida en las zonas productoras de café (África, Asia, Oceanía y América) (Montelie-Montelie et al., 2012), causando pérdidas de hasta 500 millones de dólares al año (Vega et al., 2002). Esta ataca, perfora y daña directamente los frutos de café, por lo que afecta principalmente la producción y la calidad. Es un insecto de difícil manejo con los métodos tradicionales de control como los insecticidas porque permanece la mayor parte de su vida en el interior de los frutos (Vega et al., 2012). A pesar de los esfuerzos por erradicar la broca de los cultivos de café en Costa Rica, durante el período comprendido entre 2016-2017 se determinó un promedio ponderado nacional de ataque de broca de 2.2% (ICAFÉ, 2016).

Cultivo *in vitro* de café

Uno de las mayores limitantes que se han tenido que enfrentar en los protocolos de transformación genética de café es el tiempo necesario y el proceso de regeneración de la planta (Fernández-Da Silva & Menéndez-Yuffá, 2003). Este último paso es particularmente complejo, ya que existen muchos factores que pueden determinar el éxito en los sistemas de regeneración de la planta (Khayat, 2012). Entre los anteriores se pueden mencionar la especie y el genotipo de la planta, el tipo de explante, el tipo de medio de cultivo, el tipo y concentración de los reguladores de crecimiento y las

condiciones ambientales a las que se expone el cultivo (luz, fotoperíodo, temperatura, humedad) (George et al., 2008).

Entre los procesos de regeneración de la planta, la embriogénesis somática es considerada uno de los métodos más efectivos, ya que presenta la mayor tasa de multiplicación y se ha logrado establecer a partir de distintos explantes, tales como secciones de tallo, hojas, ovarios y estambres (Fernández et al., 2010). Dicho proceso, consiste en el desarrollo de embriones somáticos a partir de células somáticas sin la necesidad de fusión de gametos (Celestino et al., 2005).

En café la embriogénesis somática puede ser indirecta (ESI) o directa (ESD) (Von Arnold et al., 2002). La ESI implica primero la formación de una masa indiferenciada de célula (callo) a partir de la cual se forman embriones somáticos. Por medio de la ESD se pueden obtener embriones somáticos sin necesidad de una desdiferenciación previa (Van Boxtel & Berthouly, 1996). Una de las diferencias entre ambas radica en el tiempo de formación de embriones, ya que mientras en la embriogénesis somática indirecta se puede tardar hasta 7 meses (Gatica et al. 2008), por medio de la embriogénesis somática directa se pueden formar embriones a partir de 2 meses de tratamiento (Sridevi & Ghiridar, 2010).

La fase inicial del proceso de la embriogénesis somática consiste en una división y diferenciación celular con patrones definidos que dependen de diversos genes y factores que interactúan en cada etapa de la embriogénesis (Von Arnold et al., 2002). Una vez que el medio de cultivo es el adecuado y las condiciones físicas son apropiadas ciertas células dan origen a la embriogénesis somática, incrementado el número de divisiones celulares en el tejido y dando lugar a las diferentes etapas de desarrollo (Celestino et al., 2005).

En la etapa inicial se forma el suspensor, el cual es una estructura compuesta por ocho células. A continuación se forma un embrión preglobular, después las estructuras globulares, el embrión acorazonado, el embrión torpedo y finalmente el embrión cotiledonar el que tiene toda la información genética para formar una planta completa (Freire-Balseca, 2009). Una vez formado el embrión en fase cotiledonar se produce la maduración y finalmente se da la germinación y la regeneración del embrión somático a una planta completa (Freire-Balseca, 2009).

La embriogénesis somática ha sido reportada tanto en *C. canephora* como *C. arabica*, (Quiroz-Figueroa et al., 2002) y se ha encontrado que los brotes originados a partir de hoja e hipocótilo son aptos para procesos de transformación genética (Sridevi et al., 2010). En *C. canephora* se han obtenido resultados exitosos de la embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hipocótilo cortados de semillas germinadas en cultivo *in vitro*. (Sridevi et al., 2010). En Costa Rica se estableció un protocolo para regeneración de *Coffea arabica* L. vía ESI a partir de segmentos de hoja de las variedades Caturra y Catuaí. La inducción máxima de callo se observó cuando los segmentos de hoja se cultivaron en medio MS con 18.56 μ M kinetina y 4.52 μ M 2,4-D (ácido diclorofenoxiacético) (Gatica et al., 2008).

Transformación genética en café

La transformación genética es una herramienta eficaz en la investigación de plantas, ya que puede ser utilizada para sobre expresar, silenciar o suprimir los genes de interés y obtener las características deseadas (Ferreira et al., 2006). La transformación genética en café se ha llevado a cabo tanto por métodos biológicos, entre ellos el uso de bacterias del género *Agrobacterium*, como físicos, entre los cuales están la electroporación y la biobalística (Albuquerque et al., 2009). La transferencia de genes con *A. tumefaciens* se ha convertido en el método más utilizado para transferir genes foráneos en café, dado su bajo costo (Ferreira et al., 2006).

En café, la transformación genética mediante *A. tumefaciens* ha sido utilizada para disminuir el contenido de cafeína (Mishra & Slate, 2012), inhibiendo la producción de enzimas que ayudan a su síntesis (Ogita et al., 2004). Asimismo, se ha utilizado para brindarle a la planta mayor tolerancia a condiciones de estrés y también para conferirle resistencia contra patógenos. Esto último ha traído como beneficio la disminución en el uso de pesticidas químicos, los cuáles presentan altos riesgos a la salud de los agricultores (Ferreira et al., 2006).

La transformación mediante *A. tumefaciens* está basada en la transferencia de una pequeña parte de su ADN (ADN-T), localizado en la parte del genoma que favorece la inducción de tumores (Ti), en el genoma nuclear de la planta (Gelvin, 2003). Además del ADN-T, el plásmido posee una región de virulencia (*vir*) cuyos genes median el transporte del ADN-T y es regulada por la producción de compuestos fenólicos los cuáles se producen cuando se da una lesión en la planta (Gelvin, 2003). Para lograr la transformación genética mediante *A. tumefaciens* se deben determinar primero las condiciones óptimas para el traspaso del ADN-T en el tejido vegetal, el cual normalmente incluye el uso de tratamientos químicos (como cloruro de calcio) para aumentar la permeabilidad de la membrana celular y lograr que se introduzca el ADN foráneo en la célula (Gelvin, 2003).

El plásmido Ti, se ha observado que determina el tipo de planta que *Agrobacterium* puede infectar (Gelvin & Schilperoort, 2012). Varios genes de virulencia como *virC* y *virF*, poseen un rol importante en la determinación de las especies a las que pueden ser transferidos los genes *vir*. Por otro lado, los genes *vir A* y *vir G* forman parte de un sistema sensorial de traducción genética en el que *vir A*, es activado en presencia de compuestos fenólicos relacionados con daño a la planta, activando a su vez a *virG* el cual incrementa el nivel de transcripción de los demás genes *vir* (Gelvin & Schilperoort, 2012). A pesar de que *A. tumefaciens* ha sido ampliamente utilizada en transformación genética, los protocolos son difíciles de replicar y la eficiencia de transformación es bastante baja (~1%) (Ribas et al., 2011).

Existen diversos factores que pueden afectar el éxito de la transformación genética mediante *A. tumefaciens* en café, entre los cuales se pueden mencionar el genotipo de la planta, el tipo de explante y el medio de cultivo utilizados, la combinación entre el plásmido y *Agrobacterium* (Amoah, 2001; Suzuki et al., 2005), la densidad óptica (DO_{600}) de la bacteria durante el co-cultivo, la temperatura a la que se realiza el co-cultivo y el tiempo de co-cultivo (Ribas et al., 2011). A densidades ópticas mayores de bacteria se ha observado que se obtiene una mayor tasa de transformación de explantes. Sin embargo, si ésta es muy alta ($DO_{600} > 1$), también complica la eliminación de la bacteria (Ribas et al., 2011).

Por otro lado, se ha observado que al disminuir la temperatura del co-cultivo se logra una mejor eficacia en la transformación así como una mejor descontaminación en los procesos de eliminación de la bacteria (Ribas et al., 2011). Un protocolo de transformación eficiente debe incluir un sistema de cultivo de tejidos adecuado que permita una regeneración exitosa de los tejidos o la planta, un método de selección apropiado y finalmente un método de transformación efectivo (Ferreira et al. 2006). En Costa Rica se optimizó un protocolo de transformación genética en callo de Caturra mediante biobalística. Los cultivos de células en suspensión de Catuaí se establecieron a partir de callos embriogénicos (Gatica et al., 2008).

Bacillus thuringiensis (Bt)

Dado a que muchos de los pesticidas usados en control de plagas de los cultivos de café son muy tóxicos para los humanos y afectan a otros animales (Robinson, 1995), se han buscado alternativas para control más específicas y amigables con el ambiente (Lacey et al., 2015). Una de estas alternativas, que ha sido utilizada en los últimos años con éxito, corresponde a diversos insecticidas derivados de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Espinoza et al., 2010, Glare et al., 2012). *B. thuringiensis* es una bacteria Gram positiva que produce proteínas en forma cristalizada que son específicamente tóxicas para ciertas especies de insectos, pero son inofensivas para plantas, humanos y otros organismos (Soberón & Bravo, 2007).

El cristal proteínico está constituido por proteínas denominadas δ -endotoxinas también conocidas como proteínas *Cry* y *Cyt*. A la fecha se han clonado y secuenciado más de 200 diferentes genes *Cry* y 16 diferentes genes *Cyt* (Soberón & Bravo, 2007). Su toxicidad solo es específica para ciertas especies por lo que se consideran una herramienta inocua para el control de plagas (Arrieta et al. 2004). En esta investigación se trabajará con las proteínas *Cry*, las cuales inducen la formación de poros, los cuales ejercen su actividad tóxica al provocar un desequilibrio osmótico en las células epiteliales donde se insertan en la membrana. Los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de Bt son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Soberón &

Bravo, 2007). El insecto muerto provee entonces el medio rico para la propagación de la bacteria (Bravo et al., 2011).

Las proteínas Bt se han utilizado con éxito para controlar insectos como coleópteros, lepidópteros y dípteros en varias especies de café, incluyendo *C. arabica* (De Guglielmo-Cróquer et al. 2010) y *C. canephora* (Perthuis et al., 2005). En *C. arabica* se ha logrado transformar genéticamente mediante *Agrobacterium tumefaciens* el gen cry1ac, que confiere resistencia contra lepidópteros (De Guglielmo-Cróquer et al., 2010). Por otra parte, se ha determinado que las proteínas Bt con cadenas tipo israelensis, como Cry1B (López-Pazos, 2011) son tóxicas contra las larvas de *H. hampei* constituyendo la transformación con este gen una posible solución al problema entomológico más importante en los cultivos de café del mundo (Méndez-López et al. 2003).

JUSTIFICACIÓN

El proceso de embriogénesis somática indirecta (ESI) tiene una duración aproximada de 7 a 8 meses, ya que requiere la aparición previa de callos embriogénicos (Quiroz-Figueroa et al., 2002). Por otro lado, la Embriogénesis somática directa (ESD) promueve la formación de embriones somáticos directamente del explante manteniendo la estabilidad genómica de las plantas regeneradas sin la formación previa de callos embriogénicos (Kahia et al., 2016), lo cual toma aproximadamente 2 meses según la literatura (Quiroz-Figueroa et al., 2002). La inducción de embriones somáticos en *C. arabica* L. se ha dado principalmente de forma indirecta (Gatica-Arias et al., 2008, Ghiridar et al. 2004) y como se mencionó anteriormente toma un tiempo significativamente más prolongado.

Por esta razón, es que se considera de vital importancia el establecimiento de un protocolo de embriogénesis somática directa en *C. arabica* L. Al existir protocolos de embriogénesis somática directa exitosos en *C. canephora*, utilizando nitrato de plata (AgNO₃) como inductor (Sridevi & Ghiridar, 2012), en esta investigación se espera establecer un protocolo similar para la inducción de embriogénesis somática directa en *C. arabica* L, ya que aún no se ha utilizado este protocolo en esta especie.

A pesar de los avances significativos en los últimos años, la transformación genética en café es aún un proceso laborioso y complejo (Kumar et al., 2016). El éxito de la transformación genética depende de la especie, el ambiente, el método de cultivo, el medio de cultivo utilizado y la cepa de *Agrobacterium* utilizada (Ribas et al., 2011). Es por esta razón que con esta investigación se busca estandarizar los factores que afectan la introducción exitosa de genes interés por medio de *A. tumefaciens* en el genoma de café.

Debido a que se han obtenido transformaciones genéticas exitosas en *C. canephora* y *C. arabica* utilizando *A. tumefaciens*, es que se pretende utilizar un protocolo similar adaptado según la variedad utilizada, las condiciones ambientales y metodológicas propias de esta investigación. A pesar de que la recuperación después del proceso de transformación ha probado ser más sencillo en *C. canephora* que en *C.*

arabica, la especie a transformar en esta investigación será la última dada su mayor demanda e importancia económica en el país.

Pese a que se ha logrado la inserción exitosa de genes *cry* para conferir resistencia contra patógenos, como el *cry1a* en *C. arabica* que confiere resistencia a lepidópteros (Soberón & Bravo, 2007), aún no se ha logrado la inserción de genes *cry* en *C. arabica* para conferir resistencia contra la broca. El fin de establecer un protocolo de transformación genética mediante *A. tumefaciens* en *C. arabica* es poder utilizar explantes de hoja para la obtención de embriones somáticos, ya que en la mayoría de trabajos se han utilizado callos embriogénicos o embriones cigóticos. Por lo tanto, el objetivo es combinar este proceso de embriogénesis somática directa con la transformación genética para obtener embriones somáticos con expresión estable del gen *cry10Aa*.

La importancia de esta investigación radica en la obtención de una variedad de *C.arabica* con el gen *cry10Aa*, el cual tiene potencial para conferir resistencia contra la broca. Por lo cual tanto la transformación con el gen *cry10Aa* como el protocolo de embriogénesis somática directa representan una posible alternativa a uno de los problemas fitosanitarios más importante en los cultivos de café de Costa Rica y el mundo (Vandermeer et al., 2010).

HIPÓTESIS

- El nitrato de plata (AgNO_3) puede promover la tasa de inducción de embriogénesis somática directa en café.
- La densidad óptica (DO_{600}) de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, la temperatura y el tiempo de co-cultivo pueden afectar la eficiencia de la transformación genética en café.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar algunos factores que afectan la inducción de la embriogénesis somática directa y la expresión transitoria y estable de genes de interés en el genoma de *Coffea arabica* L. variedad Caturra mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la concentración de nitrato de plata (AgNO_3) en la formación de embriones somáticos por embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja de *Coffea arabica* L. variedad Caturra.
- Evaluar el efecto de la concentración (DO_{600}) de la bacteria, la temperatura y tiempo de co-cultivo en la expresión transitoria estable de genes reporteros y marcadores en el genoma de *Coffea arabica* L. variedad Caturra mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ATHV:: pCAMBIA 1303.
- Evaluar el protocolo de transformación genética establecido para la introducción del gen *cry10Aa* en el genoma de *Coffea arabica* L. variedad Caturra mediada por *Agrobacterium tumefaciens* ATHV.
- Comprobar mediante técnicas moleculares la presencia del gen de interés (*cry10Aa*) en los tejidos de café co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV, C58 y GV3101.

