



**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN  
GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* PARA EL  
MEJORAMIENTO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. var. Catuai)**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto  
Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título  
de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

**JIMMY VILLALTA VILLALOBOS**

**CARTAGO JULIO, 2014**

# OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* PARA EL MEJORAMIENTO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. var. Catuaí)

Jimmy Villalta Villalobos

## RESUMEN

*Coffea arabica* L. es un cultivo de gran importancia económica y social. Sin embargo, debido a la homogeneidad genética entre sus variedades, se presenta una susceptibilidad general a plagas y enfermedades. Las técnicas convencionales para el mejoramiento del café requieren un mínimo de treinta años para el desarrollo de un nuevo cultivar, por lo que se propone la ingeniería genética como un método de mejoramiento del cultivo basándose en técnicas como la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. El objetivo principal de este trabajo es establecer un protocolo de transformación genética mediada por *A. tumefaciens* en café (*Coffea arabica* L. var. Catuaí). Para ello, segmentos de hoja y embriones cigóticos se cultivaron con las cepas de *A. tumefaciens* ATHV y GV3101 transformadas con el plásmido pCAMBIA 1303. Con los explantes transformados se realizó una prueba GUS y se determinó que la mejor transformación genética se obtuvo al utilizar embriones cigóticos y la cepa ATHV::1303. Se realizó una extracción de ADN con los supuestos embriones transformados y se amplificó por PCR un fragmento del gen *gfp* con el fin de comprobar la transformación eficiente de los mismos. Asimismo, se realizó una PCR para un fragmento del gen *virG* con los explantes positivos a la amplificación del gen anterior para comprobar que su amplificación no fue debida a contaminación bacteriana. Finalmente se realizó una PCR utilizando cebadores universales para la región 18S en las muestras extraídas para verificar que la calidad del ADN no hubiera interferido en la amplificación del fragmento del gen *gfp*. En este caso, de las 11 muestras extraídas, 5 amplificaron positivamente para el gen *gfp* y de éstas, todas resultaron negativas para el gen *virG*. Todas las muestras amplificaron el fragmento de la región 18S. Se estableció un protocolo de transformación mediada por *A. tumefaciens* en *Coffea arabica* L. var. Catuaí, el cual se podrá utilizar posteriormente para conferir resistencia a enfermedades y plagas.

**Palabras clave:** *Coffea arabica*, café, *Agrobacterium tumefaciens*, transformación genética, genes reporteros.

**OPTIMIZACIÓN DE UN PROTOCOLO DE TRANSFORMACIÓN  
GENÉTICA MEDIADA POR *Agrobacterium tumefaciens* PARA EL  
MEJORAMIENTO DE CAFÉ (*Coffea arabica* L. var. Catuai)**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto  
Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar al título  
de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

**Miembros del Tribunal**

  
\_\_\_\_\_

**Dr. Andrés Gatica Arias,  
Asesor-UCR**

  
\_\_\_\_\_

**MSc. Giovanni Garro Monge,  
Profesor Asesor-ITCR**

  
\_\_\_\_\_

**Dra. Marta Valdez Melara,  
Lectora-UCR**

## **AGRADECIMIENTOS**

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes instituciones y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

A la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, por permitirme la ejecución del proyecto en sus instalaciones.

Al Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica por permitirme realizar parte de la investigación en sus instalaciones.

A mi tutor externo Dr. Andrés Gatica Arias, por la guía, enseñanza y mano amiga recibida durante todo el desarrollo del proyecto.

A la Dra. Marta Valdez Melara, por aceptar ser la lectora de mi trabajo.

Al profesor MSc. Giovanni Garro Monge, por aceptar ser mi asesor en este proyecto, así como por las clases recibidas en diferentes cursos durante el transcurso de mi formación académica.

Por último, pero igual de importante, a mis amigos Priscilla Arce y Cristian Vargas, sin los cuales, la consecución de este trabajo hubiera sido imposible.

## INDICE GENERAL

<b>RESUMEN</b> .....	ii
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>INDICE GENERAL</b> .....	v
<b>INDICE DE CUADROS</b> .....	vii
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>INDICE DE ANEXOS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIACIONES</b> .....	xi
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	3
Descripción botánica.....	3
Generalidades del café.....	5
Enfermedades y plagas que afectan el café.....	6
Transformación genética de café.....	8
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	9
Plásmido pCAMBIA 1303 .....	12
Técnicas utilizadas para determinar la expresión transitoria del transgen.....	13
<b>OBJETIVOS</b> .....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos .....	15
<b>METODOLOGÍA</b> .....	16
Localización.....	16
Material vegetal .....	16
Cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	16
Miniprep pCAMBIA 1303 .....	16
Preparación de células competentes de <i>A. tumefaciens</i> .....	17
Transformación de <i>A. tumefaciens</i> ATHV y GV3101 con el plásmido pCAMBIA1303 ..	17
Medios de cultivo.....	18
Desinfección de las semillas y extracción de embriones cigóticos. ....	19
Amplificación de los genes <i>virG</i> y <i>gfp</i> en las cepas de <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido pCAMBIA 1303 utilizadas en la transformación .....	19
Transformación genética de café mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	20