METODOLOGÍA

Ubicación experimental. La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal, en la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica.

Material vegetal. Para la evaluación de los factores que afectan el proceso de embriogénesis somática directa (ESD) y la introducción de genes de interés mediada por *A. tumefaciens* se utilizaron segmentos de hoja (0,5 cm²) de *C. arabica* L. variedad Caturra, provenientes de vitroplantas, las cuales fueron mantenidas en un cuarto de crecimiento con condiciones ambientales controladas (25°C ±1, 16 horas de fotoperíodo bajo luz blanca). El medio de cultivo para el crecimiento de las vitroplantas correspondió al medio semisólido Murashige y Skoog (1962), cuyos componentes incluyen macronutrientes, micronutrientes, vitaminas (Cuadro 1), benciladenina (1mgL⁻¹), ácido giberélico (1gL⁻¹), 3% de sacarosa, agar (8gL⁻¹) y tiene un pH de 5.6.

Cuadro 1. Componentes para la preparación del medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (1962).

Componente	Concentración en el medio MS (mgL ⁻¹)	Concentración en la solución madre (mgL ⁻¹)	Pesar (g) para 1 litro
Macroelementos (10X)			
NH ₄ NO ₃	1650	16500	16.5
KNO ₃	1900	19000	19.0
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	4400	4.4
MgSO ₄ 7 H ₂ O	370	3700	3.7
KH ₂ PO ₄	170	1700	1.7
Microelementos (200X)			
H ₃ BO ₃	6.2	1240	1.24
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	4460	4.46
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	1720	1.72
KI	0.83	166	0.166
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.25	50	0.05
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	5	0.005
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	5	0.005
Hierro (100X)			
EDTANaFeO ₄	43	4300	4.3
Vitaminas (200X)			
Ácido nicotínico	0.5	100	0.1
Piridoxina	0.5	100	0.1
Tiamina	0.5	100	0.1
Myo-inositol	100	20000	20
Otros			
Glicina	2	400	*
Sacarosa	30000	Añadir fresco	30
Agar	8000	Añadir fresco	8

Plásmidos. Para la optimización del protocolo de transformación genética se utilizó la cepa ATHV de *A. tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1303. El mismo contiene los genes que confieren resistencia a kanamicina (*nptII*) y a higromicina (*hptII*), el último bajo el control del promotor constitutivo CaMV35S y el terminador NOS. Asimismo posee los genes reporteros: *uidA*, el cual codifica la enzima β -glucuronidasa y el *gfp* el cuál codifica para la proteína verde fluorescente. Ambos se encuentran bajo el promotor constitutivo CaMV35S y el terminador NOS (Figura 1).

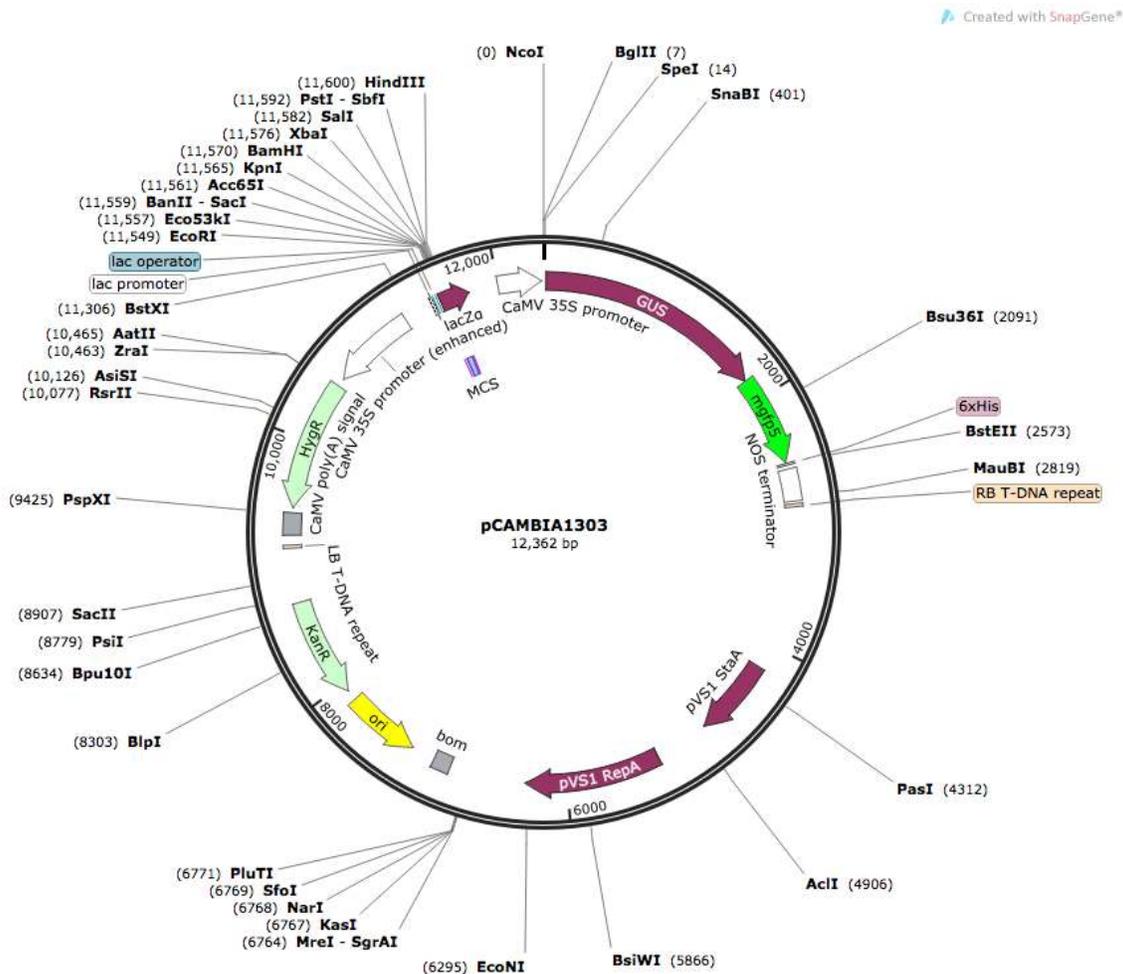


Figura 1. Mapa del vector binario pCAMBIA 1303, utilizado en transformación genética de tejido vegetal de café mediante *Agrobacterium tumefaciens* ATHV (*Snap gene*, accedido el 2 de febrero, 2016, desde http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pCAMBIA1303/).

Para los experimentos de transformación genética estable se utilizó el plásmido B427p6o35S-Cry, el cual contiene el gen de interés: *cry10Aa*, bajo el promotor CaMV35S (promotor constitutivo) y el terminador OCS. Además posee como gen de selección *hptII* el cual confiere resistencia a higromicina y se encuentra bajo el control del promotor específico Ubi y el terminador E9 (Figura2).

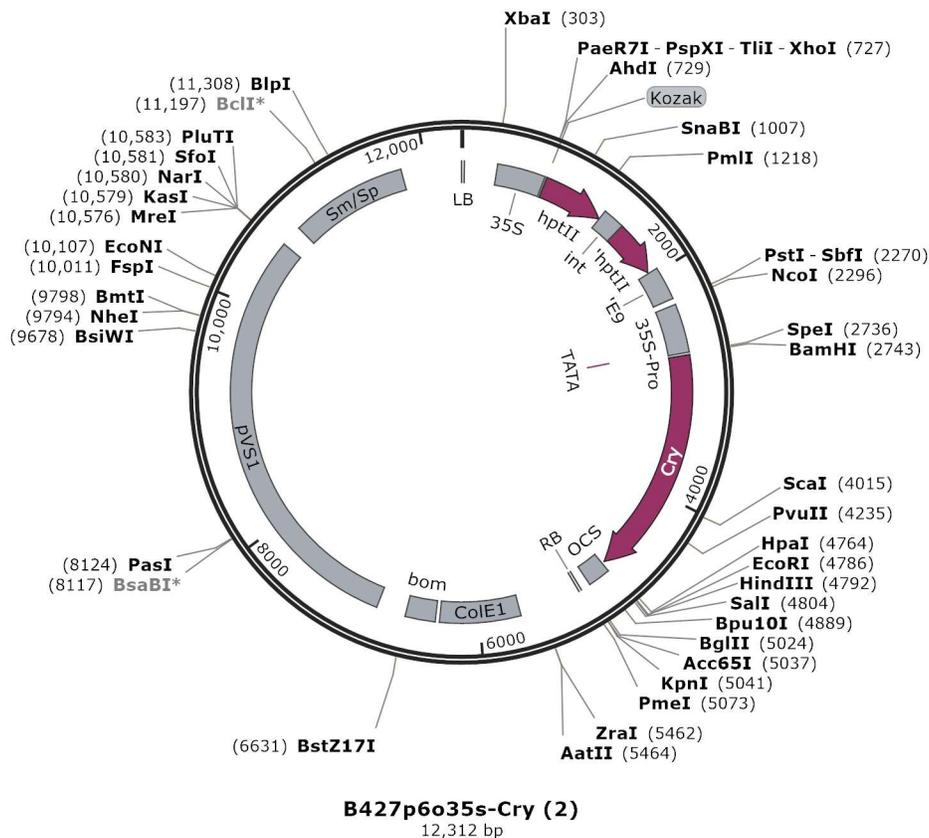


Figura 2. Mapa del vector binario B427p6o35S-Cry, utilizado en transformación genética de segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra mediante *A. tumefaciens* C58 y *A. tumefaciens* GV3101 (*Snap gene*, accedido el 2 de febrero, 2016, desde http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors).

Inducción de embriogénesis somática directa (ESD): los segmentos de hoja de vitroplantas de *C. arabica* L. variedad Caturra se cultivaron en el medio de cultivo para la inducción de embriogénesis somática directa descrito por Sridevi y Ghiridar (2012) (Cuadro 2). Se utilizaron 3 tratamientos complementados con distintas concentraciones de benciladenina (BA): T2 (6,6 μ M), T3 (8,87 μ M) y T4 (11,09 μ M), con una concentración constante de 2,85 μ M de ácido indol acético (AIA) y una concentración constante de nitrato de plata (AgNO_3) (40 μ M). Se utilizaron 2 controles: uno sin reguladores de crecimiento (T0) ni nitrato de plata (AgNO_3) y uno complementado solamente con BA y AIA sin AgNO_3 , (T1) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos para la inducción de embriogénesis somática directa a partir de segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra.

Componentes (1L)	T0 Control	T1	T2	T3	T4
Macroelementos	MS	MS	MS	MS	MS
Microelementos	MS	MS	MS	MS	MS
Vitaminas MS	MS	MS	MS	MS	MS
Hierro (Fe)	MS	MS	MS	MS	MS
Sacarosa (g)	30	30	30	30	30
Agar (g)	8	8	8	8	8
AIA(μ M)	-	2,85	2,85	2,85	2,85
AgNO_3 (μ M)	-	-	40	40	40
BA (μ M)	-	6,6	6,6	8,87	11,09

*Componentes según el medio Murashigue y Skoog (MS) (1962), autoclavado por 20 minutos a una presión de 2.06 kg/cm² y a una temperatura de 121 °C.

Los segmentos de hoja (0,5 cm²) fueron cultivados con la cara adaxial en contacto con 10 ml de medio en cajas petri de 90 mm según los diferentes tratamientos descritos en el cuadro 2. Las placas Petri se colocaron en un cuarto de crecimiento bajo condiciones ambientales controladas, a una temperatura de 25 \pm 1°C, con un fotoperíodo de 16 h diarias, bajo luz blanca. Para la inducción de embriogénesis somática directa, se utilizaron 100 segmentos de hoja por cada tratamiento. Transcurridos 2 meses de cultivo, se evaluó el porcentaje de explantes con embriones somáticos y el número de embriones

por explante a partir de lo cual se determinó el tratamiento de inducción de embriogénesis somática más efectivo. Una vez contabilizados se realizó un análisis histológico del 10 % de los embriones somáticos inducidos en cada tratamiento.

Aclimatación de plantas de *C. arabica* L. variedad Caturra obtenidas a partir del proceso de embriogénesis somática directa (ESD): se tomaron 20 plantas de aproximadamente 11 meses de edad, previamente cultivadas en medio T2 (Cuadro 2) y se trasladaron a tierra previamente autoclavada a 121°C por 21 min en cámara de flujo laminar. Durante la primera semana se mantuvieron en proceso de aclimatación en frascos cubiertos con plástico autoadhesivo en cuarto de crecimiento con condiciones de luz y temperatura controladas (16 horas fotoperíodo y 25 °C±1). Durante la segunda semana luego de haber sido introducidas en tierra, se abrieron huecos pequeños utilizando un palillo de dientes en el plástico cubriendo las plantas y se mantuvieron en el cuarto de crecimiento por una semana. Durante la tercera semana de aclimatación se agrandaron los huecos en el plástico (~0,5 cm) y se mantuvieron en cuarto de crecimiento por una semana más. Durante la cuarta semana de aclimatación, se trasladaron las plantas en frascos cubiertos con plástico y huecos grandes al invernadero. Transcurrida una semana en el invernadero se les retiró el plástico a los frascos, finalizando de esta forma el proceso de aclimatación de las plantas desde condiciones *in vitro* hasta el invernadero.

Análisis histológico: el protocolo histológico de tejido vegetal incluyó: la fijación de la muestra (A), el procesamiento de la muestra (B), la inclusión de tejidos vegetales en parafina (C), el corte de tejidos vegetales (D), tinción de tejidos vegetales (E) y el análisis de la muestra final (F).

(A) Fijación de tejido vegetal: para el procedimiento se utilizaron muestras con un tamaño ideal de 0.5 cm x 2 cm, previamente sumergidas en un volumen de Formaldehído (FAA) (37 ml FAA: 15 ml metanol: 48 ml H₂O) por un período de 24 horas a temperatura ambiente en una proporción de al menos 20 veces el volumen de la muestra.

(B) Procesamiento de la muestra: Los tejidos vegetales se sumergieron en agua destilada a 25°C por 30 min y se calentaron a 67°C empleando un horno microondas.

Posteriormente, se sumergieron en alcohol etílico a concentraciones de 60%, 70 %, 80 %, 90 % y 95 % (v/v) por 60 min en cada concentración, con intervalos de calentamiento hasta llegar a los 67°C entre concentraciones de alcohol. Transcurridos 10 min los tejidos se sumergieron en alcohol etílico al 100 % por 90 min y se calentaron a una temperatura de 67°C por 10 min. Posteriormente, los tejidos vegetales se sumergieron en alcohol etílico de 100 % por 60 min, tras la cual se calentaron a una temperatura de 67°C y se dejaron reposar durante 10 min a temperatura ambiente.