Prueba histoquímica GUS para evaluar la expresión transitoria .....	22
Extracción de ADN de explantes transformados .....	23
Amplificación del gen codificante de la proteína verde fluorescente (GFP) .....	24
Amplificación del gen <i>virG</i> .....	24
Amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S .....	25
Selección de plantas transformadas .....	25
<b>RESULTADOS</b> .....	26
Evaluación de la transformación de las cepas ATHV y GV3101 de <i>A. tumefaciens</i> con el plásmido pCAMBIA1303 .....	26
Comprobación de la transformación de las cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el plásmido pCAMBIA 1303.....	27
Expresión transitoria del gen <i>gus</i> en los tejidos de café transformados con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303 y GV3101::1303 .....	30
Integración del gen <i>gfp</i> en los explantes transformados con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303 .....	32
Amplificación del gen <i>virG</i> en supuestas plantas transgénicas .....	33
Amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S en los explantes transformados con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303.....	34
<b>DISCUSIÓN</b> .....	35
Optimización del protocolo de transformación genética en café. ....	35
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	41
Conclusiones .....	41
Recomendaciones.....	41
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	42
<b>ANEXOS</b> .....	48
Anexo 1. Resultados de la prueba histoquímica GUS realizada a los explantes dos días posteriores a su transformación genética. ....	48
Anexo 2. Resultados de la prueba histoquímica GUS realizada a los explantes cuatro semanas posteriores a su transformación genética. ....	50
Anexo 3. Resultados de la cuantificación del ADN extraído de embriones cigóticos transformados con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303 por medio del Nanodrop Lite .....	51

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Composición de los medios de cultivo utilizados en la transformación genética de <i>C. arabica</i> L. var. Catuaí con <i>A. tumefaciens</i> .....	18
<b>Cuadro 2.</b> Experimentos realizados en la transformación genética de <i>C. arabica</i> L. var. Catuaí con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV::1303 y GV3101::1303.....	20
<b>Cuadro 3.</b> Número de explantes por cada tratamiento utilizados para la prueba histoquímica GUS ( $\beta$ -glucuronidasa).....	22
<b>Cuadro 4.</b> Evaluación del crecimiento de las colonias en los diferentes medios de cultivo luego de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV con el plásmido pCAMBIA 1303 .....	26
<b>Cuadro 5.</b> Evaluación del crecimiento de colonias en los diferentes medios de cultivo luego de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101 con el plásmido pCAMBIA 1303 .....	26
<b>Cuadro 6.</b> Expresión transitoria del gen <i>gus</i> en segmentos de hoja y embriones cigóticos a los dos días y cuatro semanas después de la transformación con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303 y GV3101::1303.....	30

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mapa de siembra de café de acuerdo a la variedad, r= variedad robusta, m= mezcla de variedad robusta y arábica, a= variedad arábica (Temis <i>et al.</i> , 2011). .....	2
<b>Figura 2.</b> Rama con fruto de <i>Coffea arabica</i> L. (Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2014) .....	4
<b>Figura 3.</b> Sección transversal de una semilla de café (Eira <i>et al.</i> , 2006). .....	5
<b>Figura 4.</b> Vector binario en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (Lee y Gelvin, 2008). .....	12
<b>Figura 5.</b> Esquema del plásmido pCAMBIA 1303 (Marker Gene Technologies, 2014). ....	13
<b>Figura 6.</b> Esquema de la reacción histoquímica GUS (González y Barrero, 2008). .....	14
<b>Figura 7.</b> Colonias obtenidas luego de la transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV y GV3101 con el plásmido pCAMBIA 1303. (A) Colonias de ATHV::1303 (B) Colonias de GV3101::1303 .....	27
<b>Figura 8.</b> Electroforesis con productos amplificados del gen <i>virG</i> en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (M) marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) control negativo (agua) (1) <i>A. tumefaciens</i> ATHV (2) <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303 (3) <i>A. tumefaciens</i> GV3101 (4) <i>A. tumefaciens</i> GV3101::1303 (5) Control con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303 .....	28
<b>Figura 9.</b> Electroforesis con productos amplificados del gen <i>gfp</i> en <i>Agrobacterium tumefaciens</i> con el plásmido pCAMBIA 1303 (M) Marcador Molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) control negativo (agua) (1) control con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303 (2) control con <i>A. tumefaciens</i> ATHV (3-4) productos amplificados de la cepa ATHV::1303 (5) control con <i>A. tumefaciens</i> GV3101 (6-7) productos amplificados de la cepa GV3101::1303.....	29
<b>Figura 10.</b> Expresión transitoria del gen reportero <i>gus</i> a los 2 días posteriores a la transformación genética con <i>A. tumefaciens</i> . A) Control negativo con segmento de hoja no transformado; B) Segmento de hoja transformado; C) Control negativo con embrión cigótico no transformado; D) Embriones cigóticos transformados. ....	31
<b>Figura 11.</b> Expresión estable del gen reportero <i>gus</i> a las 4 semanas posteriores a la transformación genética con <i>A. tumefaciens</i> A) Control negativo con segmentos de hoja no transformados; B) Segmentos de hoja transformados; C) Control negativo con embrión cigótico no transformado; D) Embrión cigótico transformado. ....	31

**Figura 12.** Amplificación de un fragmento del gen *gfp* de las supuestas plantas transformadas (M) Marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) Control negativo (agua) (P) Control positivo con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303 (C) Control con planta no transformada (1-11) Productos de PCR de muestras de ADN de diferentes explantes transformados ..... 32