Este último paso se repitió para luego sumergir los tejidos en una solución 1:1 de alcohol etílico 100% y Xilol por 60 min, siendo calentados seguidamente a una temperatura de 67°C por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo los tejidos se sumergieron en Xilol por 60 min siendo llevados después a una temperatura de 67°C. Este paso se repitió una vez más. Los últimos pasos incluyeron la inmersión de los tejidos en una solución 1:1 Xilol y parafina /paraplast por 30-60 min en una estufa a aproximadamente 60°C y finalmente en parafina/paraplast por 30-60 min en estufa a aproximadamente 60°C. Este último paso se repitió una vez más.

(C) Inclusión de tejidos vegetales en parafina/paraplast: primero se colocó la muestra ya procesada, empleando pinzas con la punta previamente calentada, en un molde de inclusión metálico previamente calentado y prellenado con parafina/paraplast. El molde con la muestra se colocó en una superficie con agua a temperatura ambiente y se presionó la muestra contra el fondo del molde acomodándola de forma tal que las estructuras del corte quedaran en la disposición espacial correcta. El cassette se colocó encima del molde y se rellenó con parafina/paraplast, después de lo cual se colocó en el congelador (-20°C) por 10 minutos para separar el bloque de parafina/paraplast del molde metálico y quitar los excesos de parafina/paraplast de los bordes del mismo.

(D) Corte de tejidos vegetales: se cortaron las muestras con un micrótopo de marca SHURcut 2500, a un grosor de entre 4 µm a 7 µm. Posterior a esto, se colocaron las muestras en un baño de flotación y se recogieron con un portaobjetos, el cual se colocó a una temperatura entre 45-60°C por un período de 45- 60 min.

(E) Tinción de tejidos vegetales: se eliminó la parafina a las muestras y luego se colocaron en una solución de safranina. Posteriormente se llevaron a una temperatura aproximada de 67°C en microondas. Se dejaron enfriar durante 15 minutos y el procedimiento se repitió dos o tres veces más. Posterior a esto, las muestras se lavaron con agua hasta quitar el exceso de colorante por 1 min y se colocaron en la solución de Safranina 0.15% (v/v) por 5 min.

(F) Análisis de los cortes: Finalmente, se observaron las muestras al microscopio y se tomaron microfotografías de los cortes con un microscopio confocal *Olympus* (García del Moral, 1993).

Protocolo general para la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303.

Para realizar la introducción de genes mediada por *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303, primero se cultivó la bacteria en tubos de ensayo con 5 mL de medio Luria Bertani (LB) (5g^L⁻¹ cloruro de sodio, 5g^L⁻¹ extracto de levadura, 10 g^L⁻¹ peptona de caseína, pH de 7,2), complementado con 100 mg^L⁻¹ de rifampicina y 50 mg^L⁻¹ de kanamicina por un período de 48 horas, a 28 °C y con una agitación constante de 100 rpm. Transcurridas 48 h, el cultivo de *A. tumefaciens* se llevó a un volumen de 50 mL de medio LB complementado con 100 mg^L⁻¹ de rifampicina, 50 mg^L⁻¹ de kanamicina y 20 µM de acetosiringona por 48 h en las mismas condiciones de temperatura y agitación mencionadas anteriormente.

Después de 48 h, se centrifugó el cultivo de *A. tumefaciens* a 3500 rpm durante 20 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet de la bacteria se resuspendió a una proporción de 1:10, en el medio de co-cultivo líquido descrito por Sridevi y Ghiridar (2012), el cual está compuesto por macroelementos, microelementos, vitaminas, AIA, BAP y AgNO₃ (T2, Cuadro 2), 30 mg^L⁻¹ de sacarosa complementado con 200 µM de acetosiringona y un pH de 5.6. Se determinó la densidad óptica de la bacteria (DO₆₀₀) utilizando el nanofotómetro IMPLEN, la cual estuvo entre un rango de 0,5-1,0.

Los segmentos de hojas (0.5 cm²) fueron cultivados en el medio de co-cultivo líquido descrito anteriormente con la bacteria *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA1303 y se sometieron a condiciones de vacío (600mg Hg) por 30 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se colocaron en un agitador a una velocidad de 90 rpm por 30 min. Pasado este lapso de tiempo, los segmentos de hoja fueron cultivados en el medio semi-sólido de co-cultivo MS complementado con acetosiringona (200 µM) (T2, Cuadro 2) y se mantuvieron en oscuridad por 48 h a una temperatura a 25°C ±1.

Transcurridas 48 h, a los segmentos de hoja se les realizaron 3 lavados con agua destilada estéril por lapsos de 15 min cada uno, seguidos de un lavado por 30 min con agua destilada estéril complementada con 250 mgL⁻¹ cefotaxima. Finalmente, los segmentos de hoja se cultivaron en el medio T2 sólido complementado con AIA, BAP, AgNO₃ (Cuadro 2) y 250 mgL⁻¹ cefotaxima para eliminar la bacteria. Transcurridas 48 horas se tomó una muestra de los segmentos transformados y se comprobó la expresión transitoria del gen reportero *uidA* (β-glucoronidasa) mediante el ensayo GUS descrito por Jefferson et al. (1986).

Optimización del protocolo de transformación genética con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303: con el fin de optimizar las condiciones de introducción de genes mediante *A. tumefaciens* ATHV, se evaluaron diferentes factores: concentración de la bacteria (DO₆₀₀: 0.5, 0.75 y 1.0), temperatura (25°C y 28°C) y tiempo de co-cultivo (48 y 72 h). Para la estandarización del protocolo de transformación se realizaron 3 repeticiones de 15 segmentos de hoja por cada tratamiento de densidad óptica, temperatura y tiempo de co-cultivo. Se comprobó la expresión transitoria del gen reportero *uidA* (β-glucoronidasa) mediante el ensayo GUS (Jefferson et al., 1986), el cual se le realizó al 100% de los explantes 48 h después de la transformación. Se contabilizó el número de explantes con coloración azul por tratamiento para determinar la temperatura, tiempo de co-cultivo y temperatura de co-cultivo óptimos para la introducción de genes mediante *A. tumefaciens* ATHV: pCAMBIA1303. Además se

realizaron 2 transformaciones genéticas de prueba con las condiciones de transformación óptimas utilizando 15 segmentos de hoja transformados y 5 segmentos de hoja sin transformar como control en cada una.

Transformación de *Escherichia coli* y *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido B427 que contienen el gen *cry10Aa*.

Cepas de *E. coli* y *A. tumefaciens*: Se utilizó la cepa *E. coli* Dh5 α (con resistencia a 50 mgL⁻¹ de kanamicina) y las cepas de *A. tumefaciens* C58 (sin resistencia a antibióticos), ATHV (con resistencia a 50 mgL⁻¹ de rifampicina) y GV3101 (con resistencia a 50 mgL⁻¹ de rifampicina, 50 mgL⁻¹ de gentamicina y 100 mgL⁻¹ de ampicilina).

Preparación de células competentes de *E. coli* Dh5 α : Se tomó una colonia de *E. coli* Dh5 α utilizando una punta estéril para pipeta de 1-10 μ l y se cultivó en 5 ml de medio LB líquido con 50 mgL⁻¹ de kanamicina en agitación constante (110 rpm) a 37°C por 24 horas. Posteriormente, se distribuyeron los 5 ml de suspensión bacteriana en tubos estériles de 1.5 ml para ser centrifugados a 13000 rpm por dos minutos. Se descartó el sobrenadante y el pellet de bacterias se resuspendió en 10 ml de 20 mM de CaCl₂ frío y se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 2500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de 20 mM de CaCl₂ frío. Finalmente, se alicuotaron 100 μ l de células competentes los cuales fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Transformación genética con el gen *cry10Aa* en *E. coli* Dh5 α : para la transformación de las cepas de *E. coli* Dh5 α con el plásmido B427, primero se descongelaron las células competentes de *E. coli* lentamente en hielo. Se agregó 1 μ g de ADN plasmídico y se mezcló. Las muestras se incubaron durante 30 min en hielo y posteriormente 15 min en Nitrógeno líquido. Después se incubaron durante 5 min a 42°C en un baño María después de lo cual se les agregó 150 μ L de medio LB sin antibióticos. Pasado dicho tiempo se incubaron durante 2 horas en agitación constante a una temperatura de 26°C \pm 2. Posteriormente los cultivos de bacterias se transfirieron en medio LB sólido complementado con sus respectivos antibióticos y las placas Petri se incubaron a 37°C durante 24 horas. Para la obtención del ADN del plásmido B427 proveniente de *E. coli*,

se utilizó el Viogene Mini Plus™ Plasmid DNA Extraction System siguiendo las instrucciones del fabricante.

Preparación de células competentes de *A. tumefaciens*: para la obtención de las células competentes, se tomó una colonia de *A. tumefaciens* de cada cepa (C58, ATHV y GV3101) utilizando una punta estéril para pipeta de 1-10 µl y se cultivó en 5 ml de medio LB líquido con sus respectivos antibióticos en agitación constante (220 rpm) a 28°C por 48 horas. Posteriormente, los 5 ml de suspensión bacteriana se cultivaron en 50 ml de LB líquido con el respectivo antibiótico en las mismas condiciones anteriormente descritas. La suspensión bacteriana se colocó en un tubo Falcon de 50 ml y se centrifugó a 2500 rpm por 20 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet de bacterias se resuspendió en 10 ml de 20 mM de CaCl₂ frío y se centrifugó a 4°C por 20 minutos a 2500 rpm. Se descartó el sobrenadante y el pellet se resuspendió en 1 ml de 20 mM de CaCl₂ frío. Finalmente, se alicuotaron 100 µl de células competentes los cuales fueron almacenados a -20°C hasta su uso.

Introducción del ADN plasmídico B427 proveniente de *E. coli* Dh5α a *A. tumefaciens* cepas C58, ATHV y GV3101: para la transformación del ADN plasmídico B427 en las cepas de *A. tumefaciens* con el plásmido B427, primero se descongelaron las células competentes de *A. tumefaciens* lentamente en hielo. Se agregó 1 µg de ADN proveniente de *E. coli* Dh5α:B427 y se mezcló hasta homogenizar. Las muestras se incubaron durante 30 min en hielo y posteriormente 15 min en Nitrógeno líquido. Después se incubaron durante 5 min a 37°C en un baño María después de lo cual se les agregó 150 µL de medio LB sin antibióticos. Pasado dicho tiempo se incubaron durante 2 horas en agitación constante a una temperatura de 26°C±2. Posteriormente los cultivos de bacterias se platearon en medio LB sólido complementado con sus respectivos antibióticos y las placas Petri se incubaron a 28°C durante 2 días.

Comprobación mediante técnicas moleculares la presencia del gen de interés (*cry10Aa*) en las bacterias *E. coli* Dh5 α y *Agrobacterium tumefaciens* cepas ATHV, C58 y GV3101: se midió la concentración con un nanofotómetro Implen de ADN extraído de *E. coli*: B427 y *A. tumefaciens* cepas ATHV, C58 y GV3101 previamente transformadas con el plásmido B427. A partir de la relación 260/280 se logró determinar la calidad de ADN. Posteriormente para determinar la presencia del gen *cry10Aa* en *E. coli* Dh5 α se realizó digestión del ADN plasmídico con las enzimas XbaI/BamHI y se realizó un PCR para comprobar la presencia del gen *hptII*. Asimismo para determinar la presencia del gen *cry10Aa* en *A. tumefaciens* cepas ATHV, C58 y GV3101 previamente transformadas con el plásmido B427 se realizó una digestión con las enzimas de restricción EcoRI/BamHI y finalmente se realizó un PCR para comprobar la presencia del gen *hptII*.

Introducción del gen *cry10Aa* de *Bt* en el genoma de café, v ariedad Caturra: una vez optimizado el protocolo de transformación genética e introducido el plásmido B427 en *A. tumefaciens* cepas C58 y GV3101 se procedió a realizar las transformaciones genéticas de los segmentos de hoja. Se realizaron 2 experimentos, la primera con *A. tumefaciens* C58:B427 (500 segmentos de hoja) y la segunda con *A. tumefaciens* GV3101:B427 (400 segmentos de hoja). Los segmentos de hoja fueron posteriormente cultivados por 2 semanas en un medio T2 complementado con macroelementos, microelementos, vitaminas y concentraciones de AIA, BA y AgNO₃ descritas anteriormente en el Cuadro 2, complementado con 500 mgL⁻¹ cefotaxima para la eliminación de la bacteria. En las siguientes 2 semanas se pasaron los segmentos a medio T2 complementado con 250 mgL⁻¹ cefotaxima y 12.5 mgL⁻¹ higromicina. Transcurridas 2 semanas se pasaron los segmentos de hoja a medio T2 complementado solamente con 25 mgL⁻¹ higromicina en el cual permanecieron 2 semanas y finalmente se trasladaron a medio T2 para inducción de embriogénesis somática directa sin antibióticos. Del total de segmentos co-cultivados se tomaron 22 segmentos de hoja (2 sin transformar, 10 co-cultivados con C58:B427 y 10 co-cultivados con GV3101:B427) para la extracción de ADN y comprobación de la presencia del gen *cry10Aa*.

Protocolo de extracción de ADN: para la extracción de ADN de segmentos de hoja se precalentó primero el buffer de extracción a 65°C. Una vez disuelto se agregaron 50 mg de material vegetal en un tubo de 2 ml. Se agregaron 750µL de buffer de extracción y mezcló la solución mediante vortex. Se incubó la muestra a 65°C por 20 min mientras que se incubaba la ARNasa por 10 min a 99°C, la cual se colocó en hielo una vez terminado dicho tiempo. Transcurridos los 20 min de incubación de la muestra se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 750 µL de cloroformo:octanol (24:1) en cámara de extracción de gases. Se homogenizó la muestra sin utilizar vortex y se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 µL de etanol 70% v/v frío. Se centrifugó la muestra por 5 min a 13000 rpm y se eliminó el etanol de la muestra mediante una micropipeta y secando el pellet durante 20-30 min a 40-45°C. Se resuspendió el pellet en 50 µL de TE 1X y se agregó solución de ARNasa 10mg/ mL. Finalmente se determinó la concentración de ADN mediante un nanofotómetro marca IMPLEN y se analizó un gel de agarosa 1 % m/v por 30 min a 100 V.

Confirmación de la integración del gen *cry10Aa* en el genoma del café

PCR para comprobación del gen *cry10Aa*: se realizó una extracción de ADN a 2 de los segmentos de hoja no transformados (control negativo), 10 segmentos fueron co-cultivados con *A. tumefaciens* C58:B427 y 10 segmentos que fueron co-cultivados con *A. tumefaciens* GV3101:B427. Se comprobó la presencia del gen de interés *cry10Aa* mediante PCR, utilizando 3 pares de primers (cuadro 3) y un termociclador Biometra.