**Figura 13.** Amplificación de un fragmento del gen *virG* de plantas transformadas (M) Marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) Control negativo con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303 (P) Control positivo con ADN de *A. tumefaciens* ATHV::1303 (C) Producto de PCR con ADN control con planta no transformada (2, 4, 6, 10, 11) Productos de PCR de muestras de ADN de diferentes explantes transformados positivos para el gen *gfp*. ..... 33

**Figura 14.** Amplificación de la región 18S (M) Marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) Control negativo (agua) (C) Producto de PCR de muestra de ADN de planta no transformada (1-11) Productos de PCR de muestras de ADN de diferentes explantes transformados..... 34

## INDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Resultados de la prueba histoquímica GUS realizada a los explantes dos días posteriores a su transformación genética.....	50
<b>Anexo 2.</b> Resultados de la prueba histoquímica GUS realizada a los explantes cuatro semanas posteriores a su transformación genética.....	52
<b>Anexo 3.</b> Resultados de la cuantificación del ADN extraído de embriones cigóticos transformados con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303 por medio del Nanodrop Lite.....	53

## LISTA DE ABREVIACIONES

BAP	Bencilaminopurina
GFP	Proteína Verde Fluorescente
GUS	$\beta$ -glucuronidasa
LB	Medio Luria Bertani
MES	Ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

## INTRODUCCIÓN

El café (*C. arabica* L.), es una especie alotetraploide, producto de un cruce interespecífico natural dado entre dos especies diferentes con un número básico de cromosomas  $x=11$ , siendo el progenitor femenino *C. eugeniodes* y otra especie cercana al grupo *canephora* como progenitor masculino (Cárdenas, 2007).

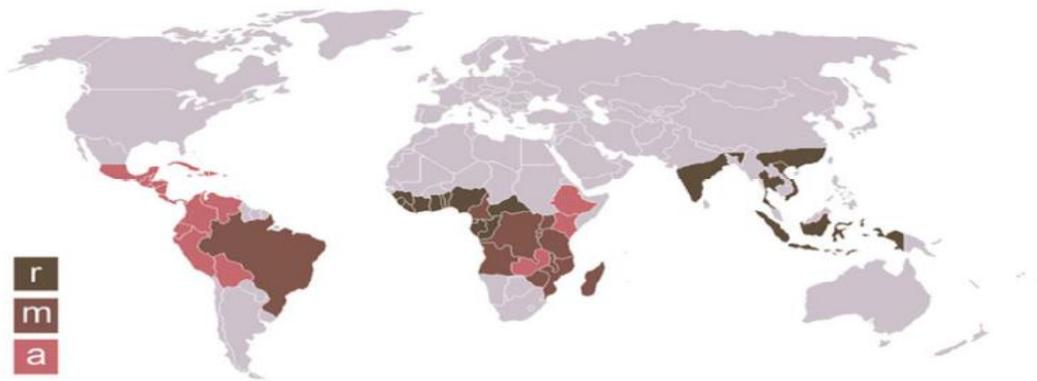
Esta planta es nativa de las tierras altas del suroeste de Etiopía, con poblaciones adicionales en el sur de Sudán (Boma Plateau) y el norte de Kenia (Monte Marsabit). Las variedades de esta especie que se cultivan en todo el mundo son derivadas de la base genética del café "Típica" o "Bourbon", lo que resulta en una baja diversidad genética entre los cultivares de arábicas (Mishra y Slater, 2012).

Del género *Coffea* L., solamente tres especies (*C. arabica* L., *C. canephora* L. y *C. liberica* L.) son cultivadas comercialmente y de éstas, *Coffea arabica* L. es la más importante (Figura 1), produciendo aproximadamente el 90% del café comercializado en el mundo (Fernández *et al.*, 2010).

Por su alto valor como bebida de consumo y por ser uno de los productos agrícolas más importantes del mundo ocupando el segundo puesto en el comercio internacional luego del petróleo, es un cultivo de suma relevancia a nivel mundial. Las regiones tropicales y subtropicales del mundo, como África, Asia y Latinoamérica son los lugares donde se cultiva mayormente, derivándose directa o indirectamente de su producción los ingresos de más de cien millones de personas (Mishra y Slater, 2012).

En Costa Rica, la producción de café fruta en la cosecha 2012-2013 reportada fue de 2.245.543 de fanegas, dándose una reducción del 5.77% con respecto a la cosecha anterior. Este descenso se dio principalmente por factores climáticos, una fertilización poco provechosa y daños ocasionados por la roya. Las principales regiones cafetaleras del país se encuentran en Coto Brus, Los Santos, Pérez Zeledón, Turrialba, el Valle Central y Occidental y la Zona Norte (ICAFE, 2013).

Los ingresos obtenidos en la cosecha 2012-2013 en café vendido para exportación fueron de aproximadamente 307.82 millones de dólares, siendo Estados Unidos el principal país importador del producto con un 52.4%, seguido por Bélgica/Luxemburgo con 13.4% y Alemania con 6.1% del total de las exportaciones (ICAFE, 2013).



**Figura 1.** Mapa de siembra de café de acuerdo a la variedad, r= variedad robusta, m= mezcla de variedad robusta y arábica, a= variedad arábica.