Cuadro 3. Pares de primers utilizados para comprobar la presencia del gen *cry10Aa* en segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra transformados mediante *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427.

Juegos de primers <i>cry10Aa</i> (Tamaño esperado de ~500 pb)	Primers
Par 1	F 3' AAACCAGCCGTTGAAGAACA 5' R 5' ACAGGATTCCAACCTTGCCT 3'
Par 2	F 3'TTGAAGCATGCCGCTACTTA5' R 5' TTTTACCCACACTAACGACGA 3'
Par 3	F 3' AACTACAAGAGAACCGATTCATACA 5' R 5' TGTTACTTTCCACGTACCGT 3'

Utilizando la composición de la reacción de PCR y el programa del termociclador mostrados en los cuadros 4 y 5 respectivamente. En el caso de la temperatura de *annealing* óptima para los primers correspondientes al gen de interés *cry10Aa* se determinó mediante un gradiente de temperatura (52°C-62°C) utilizando ADN extraído del plásmido B427.

Cuadro 4. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen *cry10Aa*.

Componente	Conc. Inicial	Conc. Final	1X (µl)
H2O	--	--	12.55
Buffer 10X +(NH4)2SO4	10X	1X	2.0
MgCl2	25 mM	1.5 mM	1.2
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.4
Primer forward	20µM	0.4 µM	0.4
Primer reverse	20µM	0.4 µM	0.4
BSA	10mg/ml	--	0.8
Taq Polimerasa	5U/µl	0.05 U	0.25
ADN	--	--	2
Volumen final			20

Cuadro 5. Programa de PCR para la estandarización de la temperatura de *annealing* óptima para los primers correspondientes al gen de interés *cry10Aa*.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	1 min
Annealing	52°C,54°C,56 °C,58°C,60°C, 62°C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	10 min

} 35 ciclos

PCR para comprobación del gen *hptII*: para comprobar la presencia del gen *hptII* (producto aproximado de ~500 pb), se extrajo el ADN de 20 segmentos de hoja y se les realizó un PCR utilizando los primers: *hptII*_ Forward 5'-ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGA3' y *hptII*_Reverse: 5'TCCATCACAGTTTGCCAGTGATACA-3'

Se utilizó la composición de reacción de PCR y el programa de termociclador mostrados en los cuadros 6 y 7, respectivamente. Los productos de ambos PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % (TBE 1X + 1.5 µl de GelRed), el cual se corrió a 100 V por 1 hora. Se utilizaron agua y ADN de segmentos de hoja no transformados como controles negativos y ADN del plásmido B427 original (Figura 1) como control positivo.

Cuadro 6. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen *hptII*.

Componente	Conc. Inicial	Conc. final	1X (µl)
H2O	--	--	12.55
Buffer 10X +(NH4)2SO4	10X	1X	2.0
MgCl2	25 mM	1.5 mM	1.2
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.4
Primer forward	20µM	0.4 µM	0.4
Primer reverse	20µM	0.4 µM	0.4
BSA	10mg/ml	--	0.8
Taq Polimerasa	5U/µl	0.05 U	0.25
ADN	--	--	2
Volumen final			20

Cuadro 7. Programa de PCR para la amplificación del gen *hptII*.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	1 min
Annealing	60 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	10 In

} 35 ciclos

PCR gen *virG*. Para comprobar la presencia del gen *virG* (producto aproximado de ~400 pb), se extrajo el ADN de 20 segmentos de hoja y se les realizó un PCR con los primers *virG*_Forward: 5'-GCCGACAGCACCCAGTTCAC-3' y *virG*_Reverse: 5'-CCTGCCGTAAGTTTCACCTCAC-3'. Se utilizó la composición de reacción de PCR y el programa de termociclador mostrados en los cuadros 8 y 9, respectivamente. Los productos de ambos PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % (TBE 1X + 1.5 µl de GelRed), el cual se corrió a 100 V por 1 hora. Se utilizaron agua y ADN de segmentos de hoja no transformados como controles negativos y ADN del plásmido B427 original (Figura 1) como control positivo.

Cuadro 8. Composición de la reacción de PCR para la amplificación del gen *virG*.

Componente	Conc. Inicial	Conc. final	1X (µl)
H2O	--	--	12.55
Buffer 10X +(NH4)2SO4	10X	1X	2.0
MgCl2	25 mM	1.5 mM	1.2
dNTPs	10 mM	0.2 mM	0.4
Primer forward	20µM	0.4 µM	0.4
Primer reverse	20µM	0.4 µM	0.4
BSA	10mg/ml	--	0.8
Taq Polimerasa	5U/µl	0.05 U	0.25
ADN	--	--	2
Volumen final			20

Cuadro 9. Programa de PCR para la amplificación del gen *virG*.

Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial	94 °C	5 min
Desnaturalización	94 °C	1 min
Annealing	60 °C	1 min
Extensión	72 °C	1 min
Extensión final	72 °C	10 min

} 35 ciclos

Análisis estadístico: para el análisis estadístico de los datos, se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para todos los tratamientos y una prueba comparativa de Duncan para determinar si existían diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos. Primero se determinó si existían diferencias significativas entre los diferentes medios de inducción de ESD (Cuadro 2), utilizando como variable dependiente los medios T0, T1, T2, T3 y T4 y como variable independiente el promedio de número de embriones producido por explante por tratamiento ($\pm E.S$). Para determinar si existían diferencias significativas entre las densidades ópticas (DO_{600}) de bacteria para transformar genéticamente se usó como variable dependiente las densidades ópticas de 0, 0.25, 0.5, 0.75 y 1.0 y como variable independiente el número de explantes ($\pm E.S$) por tratamiento.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las temperaturas y tiempos de co-cultivo óptimos para la transformación genética se utilizaron como variable dependiente los tratamientos: 25°C-2días co-cultivo, 25°C-4días co-cultivo, 28°C-2días co-cultivo y 28°C-4días co-cultivo, y como variable independiente el número de explantes con expresión transitoria del gen *uidA* ($\pm E.S$) por tratamiento. Los análisis se realizaron mediante el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al., 2011). Para determinar la eficiencia de transformación se tomaron en cuenta los segmentos de hoja que presentaron el gen *cry10Aa*. Para calcular la eficiencia de transformación se utilizó una distribución binomial 3δ con 99% de confianza según la siguiente fórmula:

$$p \pm 3 \left(\sqrt{p \left(1 - \frac{p}{n} \right)} \right)$$

En dicha fórmula, p correspondió a la proporción de segmentos transformados, x el número de segmentos transformados y n el número de segmentos co-cultivados (Ribas et al., 2011).

Resultados

Inducción de embriogénesis somática directa (ESD) utilizando nitrato de plata (AgNO₃) en segmentos de hoja de *C. arabica*, variedad Caturra

Los resultados obtenidos evidencian que el proceso de inducción de embriogénesis somática directa a partir de los segmentos de hoja de café es influenciado por la utilización de reguladores de crecimiento (AIA, BAP) y AgNO₃. En las condiciones experimentales de esta investigación, el tratamiento control desprovisto de reguladores (T0) y el tratamiento suplementado sólo con 2.85 uM AIA y 6.6 uM BAP (T1) no indujeron la formación de embriones ($p > 0.05$). Pero, la adición de 40 uM AgNO₃ en los medios de los tratamientos T2, T3 y T4 cultivo potencia la formación de los embriones somáticos en los segmentos de café ($p < 0.05$).

Ahora bien, la mayor cantidad de embriones se obtuvo al utilizar el medio de cultivo MS suplementado con 2.85 uM AIA, 6.6 uM BAP y 40 uM de AgNO₃ (T2) ($p < 0.05$). Pero, al utilizar una mayor concentración de BAP se evidencia una menor inducción de embriones con los tratamientos a los que se agregó 8,87 uM y 11,89 uM de BAP respectivamente ($p < 0.05$) (Cuadro 10).

Cuadro 10. Número de embriones por explante con su respectivo error estándar, obtenido para cada tratamiento para la variedad Caturra (InfoStat, 2011).

Tratamiento	AIA (µM)	BA (µM)	AgNO ₃ (µM)	Promedio embriones/explante ± ES	Porcentaje de explantes con embriones por tratamiento (%)	Prueba Duncan
T 0 (Control sin reguladores)	-	-	-	0±0	0	A
T 1 (Control sin AgNO ₃)	2,85	6,6	-	0±0	0	A
T2	2,85	6,6	40	3,30± 0,73	53	C
T3	2,85	8,87	40	2,26± 0,38	46	B
T4	2,85	11,09	40	2,41± 0,31	46	B

El proceso de embriogénesis somática directa (ESD) se empezó a observar a partir de las 8 semanas de haberse colocado los explantes en los medios T2, T3 y T4. En ambos controles T0 y T1 no se observó la formación de embriones somáticos en los segmentos de hoja, mostrándose estos últimos en estado de oxidación al final del experimento (Figura 3 B y D). Mientras que en los medios T2, T3 y T4 se encontraron embriones de los 4 diferentes estados de desarrollo (globular, torpedo, corazón y cotiledonar), coexistiendo varios estados de desarrollo simultáneamente en un mismo segmento de hoja (Figura 3 F, H, J).



Figura 3. Proceso de embriogénesis somática directa en segmentos de hoja de *C. arabica* variedad Caturra a las 8 semanas de haber sido cultivados en los respectivos medios de cultivo (Cuadro 2). T0 (Control sin reguladores) al inicio del experimento (A), T0 (Control sin reguladores) al final del experimento (B), T1 (Control sin AgNO_3) al inicio del experimento (C), T1 (Control sin AgNO_3) al final del experimento (D), T2 al inicio del experimento (E), T2 al final del experimento (F), T3 al inicio del experimento (G), T3 al final del experimento (H), T4 al inicio del experimento (I), T4 al final del experimento (J). Embriones señalados con flecha roja.

Los embriones somáticos de *C. arabica* variedad Caturra tuvieron diferentes estados de desarrollo después 5 meses. En el estado globular se puede observar cómo se empiezan a formar los sistemas vasculares, en el estado corazón se puede distinguir el sistema vascular más desarrollado (Figura 4 C,D), en el estado torpedo se puede observar el embrión con su forma más alargada (Figura 4 F) y en el estado cotiledonar se puede observar la aparición de los cotiledones (Figura 4 E, G y H). El tiempo estimado desde el inicio de la embriogénesis somática directa hasta la aclimatación fue de

aproximadamente 13 meses (Figura 5), correspondiendo esta última a 5 semanas obteniendo 100% de aclimatación de las plantas (Figura 6).

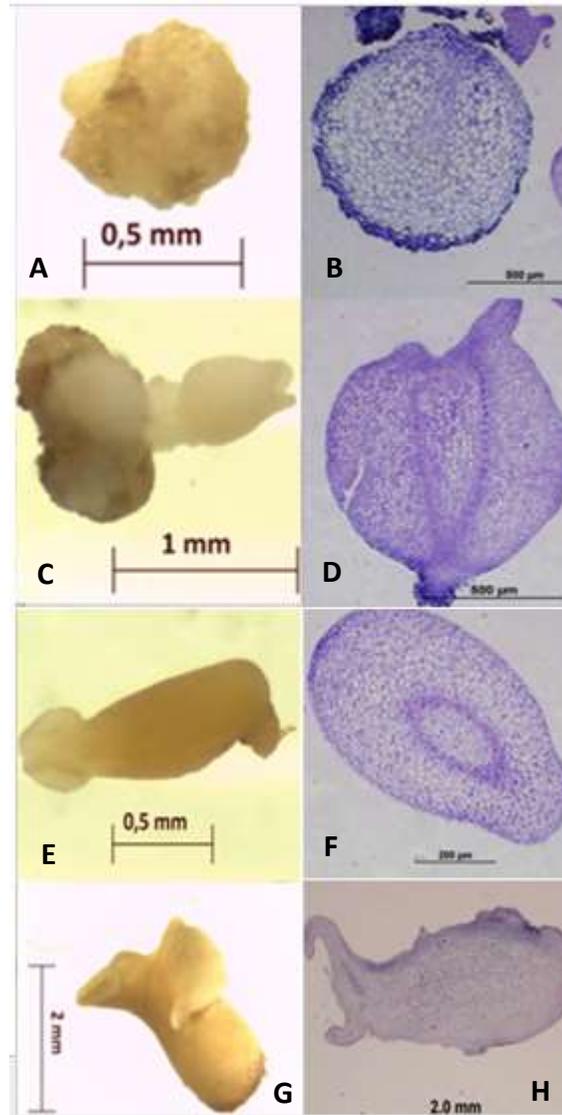


Figura 4. Diferentes estados de desarrollo de los embriones somáticos de *C. arabica* variedad Caturra los 5 meses de haber cultivado los segmentos de hoja en el tratamiento 2 Fotos tomadas con estereocámara. Estado globular (A), Estado corazón (C) y estado cotiledonar (E, G). Cortes histológicos de embriones en diferentes estados embrionarios de *C. arabica* variedad Caturra, tomadas con microscopio confocal con cámara fusionada. Estado globular (B), estado corazón (D), estado torpedo (F) y estado cotiledonar (H).



Figura 5. Línea de tiempo del proceso de embriogénesis somática directa de segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra desde su introducción en medio T2 (Cuadro 2) hasta su aclimatación en invernadero 13 meses después.

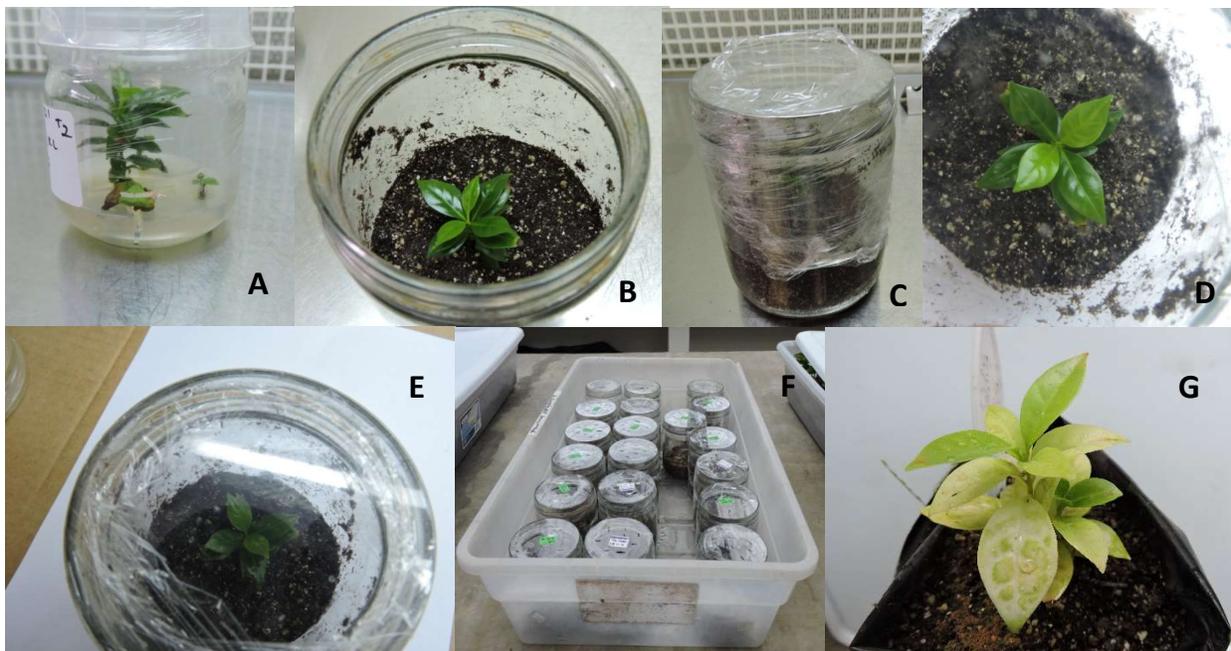


Figura 6. Proceso de aclimatación de una planta de *C. arabica* L. variedad Caturra de 11 meses. Planta en medio T2 (A). Paso a tierra autoclavada en cámara de flujo laminar (B). Primera semana en proceso de aclimatación con plástico en cuarto de crecimiento (C). Segunda semana de aclimatación con huecos pequeños huecos hechos con palillo de dientes en cuarto de crecimiento (D). Tercera semana de aclimatación con huecos de ~0,5 cm más grandes en cuarto de crecimiento (E). Cuarta semana de aclimatación con huecos grandes en invernadero (F). Quinta semana de aclimatación sin plástico en invernadero (G).

Estandarización de los factores (densidad óptica (DO₆₀₀) de la bacteria, temperatura y tiempo de co-cultivo) para la introducción de genes de interés en el genoma de café utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303.

Estandarización de la densidad óptica (DO₆₀₀) de la bacteria: se observó que los explantes co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 con las densidades ópticas de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 tuvieron resultados positivos ante la prueba GUS (presencia de coloración azul) (Figura 7 B, C, D y E), exceptuando el control negativo (Figura 7A). En cuanto a la estandarización de la densidad óptica (DO₆₀₀) de bacteria óptima, se obtuvo un mayor promedio de transformación de explantes utilizando una DO₆₀₀ de 0.75 (0.75 ± 0.04), seguida por la DO₆₀₀ de 1.0 (0.72 ± 0.06), la DO₆₀₀ de 0.5 (0.46 ± 0.04), la DO₆₀₀ de 0.25 (0.46 ± 0.07) y el control negativo (0.00 ± 0.00) (Cuadro 11).

Se determinó que existían diferencias significativas (p<0.05) entre el promedio de explantes con expresión transitoria del gen *uidA* utilizando las densidades ópticas (DO₆₀₀) de 0.25, 0.50, 0.75, 1.0 y el control (DO₆₀₀=0) (Cuadro 11). No se encontraron diferencias significativas entre las densidades ópticas (DO₆₀₀) de 0.25 y 0.50, ni tampoco entre las densidades ópticas de 0.75 y 1.0. Al obtenerse una mayor tasa de segmentos de hoja mediante la DO₆₀₀ entre un rango de 0.75 a 1.0 se determinó que la densidad óptima para la expresión transitoria del gen *uidA* se encontraba entre dicho rango.

Cuadro 11. Promedio de segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra, co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 a densidades ópticas (DO₆₀₀) de 0.0 (control sin transformar), 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 con sus respectivos errores estándar (InfoStat, 2011).

Densidad óptica (DO ₆₀₀)	Promedio explantes transformados ± ES	Porcentaje de explantes transformados por tratamiento (%)	Prueba de Duncan
0.0	0 ± 0.04	0	C
0.25	0.46 ± 0.07	40	B
0.50	0.46 ± 0.04	46	B
0.75	0.72 ± 0.06	75	A
1.0	0.75 ± 0.04	72	A

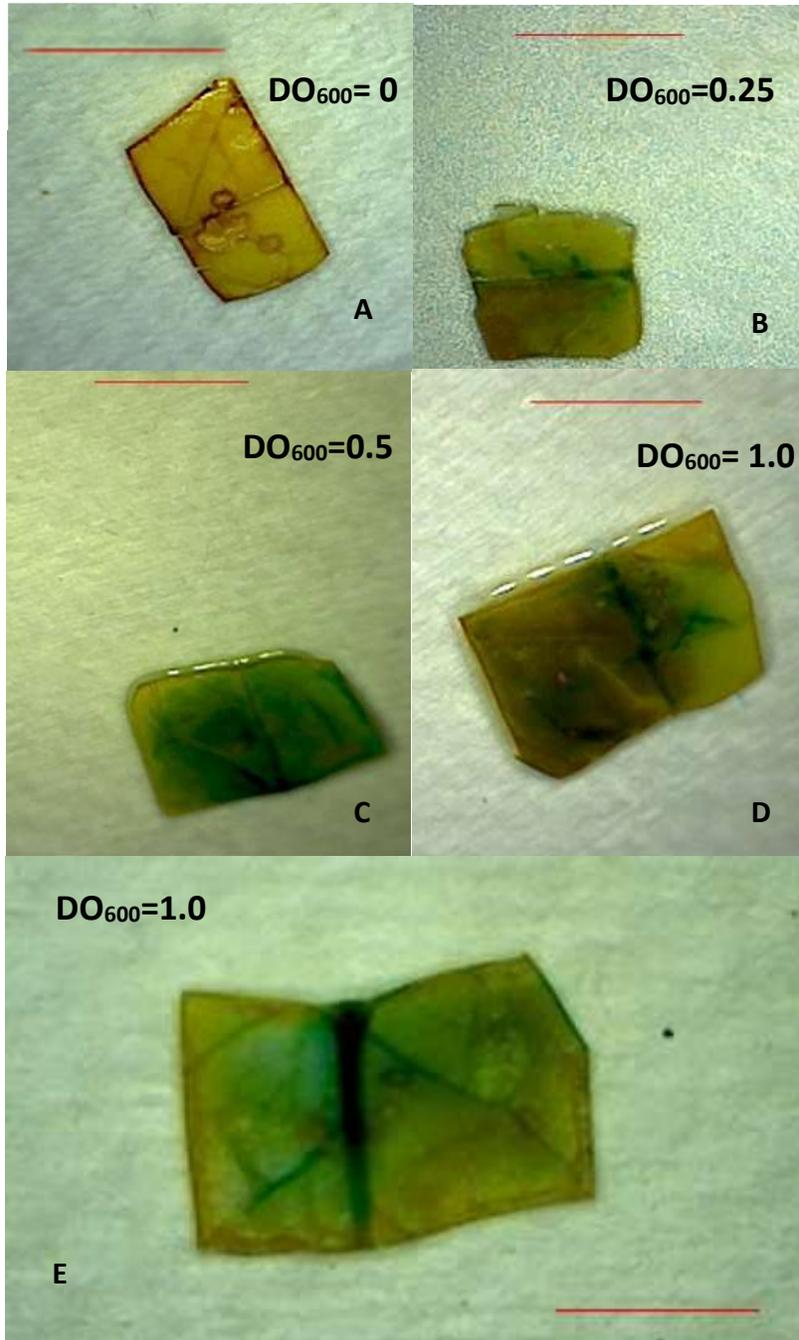


Figura 7. Expresión transitoria del gen *uidA* en segmentos de hoja de café co-cultivados con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 a densidades ópticas (DO₆₀₀) de bacteria de 0, 0.25, 0.50 y 0.75. Control DO₆₀₀: 0.00(A), DO₆₀₀: 0.25 (B), DO₆₀₀: 0.50 (C), DO₆₀₀: 0.75 (D) y DO₆₀₀:1.0 (E). Medición a través de la expresión transitoria del gen *uidA*. Escala equivalente a 5 mm.

Estandarización de la temperatura y tiempo de co-cultivo en la expresión transitoria del gen *uidA* utilizando *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303: se observó que los explantes cultivados con las temperaturas y tiempos de co-cultivo de 25 ° C por 2 días, 25 ° C por 4 días, 28° C por 2 días, 28° C por 4 días (Figura 8 A, B, C y D) tuvieron resultados positivos en la prueba GUS (presencia de coloración azul) con respecto al control (Figura 8E). Se determinó que no existían diferencias significativas ($p>0.05$) entre el promedio de explantes co-cultivados a temperatura de 25 ° C por 2 días (0.34 ± 0.07), 25 ° C por 4 días (0.38 ± 0.07) y el tratamiento 28 ° C por 2 días (0.38 ± 0.07). Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos anteriores y el tratamiento de 28° C por 4 días (0.82 ± 0.07 , $p<0.05$) con el cual se obtuvo una mayor cantidad de explantes con expresión transitoria del gen *uidA*. Sin embargo en este último se observó contaminación por *A. tumefaciens* dada la alta densidad óptica de bacteria utilizada, por lo que se determinó que 25-28 ° C por 2 días era el mejor tratamiento a utilizar (Cuadro 13).

Cuadro 12. Promedio de segmentos de hoja variedad Caturra, co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV:: pCAMBIA 1303 a temperaturas y tiempos de co-cultivo de 25 ° C por 2 días, 25 ° C por 4 días, 28° C por 2 días, 28° C por 4 días, además de un control sin transformar con sus respectivos errores estándar (InfoStat, 2011).

Tiempo/temperatura co-cultivo	Promedio explantes transformados \pm ES	Porcentaje de explantes contaminados (%)	Porcentaje de explantes transformados por tratamiento (%)	Prueba de Duncan
25 ° C-2 días	(0.34 ± 0.07)	0	42	A
25 ° C- 4 días	(0.38 ± 0.07)	2	38	A
28 ° C-2 días	(0.38 ± 0.07)	0	42	A
28° C- 4 días	(0.82 ± 0.07)	46	91	B

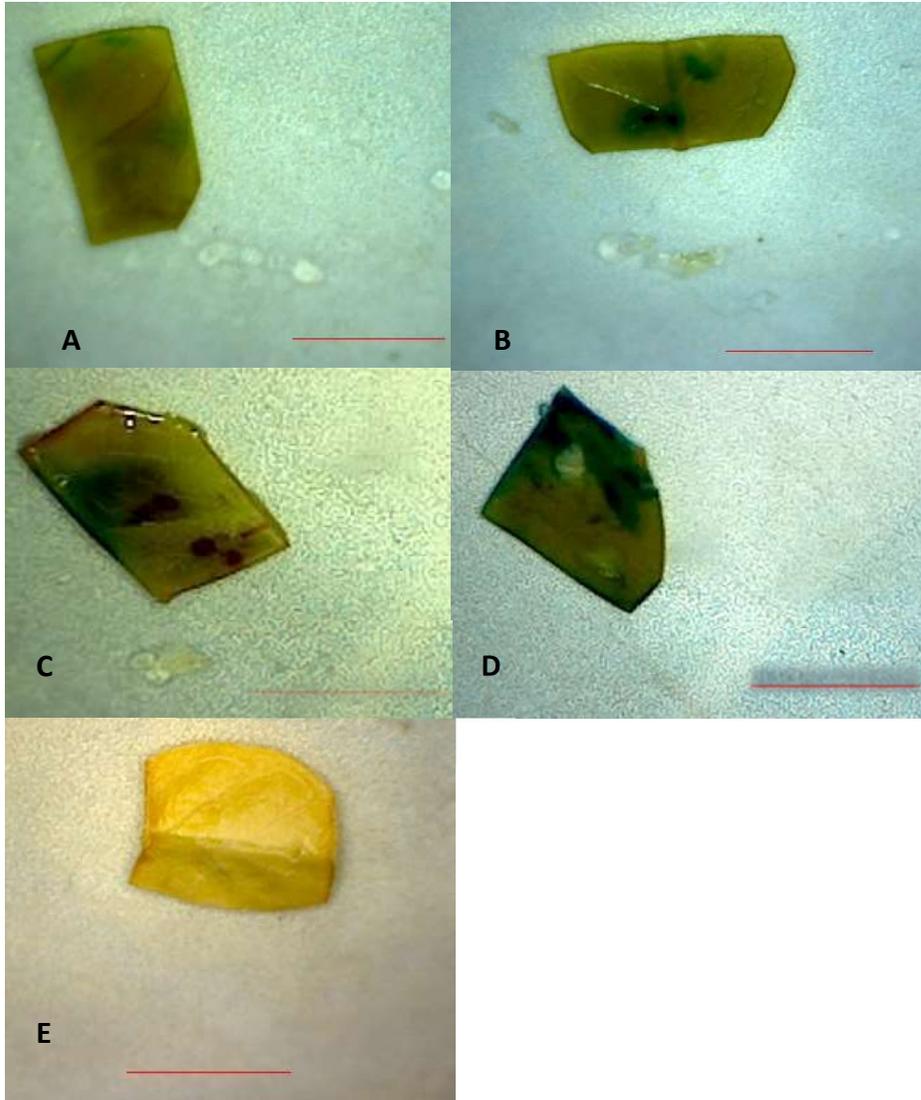


Figura 8. Transformación mediante *A. tumefaciens* ATHV:: pCAMBIA 1303 en segmentos de hoja de la variedad Caturra a temperaturas y tiempos de co-cultivo de 25 ° C por 2 días (A), 25 ° C por 4 días (B), 28° C por 2 días (C), 28° C por 4 días (D) Control sin transformar (E). Escala equivalente a 5 mm.

Cuadro 13. Condiciones óptimas para la introducción de genes de interés en el genoma de café utilizando *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303.

Densidad óptica (DO ₆₀₀)	Tiempo de co-cultivo	Temperatura de co-cultivo (°C)
0.75-1.0	2 días	25-28°C

Utilizando las condiciones óptimas determinadas anteriormente (Cuadro 13) se realizaron 2 experimentos de prueba utilizando el plásmido pCAMBIA1303. Para el primer experimento se obtuvo un 80 % de explantes transformados con una densidad óptica (D.O₆₀₀) de *A. tumefaciens*: ATHV de 0,866 (Figura 9) y se obtuvo un 91.6% de explantes con expresión transitoria del gen *uidA* con una densidad óptica (D.O₆₀₀) de *A. tumefaciens*: ATHV de 0,762 (Figura10).