**Fuente:** Temis *et al.*, 2011

El café es susceptible a diferentes enfermedades y plagas. Una de las mayores amenazas de la producción es la broca del café (*Hypothenemus hampei* Ferrari), la cual perfora el grano cuando éste aún se encuentra en el árbol. Además, la roya (*Hemileia vastatrix*), el minador de la hoja (*Leucoptera coffeella*), el ojo de gallo (*Mycena citricolor*), la mancha del fruto (*Cercospora coffeicola*) y algunos hongos pertenecientes al género *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* causan afecciones importantes al cultivo. 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 (Temis *et al.*, 2011).

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/o frío, con lo que se pueden obtener características que serían imposibles de lograr por técnicas de cultivo tradicional (Ferreira *et al.*, 2006).

La transformación genética en café se ha llevado a cabo por métodos biológicos como el uso de bacterias del género *Agrobacterium* o físicos como la electroporación y la biobalística (Gatica *et al.*, 2009). 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).

Por esta razón, el objetivo de este trabajo es optimizar un protocolo de transformación genética en *Coffea arabica* L. var. Catuaí mediante *Agrobacterium tumefaciens* con la finalidad de conferirle resistencia a enfermedades y plagas.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Descripción botánica

El café pertenece al reino vegetal, división Magnoliophyta, clase Dicotyledoneae, subclase Asteridae, orden Rubiales, familia Rubiaceae, género *Coffea* y a la especie *arabica* (Alulima, 2012).

El café es una dicotiledónea de un arbusto perenne perteneciente a la familia de las *Rubiaceae*, la cual puede alcanzar diez metros de altura de forma silvestre y tres metros en una plantación controlada. El café crece en el estrato más bajo de los bosques tropicales, donde las ramas primarias se oponen, en sentido horizontal o caídos. Las hojas crecen en pares en tallos cortos y su longitud aproximada es de 15 cm con apariencia brillante de color verde oscuro (Temis *et al.*, 2011).

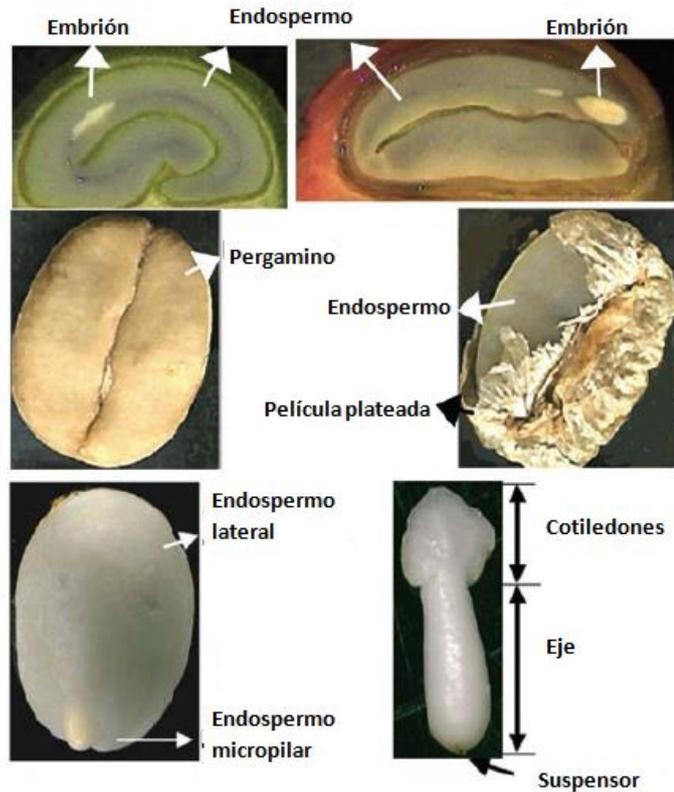
Las primeras flores son de color blanco cremoso, de aroma dulce y se producen entre los 3 y 4 años de edad. Éstas aparecen en racimos en las axilas de las hojas, la corola tiene una longitud aproximada de 20 mm, que en la parte más alta se divide en cinco pétalos. Luego que las flores se marchitan, los ovarios eventualmente se convierten en drupas ovaladas de hasta 18 mm de longitud y 10-15 mm de diámetro, las cuales darán origen a los granos de café (Figura 2) (Temis *et al.*, 2011).



**Figura 2.** Rama con fruto de *Coffea arabica* L. **Fuente:** Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 2014

La pulpa de la cereza madura está formada por el exocarpio (epidermis), la cual es la capa externa que representa el 43.2% del fruto en base húmeda y su color varía desde verde o amarillo hasta rojo, siendo algunas veces hasta violeta o negro dependiendo de la variedad y el grado de madurez del fruto. El exocarpio se encuentra recubriendo el mesocarpio (11.8% del fruto en base húmeda), constituido por una capa gruesa de tejido esponjoso rico en azúcares y mucílagos que recubre los dos granos (Arcila *et al.*, 2007).

Los granos se encuentran revestidos por una doble membrana. La primera de ellas es el endocarpio de color amarillo pálido, de consistencia dura y frágil llamado comúnmente pergamino, el cual representa el 6.1% del fruto en base húmeda. La segunda membrana es más fina que la anterior y se conoce como película plateada o tegumento seminal (0.2% fruto en base húmeda). El endospermo, llamado café verde representa el 38.9 y 55.4% del fruto en base húmeda y seca, respectivamente (Figura 3) (Arcila *et al.*, 2007).



**Figura 3.** Sección transversal de una semilla de café.

**Fuente:** Eira *et al.*, 2006

### Generalidades del café

Existen dos variedades botánicas distintas: la arábica (típica) y la bourbon, y debido a que este cultivo se autopoliniza, dichas variedades tienen una tendencia a permanecer estables genéticamente (Mishra y Slater, 2012).

Algunas mutaciones espontáneas de *Coffea arabica* L. han sido cultivadas por mostrar características deseables y también se han desarrollado híbridos como la variedad Catuaí, la cual fue desarrollada a partir de las variedades Mundo Novo y Caturra y se caracteriza por sus cerezas amarillas o rojas, siendo éstas últimas, las de más amplia distribución en Costa Rica (INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION, 2014).

Esta variedad es de porte pequeño e internudos cortos. Tiene la capacidad de producir mucho crecimiento secundario en las bandolas, lo que le da un potencial de muy alta producción. Se ha recomendado la siembra de esta variedad a densidades no mayores a 5000 plantas por hectárea (2m entre hileras x 1m entre plantas) (ICAFE, 2011).

Se cultiva en lugares que presentan una precipitación que varía entre los 750 y los 3000 mm anuales, con altitudes de 1300-1700 metros y una temperatura media anual de 16-22 °C. Además, requiere lluvia o riego abundante y distribuido uniformemente desde que comienza la floración hasta finales del verano con el objetivo de favorecer el desarrollo del fruto. Luego es conveniente un periodo de sequía que logre la inducción de la floración del año siguiente (Fernández *et al.*, 2010).

### **Enfermedades y plagas que afectan el café**

Debido a la homogeneidad genética de las variedades de *C. arabica* L., se presenta una susceptibilidad general a las siguientes plagas y enfermedades (Cadena y Gaitán, 2006).

#### ➤ Broca del fruto (*Hypothenemus hampei* Ferrari)

Es un insecto coleóptero considerado la principal plaga en todos los países productores de café. El fruto es perforado por la hembra y en el endospermo son colocados los huevos que posteriormente darán origen a las larvas causantes de los daños y pérdidas económicas (Fernández y Cordero, 2007).

Este gorgojo de color negro y del tamaño de la cabeza de un alfiler se alimenta de los frutos en sus estados verdes, maduros y almacenados, siendo los cafetales con mucha sombra y poca aireación interna, los atacados con más frecuencia (Alulima, 2012).

#### ➤ Minador de la hoja (*Leucoptera coffeella*)

Es un pequeño lepidóptero que ataca hojas en su estado larval causando lesiones que conllevan defoliaciones. Las perforaciones se dan entre la epidermis y la membrana subyacente de la hoja y así las hojas afectadas se tornan amarillentas y se desprenden (Alulima, 2012).

Este insecto es un parásito obligado de café, por lo que se alimenta, desarrolla y completa su ciclo de vida sobre las hojas de la planta, siendo este desarrollo diferente dependiendo de la variedad de café. El daño se inicia cuando la larva emerge del huevo y penetra directamente en los tejidos foliares de los que se alimenta, dejando como consecuencia una mancha irregular conocida como mina, que provoca un descenso en el área fotosintética disponible de la planta afectada (Acuña y Betanco, 2007).

➤ Nematodos

Entre los más importantes se encuentran *Meloidogyne spp* y *Pratylenchus sp*. Estos organismos con forma de gusanos delgados, incoloros y cilíndricos atacan el cuello y las raíces del cultivo, provocando nudos en las raíces atacadas (Alulima, 2012).

➤ La roya (*Hemileia vastatrix*)

Los síntomas asociados a esta enfermedad se dan con la formación de manchas de apariencia amarillenta en la parte superior de la hoja y la formación de un polvo de color anaranjado en el envés de la hoja (Alulima, 2012).

Además, las lesiones viejas pueden verse de color negro con su borde amarillo. Cuando se da un ataque por gran cantidad de microorganismos, se da una gran caída de hojas, lo que a su vez causa un debilitamiento general de la planta, maduración irregular de la cosecha y la reducción en la producción (Alulima, 2012).

➤ Ojo de gallo (*Mycena citricolor*)

Es una enfermedad que se caracteriza por atacar hojas, frutos y tallos tiernos de la planta y se puede reconocer por las manchas oscuras circulares al inicio, que luego se vuelven más claras conforme envejecen, finalizando en la caída del tejido muerto dejando perforaciones en las hojas (Alulima, 2012).

➤ Mal de hilachas (*Corticium koleroga*)

Es un hongo que ataca ramas, hojas y frutos tiernos de café en lugares con sombra excesiva y en condiciones de alta humedad relativa. Durante la época seca del año, el hongo permanece inactivo y al iniciar la temporada lluviosa entra en actividad (Alulima, 2012).

El reconocimiento de esta enfermedad se da fácilmente, ya que las hojas secas desprendidas de las ramas, permanecen plegadas a ellas por medio de unos hilos blancos. Además, los frutos atacados se secan y desprenden (Alulima, 2012).

➤ Mancha de hierro

El hongo *Cercospora coffeicola* ataca los brotes, hojas tiernas y las cerezas de las plantas, pero el ataque más severo se da en éstos últimos, los cuales presentan manchas negras que producen arrugamiento y posterior caída. Esta enfermedad provoca defoliaciones prematuras y un daño en la calidad del grano (Alulima, 2012).