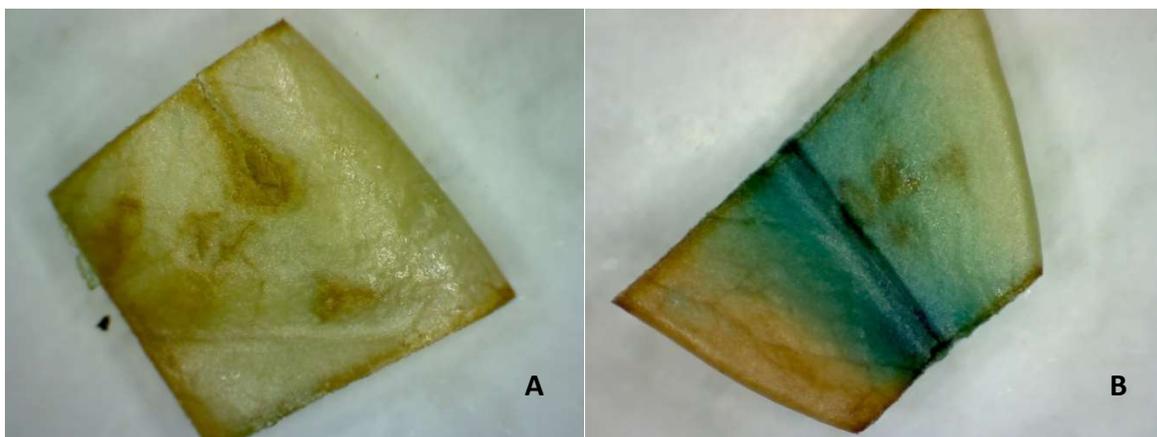


Figura 9. Transformación de prueba con *A. tumefaciens* ATHV (D.O₆₀₀ = 0,866) en segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra. (A) Control negativo (B) Explante con expresión del gen *uidA* comprobado mediante prueba GUS (coloración azul).

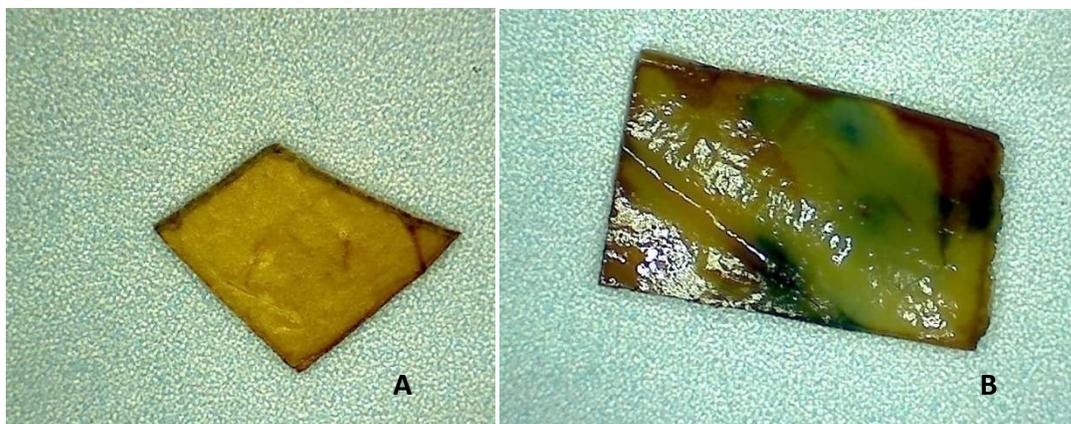


Figura 10. Transformación de prueba (2) mediante *A. tumefaciens* ATHV (D.O₆₀₀ =0762) en segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra. (A) Control, (B) Explante transformado con presencia del gen *uidA* comprobado mediante prueba GUS (coloración azul).

Comprobación de la presencia del gen de interés (*cry10Aa*) mediante técnicas moleculares en las bacterias *E. coli* Dh5 α y *Agrobacterium tumefaciens* cepas ATHV, C58 y GV3101.

Se obtuvieron 4 colonias (P1C1, P1C2, P1C3 y P1C4) transformadas de *E. coli* Dh5- α conteniendo el plásmido B427 creciendo en medio de selección sólido con kanamicina. Se encontró que las colonias P1C1 (260/280=1,87) y P1C4 (260/280=1,05) tenían una buena calidad de ADN (Figura11). Al realizar la digestión del plásmido B427 en *E. coli* DH5- α colonia 1 y 4, se encontró que los fragmentos obtenidos con las enzimas XbaI/BamHI concuerdan con lo esperado (2440 y 9872 pb) (Figura 12). Asimismo se encontró la presencia del gen *hptII* en la colonia 4 de *A. tumefaciens* C58:B427 (Figura 13). Los fragmentos obtenidos de la digestión del plásmido B427 previamente transformado en *A. tumefaciens* GV3101 con las enzimas de restricción EcoRI/BamHI concuerdan con lo esperado (2043 y 10269 pb) (Figura14). A pesar de que inicialmente se pretendía trabajar también con *A. tumefaciens* ATHV no se logró transformar el plásmido B427 en dicha cepa por lo que se continuó trabajando con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427.

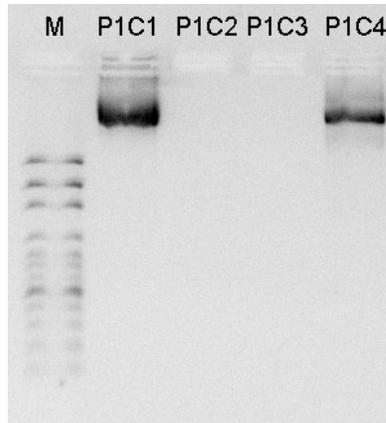


Figura 11. Introducción del plásmido B427 en *E.coli* Dh5- α . (M) Marcador Molecular de 100 bp (FERMENTAS) Colonias 1 (P1C1), 2 (P1C2), 3 (P1C3) y 4 (P1C4). Electroforesis realizada en gel de agarosa 1%, buffer TAE (1X) a 100 V durante 90 min.

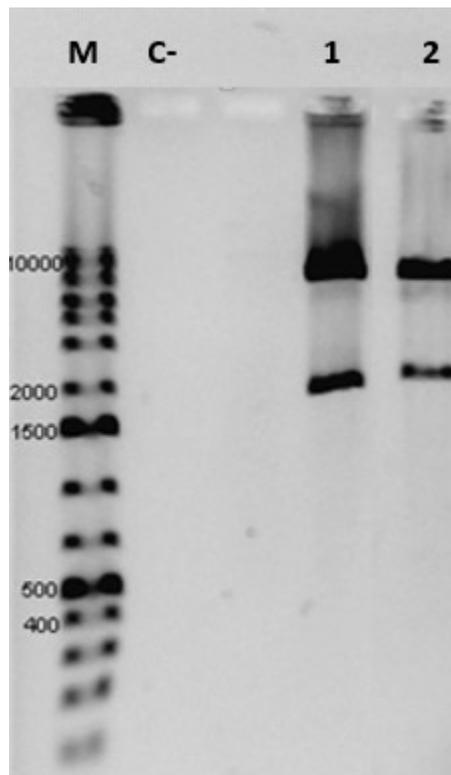


Figura 12. Electroforesis con productos de restricción de plásmido B427 en *E. coli* DH5- α con las enzimas de restricción XbaI/BamHI (Fragmentos esperados de 2440 y 9872 pb). Marcador (M) 1 kb (FERMENTAS), Control Negativo (agua) (C-), ADN de plásmido B427 colonia 1 (1) y ADN de plásmido B427 colonia 4 digeridos con XbaI/BamHI (2), Electroforesis realizada en gel de agarosa 1% con buffer TAE (1X) a 100 V durante 90 min.

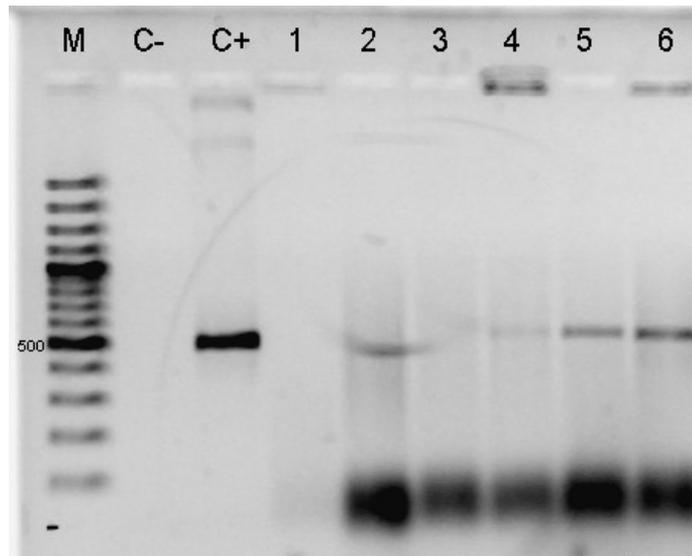


Figura 13. Presencia del gen *hptII* (producto esperado de 500 pb) en *Agrobacterium tumefaciens* C58 transformada con el plásmido B427. M: Marcador 100 pb (FERMENTAS), Control negativo con agua (C-), Control positivo con ADN miniprep de B427 (C+), Control negativo con C58 silvestre (1), C58 B427 Colonia 1 (2-4), C58 B427 Colonia 4 (5-6). Electroforesis realizada en gel de agarosa 1% con buffer TBE (1X) a 100 V durante 90 min.

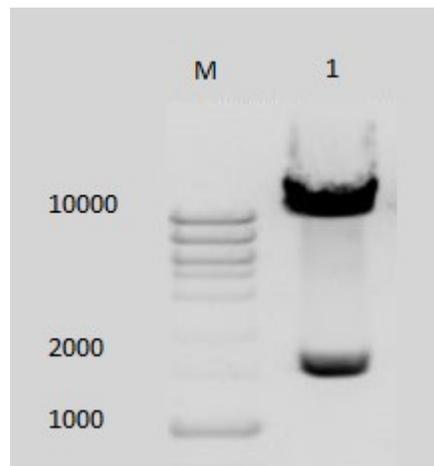


Fig 14. Electroforesis en gel con los productos de la digestión de plásmido B427 en *A. tumefaciens* GV3101 con las enzimas de restricción EcoRI/BamHI (producto esperado de 2043 y 10269 pb). Marcador molecular (M), ADN de plásmido B427 digerido con EcoRI/BamHI (1).

Comprobación mediante técnicas moleculares la presencia de los genes *virG* y *cry10Aa* en los tejidos de café co-cultivados con *Agrobacterium tumefaciens* cepas C58 y GV3101.

Se cultivaron en total 900 segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra. De ellos, 500 fueron co-cultivados utilizando *A. tumefaciens* C58:B427 y 400 empleando *A. tumefaciens* GV3101:B427 y un control de 100 segmentos de hoja sin transformar. Se les extrajo ADN a 22 segmentos de hoja, de los cuales 2 segmentos de hoja fueron control sin transformar, 10 fueron co-cultivados con *A. tumefaciens* C58:B427 y 400 empleando *A. tumefaciens* GV3101:B427. La calidad de ADN obtenida en el ADN extraído de los segmentos de hoja fue bastante cercana al valor esperado (Relación 280/260 ~1,8), mientras que los valores obtenidos mediante la relación de pureza 260/230 fueron significativamente menores al valor esperado (2.0~2.2) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Concentración y calidad de ADN de segmentos de hoja *C. arabica* L. variedad Caturra co-cultivados con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427.

Muestra	Concentración de ácido nucleico		
	(ng/ μ L)	260/280	260/230
Control	143.0	1.7	0.6
Control	185.0	1.7	0.5
C58 M1	415.0	1.6	0.5
C58 M2	189.0	1.6	0.7
C58 M3	210.0	1.7	0.2
C58 M4	99.0	1.6	0.2
C58 M5	335.0	1.8	0.8
C58 M6	147.0	1.7	0.4
C58 M7	133.0	1.7	0.3
C58 M8	388.0	1.4	0.4
C58 M9	242.0	1.4	0.5
C58 M10	67.0	1.7	0.3
GV M1	42.0	1.4	0.4
GV M2	118.0	1.6	0.4
GV M3	140.0	1.3	0.3
GV M4	56.0	1.5	0.3
GV M5	81.0	1.6	0.2
GV M6	80.0	1.7	0.4
GV M7	73.0	1.7	0.3
GV M8	29.0	1.4	0.6
GV M9	20.0	1.7	0.2
GV M10	20.0	1.7	0.2

Comprobación de la presencia del gen *virG* en muestras transformadas con *A. tumefaciens* C58:B427 y GV3101:B427: Se observó la presencia de un fragmento del gen *virG* en las muestras 5 y 10, co-cultivadas con *A. tumefaciens* C58:B427 y las muestras 12, 13, 16, 18, 19 y 20, co-cultivadas con *A. tumefaciens* GV3101:B427 (Figura 15).

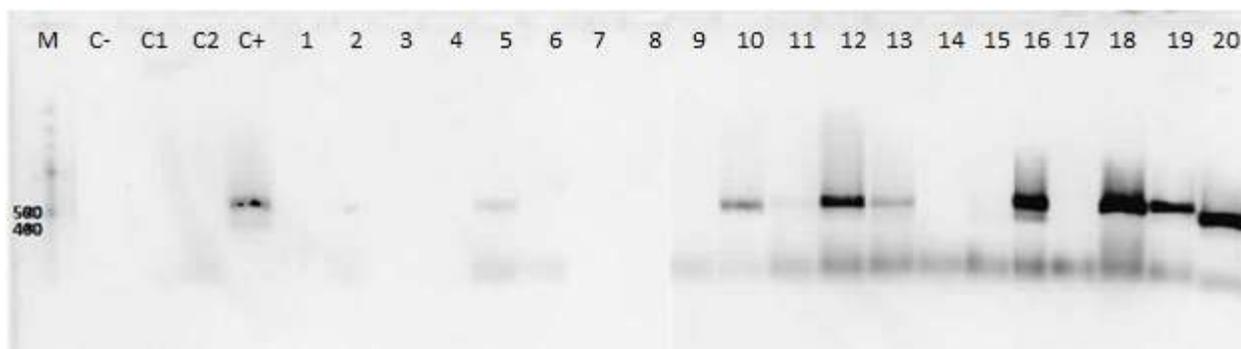


Figura 15. PCR de comprobación para la presencia de *virG* en segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra co-cultivados con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427. M: Marcador 100 pb (FERMENTAS), Control negativo (agua) (C-), Material sin transformar (C1 y C2), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* C58:B427 (1-10), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* GV3101:B427 (11-20). Electroforesis realizada en gel de agarosa 1% con buffer TBE (1X) a 100 V durante 90 min.

Optimización de las condiciones para la amplificación del gen *cry10Aa*: los 3 pares de primers (Cuadro 3) amplificaron el gen *cry10Aa* a temperaturas entre 52°C y los 62°C (Figura 16).