➤ Antracnosis

Durante la estación lluviosa, *Colletotrichum spp* ataca hojas, ramas y frutos. En las hojas se pueden observar manchas irregulares con anillos concéntricos. En las ramas causa la muerte regresiva iniciándose con áreas oscuras en el nudo, en el cual la parte superior se torna necrótica y luego muere y en los granos se presentan lesiones de color oscuro que provocan la momificación de los frutos (Alulima, 2012).

### **Transformación genética de café**

Para muchos cultivos, incluyendo las especies leñosas, un método de transformación genética o no ha sido establecido o es aún bastante laborioso. Estas especies necesitan sistemas de transformación con altas tasas de eficiencia con el fin de beneficiarse del rápido desarrollo de la genómica en plantas con propósitos de investigación de nuevas estrategias de mejoramiento y la transformación genética (Ribas *et al.*, 2011).

El café es de gran importancia tanto para la agricultura como para el comercio, y por esta razón es que se han utilizado técnicas biotecnológicas para su mejoramiento genético. El mejoramiento por ingeniería genética se ha combinado con el mejoramiento tradicional basado en cruzamientos, con el fin de obtener variedades mejoradas ya que la planta de café es semi perenne, con lo que tomaría más de tres décadas el obtener cultivares tolerantes a diversas condiciones bióticas y abióticas en caso de utilizar mejoramiento clásico (Fernández *et al.*, 2010).

Los primeros reportes de transformación genética en café son referidos al co-cultivo de protoplastos con diferentes cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. En 1991 se demostró que tejidos de *C. arabica* L. podían ser infectados por cepas silvestres de esta bacteria (Kumar *et al.*, 2006).

En general, la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* es un método simple, eficiente y barato comparado con los otros sistemas o métodos de transformación. Además, este método cuenta con características útiles como lo es la transferencia de segmentos relativamente largos de ADN con extremos definidos y con un mínimo rearrreglo; integración de un número bajo de copias del gen preferencialmente en las zonas transcripcionales activas de los cromosomas de la planta y una alta calidad y fertilidad de las plantas transgénicas. La frecuencia de éxito en estas transformaciones depende del tipo de explante, el genotipo y las condiciones de selección (Mohammadzadeh *et al.*, 2012).

La transformación genética en café se ha logrado utilizando diferentes tipos de explante como lo son las hojas, callos embriogénicos, embriones somáticos y protoplastos. La eficiencia de los protocolos de transformación disponibles actualmente es muy baja (menos del 1%), limitando directamente su uso rutinario. Por esto, una definición de las condiciones para su optimización es necesaria para facilitar el uso de estas tecnologías en laboratorios con fines de investigación y de producción de plantas de interés agronómico, obteniendo células establemente transformadas y a su vez, altos rendimientos de la misma (Ribas *et al.*, 2011).

### ***Agrobacterium tumefaciens***

La clasificación taxonómica de esta bacteria según Morillo (2011) es la siguiente:

**Dominio:** Bacteria

**Filo:** Proteobacteria

**Clase:** Proteobacterias alfa

**Orden:** Rhizobiales

**Familia:** Rhizobiaceae

**Género:** *Agrobacterium*

**Especie:** *tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria Gram negativa, encapsulada con forma de bastón (bacilo) y no forma esporas pero posee de uno a cuatro flagelos peritricos utilizados para su movilidad. Además, sus colonias en agar se presentan pequeñas, de color blanco, circulares y lisas; mientras que en suspensión presentan ligera turbidez con película fina. Su temperatura óptima de crecimiento se encuentra en un rango entre 25-28°C (Morillo, 2011).

Su tamaño oscila entre los 0.6-1 µm de ancho y 1.6-3 µm de largo. Son bacterias aerobias y la mayoría de las cepas son capaces de crecer en bajas concentraciones de oxígeno en el interior de los tejidos de la planta. Estos organismos pueden utilizar y metabolizar un amplio espectro de carbohidratos, sales de ácidos orgánicos y aminoácidos. Mientras que algunas cepas usan fuentes de nitrógeno como las sales y nitratos de amonio, otras necesitan el aporte de aminoácidos y otros factores de crecimiento adicionales (Llop, 2003).

Las cepas de *Agrobacterium* patógenas contienen un plásmido que induce tumores, el cual se conoce como plásmido Ti. La enfermedad causada por esta bacteria se desencadena cuando genes específicos de este plásmido se transfieren al genoma del huésped y comienzan a codificar enzimas requeridas para la síntesis de fitohormonas que son sobreexpresadas en la célula vegetal, lo que provoca un aumento en la división celular (hiperplasia) y en el tamaño de las células (hipertrofia) que se traduce en la formación de un tumor (Llop, 2003).

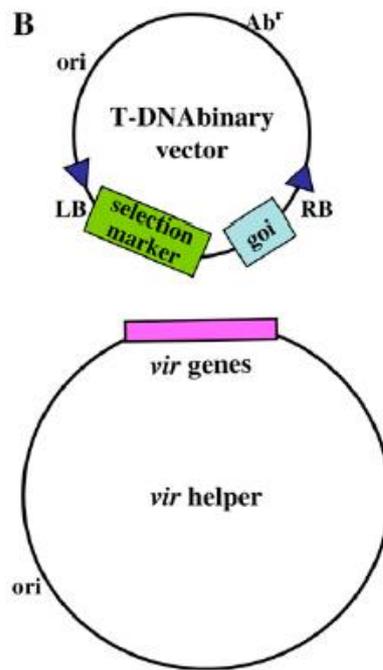
Para entender cómo este organismo puede ser utilizado como un sistema biológico de entrega de ADN, se debe conocer su modo de acción *in vivo*. *Agrobacterium* reconoce moléculas señal como compuestos fenólicos de bajo peso molecular (acetosiringona, hidroxi-acetosiringona, lignina, precursores de flavonoides) y compuestos derivados de un azúcar, los cuales son liberados por un tejido vegetal que presenta algún tipo de herida. Así, la bacteria reconoce los compuestos y se mueve hacia el tejido dañado por quimiotaxia, entra y coloniza los espacios intercelulares del huésped (Pacurar *et al.*, 2011).

El T-ADN en cepas silvestres, el cual es la parte del plásmido Ti que se integra en el genoma vegetal, lleva dos juegos de genes. El primer juego contiene genes oncogénicos que codifican enzimas relacionadas con la síntesis de auxinas y citoquininas, así como en la modificación de los efectos de las fitohormonas en la célula, responsables en conjunto de la formación del tumor. Por su parte, el segundo set de genes se encarga de codificar enzimas para la síntesis de opinas, los cuales se forman de la condensación de aminoácidos y azúcares, y que son usados por la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno (Pacurar *et al.*, 2011).

El plásmido Ti además contiene dos regiones asociadas con la interacción bacteria-planta que no son transferidas a la célula vegetal. La región *vir* contiene un aproximado de 35 genes de virulencia agrupados en al menos 8 operones (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*), los cuales codifican proteínas encargadas de la transferencia e integración del T-ADN. La otra región se encarga del metabolismo y consumo de las opinas (Pacurar *et al.*, 2011).

Con el conocimiento básico sobre cómo se da la transferencia del ADN-T a las plantas, se han desarrollado vectores para su utilización en programas de ingeniería genética, con el fin de introducir genes foráneos en plantas cultivadas. Los genes codificantes para la síntesis de opinas y auxinas, al no ser necesarios para la transferencia del ADN-T, son reemplazados por los genes de interés, sin que se afecte el proceso de transferencia (Valderrama *et al.*, 2005).

Los genes *vir*, al no ser necesario que estén en el mismo plásmido que el ADN-T para que sean funcionales, y el hecho de que el plásmido Ti tiene un tamaño de aproximadamente 200 kilobases, ha forzado al desarrollo de estrategias para reducir el tamaño de estos vectores. Una de las técnicas, es el uso de vectores binarios (Figura 4) (vectores más usados para transformación de plantas), en los cuales *Agrobacterium* posee dos vectores: uno que contiene la región del T-ADN con el gen de interés, y otro con la región *vir* (Valderrama *et al.*, 2005). Entre estos vectores se encuentran los plásmidos de la serie pCAMBIA.



**Figura 4.** Vector binario en *Agrobacterium tumefaciens* Fuente: Lee y Gelvin, 2008.

### Plásmido pCAMBIA 1303

El plásmido pCAMBIA 1303 utiliza una nomenclatura basada en números. Los mismos corresponden a (Marker Gene Technologies, 2014):

- 1: Selección en la planta; con resistencia a higromicina
- 3: Selección en la bacteria; con resistencia a la kanamicina
- 0: Indica el sitio múltiple de clonaje; utilizando el polylinker pUC18
- 3: Indica el gen(es) reportero(s); utilizando el *mgfp5:gusA*

Los genes de selección en plantas en los vectores pCAMBIA son conducidos por la versión de doble-enhancer del promotor CaMV35S y terminado por la señal poliA del mismo virus y el esquema del plásmido puede observarse en la figura 5.