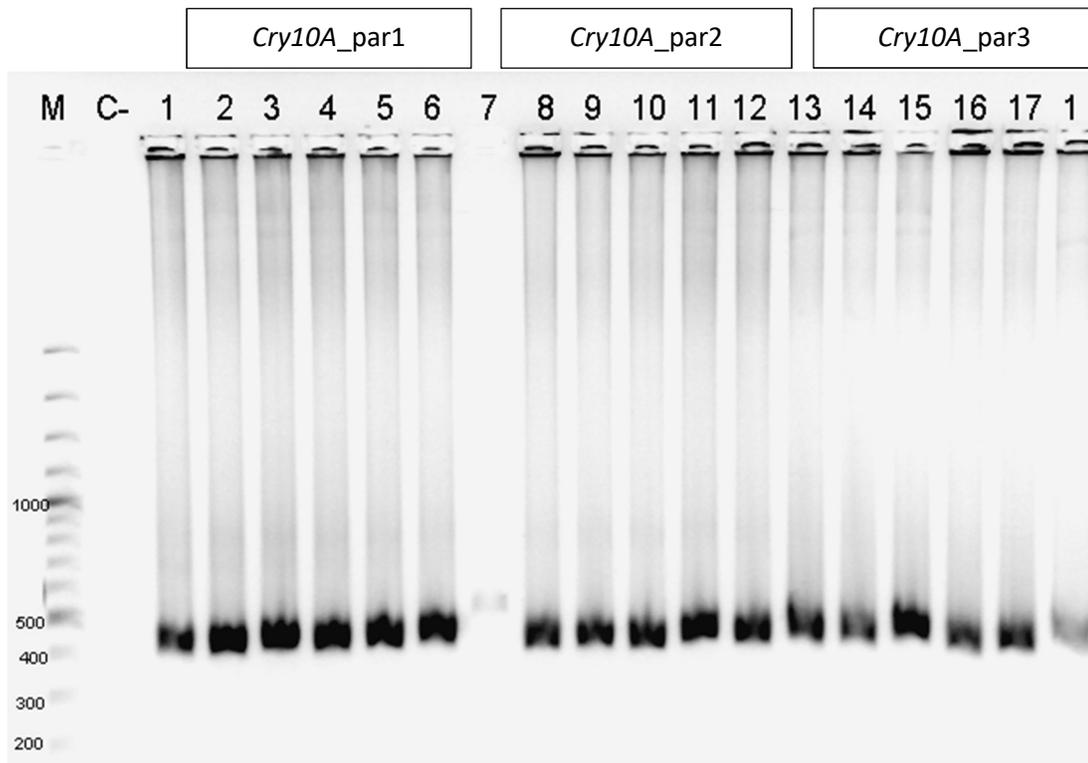


Figura 16. PCR para determinar gradiente de temperatura (52°-62°C) para 3 pares de primers del gen *cry10Aa* (Cuadro 3). M: Marcador 100 pb (FERMENTAS). **Primer par de primers:** 52°C (1), 54°C (2), 56°C (3), 58°C(4), 60°C(5), 62°C (6). **Segundo par de primers:** 52°C (7), 54°C (8), 56°C (9), 58°C (10), 60°C (11), 62°C (12). **Tercer par de primers:** 52°C (13), 54°C (14), 56°C (15), 58°C (16), 60°C (17), 62°C (18). Electroforesis realizada en gel de agarosa 1% (m/V) con buffer TBE (1X) a 100 V durante 90 min.

Comprobación de la presencia de *cry10Aa* en muestras co-cultivadas con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427: Con el primer y segundo par de primers se observó la amplificación de un fragmento del gen *cry10Aa* en las muestras 2 y 5 co-cultivadas con *A. tumefaciens* C58: B427 y las muestras 11, 12, 13, 15, 16, 18, 19 y 20 co-cultivadas con *A. tumefaciens* GV3101: B427 (Figuras 17 y 18). Con el tercer par de primers se observó la amplificación del gen *cry10Aa* en las muestras 5 y 10 co-cultivadas con *A. tumefaciens* C58:B427 y las muestras 12, 13, 16, 17, 18, 19 y 20 co-cultivadas con *A. tumefaciens* GV3101:B427 (Figura 20). En las muestras 5, 12,13, 18, 19 y 20 se observó tanto la presencia del gen *virG* como la presencia del gen *cry10Aa* con los 3 pares de primers (Cuadro 15). Se pudo observar una eficiencia de transformación genética para *A. tumefaciens* C58:B427 ($DO_{600}=0.982$) de 0.3 ± 0.95 y en el caso de *A. tumefaciens* GV3101: B427 ($DO_{600}=0.765$) correspondió a 0.3 ± 0.95 . Asimismo no se pudo observar la formación de embriones en los segmentos de hoja

durante el proceso de eliminación de bacteria y selección de segmentos de hoja transformados.

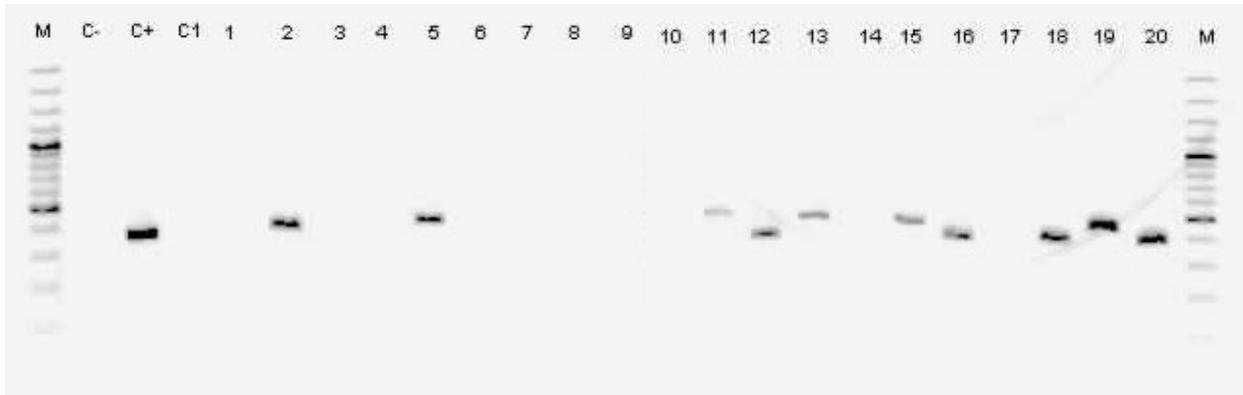


Figura 17. PCR de comprobación para la presencia de *cry10Aa* (utilizando el primer par de primers) en segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra co-cultivados con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427. M: Marcador 100 pb (FERMENTAS), Control negativo (agua) (C-), Material sin transformar (C1 y C2), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* C58:B427 (1-10), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* GV3101:B427 (11-20). Electroforesis realizada en gel de agarosa 1% con buffer TBE (1X) a 100 V durante 90 min.

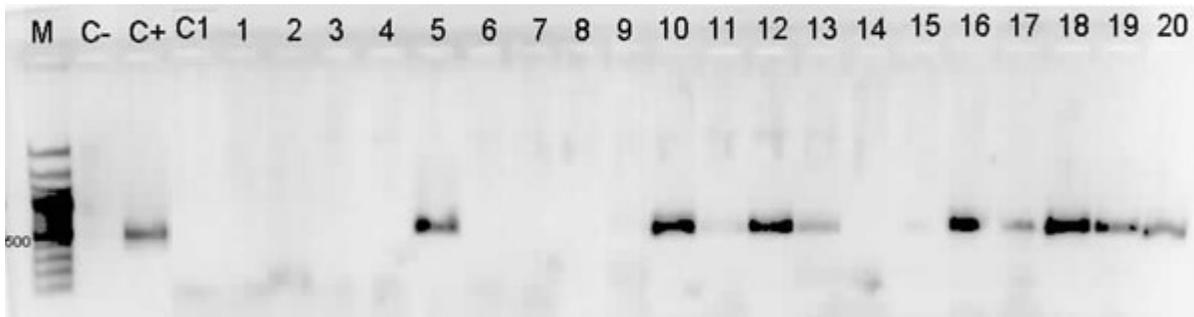


Figura 18. PCR de comprobación para la presencia de *cry10Aa* (utilizando el segundo par de primers) en segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra co-cultivados con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427. M: Marcador 100 pb (FERMENTAS), Control negativo (agua) (C-), Material sin transformar (C1 y C2), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* C58:B427 (1-10), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* GV3101:B427 (11-20). Electroforesis realizada en gel de agarosa 1% con buffer TBE (1X) a 100 V durante 90 min.

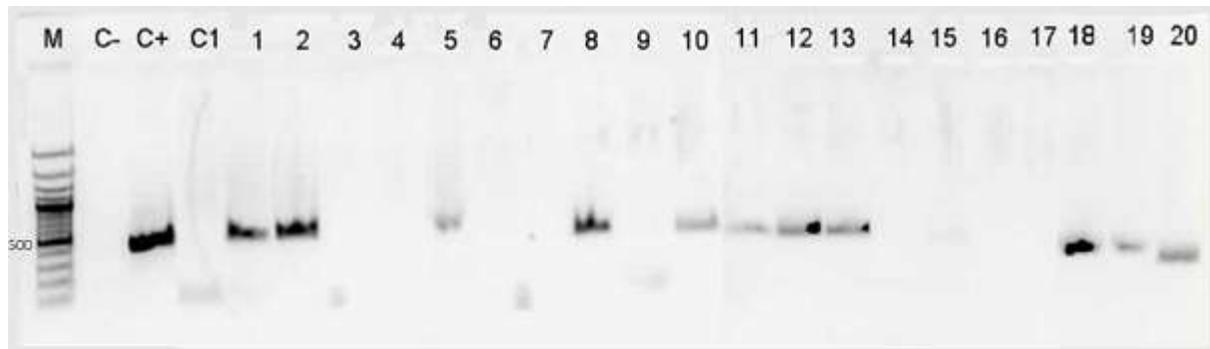


Figura 19. PCR de comprobación para la presencia de *cry10Aa* (utilizando el tercer par de primers) en segmentos de hoja de *C. arabica* L. variedad Caturra co-cultivados con *A. tumefaciens* C58:B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427. M: Marcador 100 pb (FERMENTAS), Control negativo (agua) (C-), Material sin transformar (C1 y C2), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* C58:B427 (1-10), Material co-cultivado con *A. tumefaciens* GV3101:B427 (11-20). Electroforesis realizada en gel de agarosa 1% con buffer TBE (1X) a 100 V durante 90 min.

Cuadro 15. Presencia de los genes *virG* y *cry10Aa* (3 pares de primers) en ADN extraído de segmentos de hoja de *C. arabica* variedad Caturra (Gris: presencia, Blanco: ausencia).

Muestra	<i>virG</i>	<i>cry10Aa</i> 1 ^{er} par primers	<i>cry10Aa</i> 2 ^{ndo} par primers	<i>cry10Aa</i> 3 ^{er} par primers
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

Discusión

A pesar del creciente número de casos exitosos, la producción de plantas transgénicas es aún un proceso dificultoso y está limitado a un número de especies y genotipos (Ribas et al., 2011). El hecho de que se diera la inducción de embriogénesis somática utilizando la combinación de AgNO_3 , BA y AIA en *C. arabica* concuerda con los resultados aportados por las investigaciones realizadas tanto en *C. canephora* (Sridevi et al., 2010) como en *C. dewevrei* (Sridevi & Giridhar, 2012). Esto ya que en otras investigaciones se ha reportado que el compuesto BA es un regulador bastante eficiente para inducir embriogénesis en explantes comparado con otras citoquininas (Sonia et al., 1998). Y además en conjunto con AgNO_3 y AIA se ha observado que ayuda a inducir el proceso de embriogénesis somática directa (Sridevi et al., 2010).

En la actualidad se está observando un número cada vez mayor de trabajos reforzando la utilidad del nitrato de plata en el cultivo de tejidos y otras aplicaciones, logrando el avance de la biotecnología vegetal y la investigación con transgénicos (Giridhar et al., 2003). El nitrato de plata se ha reportado inclusive, que inhibe la acción del etileno, mejorando significativamente la regeneración y propagación clonal de otras plantas de interés económico como el pino blanco y la zanahoria (Sridevi et al., 2010). La ventaja de utilizar nitrato de plata es la posibilidad de obtener un método efectivo de regeneración de embriones directamente del explante, que se puede lograr en un tiempo corto y que permita la producción embriones somáticos, todo lo anterior importante en el establecimiento de un protocolo de transformación eficiente (Sridevi et al., 2010).

En *Zinnia* sp. (Jackrit y Kamnoon 2008) y *Punica granatum* (Naik y Chand 2003), se ha observado por ejemplo que el nitrato de plata tiene un efecto positivo en la regeneración de brotes, mientras que en otras investigaciones se ha determinado que a concentraciones altas se obtenía el resultado contrario por ende la importancia de determinar la concentración adecuada para inducir el proceso de regeneración (Sridevi & Giridhar 2012). En el caso de *C. dewevrei* (Sridevi & Giridhar, 2012) y *C. canephora* (Sridevi et al., 2010), a niveles mayores a 40 μM de nitrato de plata no se obtuvo regeneración de embriones somáticos.

El desarrollo de los embriones somáticos se determinó que era similar al desarrollo de embriones cigóticos, lo cual es un fenómeno observado comúnmente en las plantas (de Almeida et al., 2014). En este caso se pudo establecer claramente que el proceso de embriogénesis observado fue de embriogénesis somática directa, ya que los embriones se formaron directamente del explante sin formación previa de callo (Quirós-Figueroa et al., 2002). Adicionalmente, se sabe que los embriones son resultado de embriogénesis somática directa ya que surgen a partir de una sola célula (Quirós-Figueroa et al., 2002).

Los estados de desarrollo embrionario se pueden distinguir gracias a su forma y al estado de diferenciación del tejido conductivo. En la presente investigación, tanto el estado globular (Figura 4A) como en el estado corazón (Figura 4C) presentan forma esférica mientras que los estados de desarrollo torpedo y cotiledonar presentan forma elongada (Figura E, G) (Campos et al., 2017). Asimismo, en el estado globular y el estado corazón las células presentes son esféricas (Figura 4B y D), mientras que en el estado torpedo y el estado cotiledonar las células son más elongadas (Figura 4E y F). El procambium se comienza a desarrollar en estado globular (Figura 4B), pasando a verse más diferenciado en estado corazón (Figura 4D) y en estado torpedo (Figura 4E) llegando a bifurcarse en el estado cotiledonar (Figura 4F), todo lo anterior concordando con el desarrollo normal de un embrión (Quirós-Figueroa et al., 2002).

De acuerdo con otras investigaciones el proceso de embriogénesis somática directa también puede ser favorecido por la utilización de altas temperaturas. de Almeida et al. (2014) reportaron una mayor obtención de embriones somáticos a una temperatura de 30°C en comparación a la cantidad de embriones somáticos obtenidos a 25°C. Por esta razón para futuras investigaciones se recomienda mantener los explantes a 30°C para obtener una mayor cantidad de embriones somáticos. Asimismo, el proceso de aclimatación observado en esta investigación se asemeja al obtenido por de Almeida et al. (2014), según el cual se lograron obtener plantas adultas luego de 6-8 semanas después de haber sido inducida la embriogénesis somática indirecta.

La densidad óptica de bacteria óptima obtenida al estandarizar el protocolo de transformación genética con *A. tumefaciens* ATHV:pCAMBIA 1303 también concuerda

con otros protocolos de transformación de *C. arabica* (Ribas et al. 2011). En cuanto a la temperatura de co-cultivo, Ribas et al. (2011) observaron un aumento en la eficiencia de transformación y disminución en el sobre crecimiento de la bacteria a 20°C. En esta investigación se utilizaron temperaturas de co-cultivo de 25 y 28°C, por lo que para futuras investigaciones se recomienda probar temperaturas de co-cultivo menores a 25°C. Por otra parte el tiempo de co-cultivo concuerda también con Ribas et al. (2011), ya que en dicha investigación se determinó que el tiempo de co-cultivo óptimo era de 2 días. En esta investigación dicho lapso de tiempo se reafirma, dado a que a pesar de obtener mayor porcentaje de transformación de explantes en un tiempo de co-cultivo de 4 días el porcentaje de explantes contaminados por bacteria también es mayor.

Asimismo el hecho de que se encontrara el gen *virG* en el ADN extraído de los segmentos de hoja de *C. arabica* determina la contaminación por parte de *A. tumefaciens* dado a que los genes *vir* forman parte del plásmido Ti presente en *A. tumefaciens* (Baron et al., 2001) y por ende no se pueda diferenciar si los segmentos transformados presentan el gen *cry10Aa* por transformación exitosa o por la presencia de la bacteria transformada. La eficiencia de transformación obtenida tanto en los segmentos de hoja transformados mediante *A. tumefaciens* C58: B427 y *A. tumefaciens* GV3101:B427 fue menor en comparación a la obtenida por Ribas et al. (2011), lo cual puede ser debido a que en dicha investigación se utilizó una temperatura de co-cultivo de 20°C lo cual se concluyó aumentaba tanto la eficiencia de transformación genética como la proliferación de bacteria. Cabe mencionar además que los explantes utilizados por Ribas et al. (2011) correspondieron a callos embriogénicos y no a segmentos de hoja, por lo que esto también puede haber conllevado a la diferencia en la eficiencia de transformación en esta investigación.

Conclusiones

Se puede concluir que a pesar de los avances existentes en la transformación genética en café, aún quedan muchos retos que superar. A partir de esta investigación se logró determinar que el nitrato de plata (AgNO_3), en conjunto con el ácido indolacético (AIA) y la bencil adenina (BA) tienen un efecto positivo en la inducción de embriogénesis somática directa en segmentos de hoja de *C. arabica* variedad Caturra. Además, los

embriones producto de dicho proceso presentaron un desarrollo normal igual a los embriones cigóticos. La aclimatación se llevó a cabo en 5 semanas en las cuales las plantas aclimatadas presentaron un desarrollo normal. Las condiciones óptimas para la transformación genética con *A. tumefaciens* ATHV:pCAMBIA 1303 correspondieron a una temperatura de 25°C por 2 días y una densidad óptica (DO₆₀₀) de bacteria entre 0.75 a 1.0. Asimismo, la temperatura de amplificación del gen *cry10Aa* se encontró entre los 52-62°C.

Recomendaciones

El haber utilizado sólo una concentración estándar de nitrato de plata en esta investigación pudo conllevar a la inhibición de la formación de brotes, por lo que sería recomendable para futuras investigaciones utilizar diferentes concentraciones de nitrato de plata y de esta forma poder dilucidar si diferentes concentraciones son más aptas para la inducción de embriogénesis en *C. arabica*. Asimismo, se recomienda para futuras investigaciones el uso de una temperatura de 20°C en la transformación genética mediante *A. tumefaciens* para lograr aumentar la tasa de transformación y disminuir el crecimiento de la bacteria. Para la transformación del plásmido en *E. coli* y en *A. tumefaciens* además del choque térmico y tratamiento químico, se recomienda el uso de electroporación para lograr introducir el ADN en la bacteria. Para determinar si se está dando una amplificación inespecífica con el gen *cry10Aa*, se recomienda mandar a secuenciar dichas muestras para determinar si la secuencia amplificada concuerda efectivamente con el gen *cry10Aa*, así como determinar el número de ciclos óptimo de PCR y probar otras temperaturas de *annealing* para los primers.

BIBLIOGRAFÍA

- Albuquerque, E.V.S., Cunha, W.G., Barbosa, A.E.A.D., Costa, P.M., Teixeira, J.B., Vianna, G.R., Cabral, G.B., Fernandez, D. & Grossi-de-Sa, M.F. (2009). Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 45(5), 532-539.
- Amoah, B.K. Wu, H., Sparks, C. & Jones, H.D. (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue, *Journal of Experimental Botany*, 52(358):1135–1142.
- Arrieta, G., Hernández, A. & Espinoza, A.M. (2004). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 757-764.
- Baron, C., N. Domke, M. Beinhofer, and S. Hapfelmeier. (2001). Elevated temperature differentially affects virulence, VirB protein accumulation, and T-pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. *J. Bacteriol.* 183, 6852-6861.
- Bravo, A., Likitvatanavong, S., Gill, S. S., & Soberón, M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 41(7), 423–31.
- Campos, N. A., Panis, B., & Carpentier, S. C. (2017). Somatic Embryogenesis in Coffee: The Evolution of Biotechnology and the Integration of Omics Technologies Offer Great Opportunities. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1460.
- Celestino, C., Hernández, I., Carneros, E., López-Vela, D. & Toribio, M. (2005). La embriogénesis somática como elemento central de la biotecnología forestal. *Invest Agrar: Sist Recur For*, 14(3), 345-357.
- Constantino, L., Flórez, J.C., Benavides, P. & Bacca, T. (2011). *Minador de las hojas del cafeto: Una plaga potencial por efectos del cambio climático*. Colombia: Cenicafe.
- de Almeida, J. A. S., Leal, R. R., Carmazini, V. C. B., Salomon, M. V., & Guerreiro Filho, O. (2014). Effect of temperature and cytokinin on the capacity of direct somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. genotypes. *Coffee Science*, 9(3), 394-399.
- de A. Bojórquez-Quintal, J. E., Sánchez-Cach, L. A., Ku-González, Á., de los Santos-Briones, C., de Fátima Medina-Lara, M., Echevarría-Machado, I. & Estévez, M. (2014). Differential effects of aluminum on *in vitro* primary root growth, nutrient

- content and phospholipase C activity in coffee seedlings (*Coffea arabica*). *Journal of Inorganic Biochemistry*, 134, 39-48.
- De Guglielmo-Cróquer, Z., Z., Altosaar, I., Zaidi, M., & Menéndez-Yuffá, A. (2010). Transformation of coffee (*Coffea Arabica* L. cv. Catimor) with the cry1ac gene by biolistic, without the use of markers. *Brazilian Journal of Biology*, 70(2), 387-393.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. (2011). *InfoStat*. Universidad Nacional de Córdoba: España.
- Espinoza, A., Hernández, A., Ibarra, J.E., Moares, B. Monnerart, R., Soares, E., Obando, A. & Wagner, R. (2010). Patent WO 2010/043928 A1: Derived proteins from Cry genes of *Bacillus thuringiensis*. International application published under patent cooperation treaty (PCT).
- Fernández-Da Silva, E.R. & Menéndez-Yuffá, A. (2003). Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the gene gus and bar. *Electron J Biotechnol*, 6, 29-38.
- Fernández, R., De Guglielmo, Z., & Menéndez, A. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación*, 34(71), 57-84.
- Ferreira, A., Protasio, L.F. & Gonzaga, L. (2006). Genetic transformation of coffee (review). *Braz. J. Plant Physiol.*, 18(1), 83-94.
- Freire-Balseca, D. A. (2009). *Establecimiento de embriogénesis somática y caracterización histológica embrionaria de piñón (Jatropha Curcas) a partir de pecíolo*. Quito, Ecuador: Universidad de las Fuerzas Armadas.
- García del Moral, R. (1993). *Laboratorio de anatomía patológica*. Madrid, España: McGRAWHILL interamericana de España.
- Gatica-Arias, A., Arrieta-Espinoza, G. & Espinoza-Esquivel, A.M. (2008). Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimization of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 1-12.

- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37.
- Gelvin, S.B. & Schilperoort, R. (2012). *Plant Molecular Biology Manual*. Netherlands: Kluwer Academic Publishers.
- Giridhar, P., Kumar. V., Indu, E.P., Chandrasekar, A., & Ravishankar, G.A. (2004). Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *Coffea canephora* P ex Fr. *Acta Botanica Croatica*, 63(1), 25-33.
- Glare, T.R., Caradus, J., Gelernter, W., Jackson, T., N. Keyhani, N. J., Kohl, J., Marrone, P., Morin, L. & Stewart, A. (2012). Have biopesticides come of age?. *Trends Biotechnol.*, 30 , 250–258.
- George, E. F., Hall, M.A. & De-Klerk, G. (2008). *Plant Propagation by Tissue Culture*. Basingstoke, UK: Exegetics.
- Jefferson, R. A., Burgess, S. M., & Hirsh, D. (1986). Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 83(22), 8447–8451.
- Kahia, J., Kirika, M., Lubabali, H., & Mantell, S. (2016). High-frequency Direct Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration from Leaves Derived from *In Vitro*-Germinated Seedlings of a *Coffea arabica* Hybrid Cultivariedad *HortScience*, 51(9), 1148-1152.
- Khayat, E. (2012). An engineering view to micropropagation and generation of true to type and pathogen-free plants. En: A.A. Altman y M. Hasegawa (Eds.) *Plant Biotechnology and Agriculture*. (229-241). San Diego: Academic Press.
- Kumar, A., Sreedharan, S. P., Shetty, N. P., & Parvatam, G. (2016). Developing Sustainable Disease Resistance in Coffee. *Plant Pathogen Resistance Biotechnology*, 217-243.
- Indu, E.P. (2004). Micropropagation, somatic embryogenesis and *Agrobacterium* mediated transformation of *Coffea canephora* Pierre ex Froehner. Doctoral Thesis. University of Mysore. India.

- ICAFÉ. (2015). Informe sobre la actividad cafetalera en Costa Rica. (6 de diciembre de 2015). INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA. Congreso Nacional Cafetalero Ordinario, Heredia, Costa Rica.
- ICAFÉ. (2016). Informe sobre la actividad cafetalera en Costa Rica. (4 de diciembre de 2016). INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA. Congreso Nacional Cafetalero Ordinario, Heredia, Costa Rica.
- Lacey, L.A., Grzywacz, D., Shapiro-Ilan, D.I., Frutos, R., Brownbridge, M. & Goettel, M.S. (2015). Insect pathogens as biological control agents: Back to the future. *Journal of Invertebrate Pathology*, 132(1), 1-41.
- López-Pazos, S.A. (2011) Actividad biológica de proteínas Cry recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de primer instar de *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleóptera: Scolytidae). Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia, Colombia.
- Mangal, S.K. (2007). *Coffee: planting, production and processing*. India: Gene-Tech Books.
- Méndez-López, I., Basurto-Ríos, R. & Ibarra, J.E. (2003). *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiology Letters*, 226, 73-77.
- Mishra, M.K. & Slater, A. (2012). Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. *Biotechnology Research International*, recopilado el 20-02-16 de: <http://dx.doi.org/10.1155/2012/580857>.
- Monaco, L.C., Sondal, M.R., Carvalho, A. Crocomo, O.J. & Sharp, W.R. (1997). Application of tissue culture in improvement of coffee. En: Reinrt, J. y Bajaj Y.P.S. (eds): *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Narosa Publishing House. India.
- Mondego, J.C., Vidal, R.O., Carazzolle, M.F., Tokuda, E.K., Parizzi, L.P., Costa, G.L. & Pereira, G.G. (2011). An EST-based analysis identifies new genes and reveals distinctive gene expression features of *Coffea arabica* and *Coffea canephora*. *BMC Plant Biology*, 11(1), 30-52.
- Montelie-Montelie, M., Castellanos-González, L. & Jiménez-Carbonel, R. (2012). *Contribución al Manejo Integrado de Plagas en el Cultivo de Café: Agentes*

nocivos clave, propuesta y validación de un MIP en café (Coffea spp.) en condiciones de montaña. España: Editorial académica española.

Montes, R.C., Armandop. O., & Amilcar-Cadena, R. (2012). Infestación e incidencia de Broca, roya y mancha de Hierro en cultivo de café en el departamento del Cauca. *Bioteconología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 10(1), 98-108.

Murashige, T. & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.

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.

Perthuis, B., Pradon, J.L., 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(3), 321-329.

Probiotek, recopilado el 2 de febrero, 2016, desde <http://www.probiotek.com/producto/caldo-luria-luria-bertani-lb/>.

Quiroz-Figueroa, F., Fuentes-Cerda, C., Rojas-Herrera, R. & Loyola-Vargas, V. (2002). Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 20(12):1141-1149.

Reich, A. (2010). Coffee & tea history in a cup. *Herbarist*, 76, 8-15.

Ribas, A.F., Dechamp, E., Champion, A., Bertrand, B., Combes, M., Verdeil, J., Lapeyre, F., Lashermes, P. & Etienne, H. (2011). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea Arabica* L. is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *Plant Biology*, 11, 92.

Robinson, R. A. (1995). *Return to Resistance: Breeding Crops to Reduce Pesticide Dependence*. Ottawa, Canadá: IDRC Books.

Snap gene, recopilado el 2 de febrero, 2016, desde http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/plant_vectors/pCAMBIA1303/.

- Sonia, P.K.J, Gulati, A. & Dahiya, S. (1998). Direct organogenesis in hypocotyls cultures of *Tamarindus indica*. *Biot Plant*, 41, 331-337.
- Sridevi, V., Giridhar, P., Simmi, P.S. & Ravishankar, G.A. (2010). Direct shoot organogenesis on hypocotyls explants with collar region from in vitro seedlings of *Coffea canephora* Pierre ex. Frohner cv. C X R and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 101, 339-347.
- Sridevi, V. & P., Giridhar. (2012). In vitro shoot growth, direct organogenesis and somatic embryogenesis promoted by silver nitrate in *Coffea dewevrei*. *J. Plant Biochem. Biotechnol*, 23(1), 112-118.
- Soberón, M. & Bravo, A. (2007). *Las toxinas Cry de Bacillus thuringiensis: modo de acción y consecuencias de su aplicación*. México: UNAM.
- Suzuki, K., Moriguchi, K. & Yamamoto, S. (2015). Horizontal DNA transfer from bacteria to eukaryotes and a lesson from experimental transfers. *Research in Microbiology*, 166 (10), 753-763.
- Van Boxtel, J. & Berthouly, M. (1996). High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 44, 7-17.
- Vandermeer, J., Perfecto, I., & Philpott, S. (2010). Ecological complexity and pest control in organic coffee production: uncovering an autonomous ecosystem service. *BioScience*, 60(7), 527-537.
- Vega, F.E., Franqui, R.A. & Benavides, P. (2002). The presence of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei*, in Puerto Rico: fact or fiction?. *Journal of Insect Science*. 2, 13.
- Vega, F.V., Davis, A.P. & Jaramillo J. (2012). From forest to plantation? Obscure articles reveal alternative host plants for the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Coleoptera: Curculionidae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 107(1), 86–94.
- Von Arnold, S., Sabala, I., Bozhkov, P., Dyachok, J. & Filonova, L. (2002). Developmental pathways of somatic embryogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69, 3, 233-249.
- Waller, J.M., Bigger, M., & Hillocks, R.J. (2007). *Coffee Pests, Diseases and their Management*. Gran Bretaña: CABI Publishing. Wallingford.