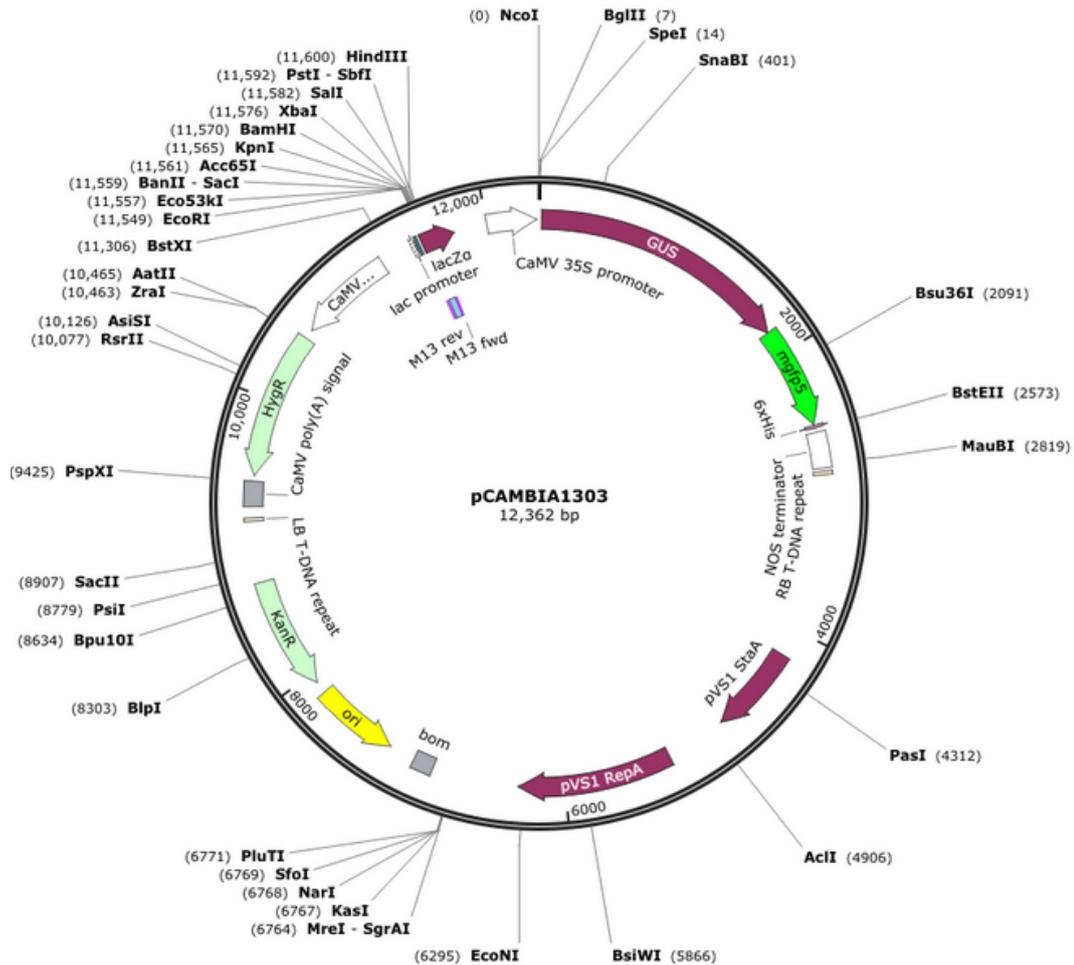
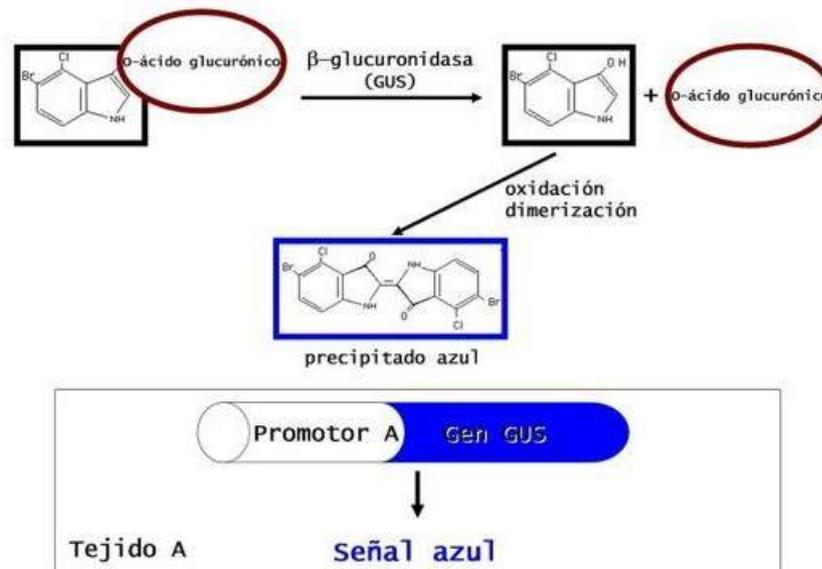


Figura 5. Esquema del plásmido pCAMBIA 1303.

Fuente: Marker Gene Technologies, 2014

### Técnicas utilizadas para determinar la expresión transitoria del transgen

Uno de los genes reporteros más utilizados es el gen *gus*, el cual es obtenido de la bacteria *Escherichia coli*. Este gen permite el monitoreo a corto plazo del resultado de la transformación genética a partir de la producción de color azul en los explantes transformados debido a la acción de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (codificada por dicho gen) sobre el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indolylglucurónico, más conocido como X-Gluc. Esta prueba de expresión transitoria se realiza con la reacción histoquímica GUS (Figura 6), empleada como base para la estandarización de protocolos de transformación eficiente (De Guglielmo, 2009).



**Figura 6.** Esquema de la reacción histoquímica GUS.

**Fuente:** González y Barrero, 2008

El ensayo presenta la ventaja que en la mayoría de las especies vegetales casi no se da actividad endógena GUS, por lo que los resultados obtenidos utilizando esta prueba en plantas transformadas son confiables y poseen alta sensibilidad. A pesar de esto, presenta la desventaja de ser destructivo, con lo que únicamente luego de la conversión de embrión a planta, es posible remover porciones de la planta para realizar el ensayo en órganos específicos y obtener un reconocimiento rápido de las plantas transformadas sin destruir el explante (Duque *et al.*, 2007).

Otro gen reportero utilizado comúnmente es el que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), el cual cuando es expresado en células vegetales y éstas son iluminadas con luz ultravioleta, producen una fluorescencia verde brillante que es fácilmente detectada (Martínez *et al.*, 2004).

Este gen se aisló de la medusa *Aequorea victoria* y presenta muchas ventajas prácticas, ya que su expresión puede observarse en tiempo real en células vivas, no necesita suministrarse ningún sustrato para su expresión y además no destruye el tejido analizado, con lo que no compromete la viabilidad celular. Sin embargo, existen algunas limitaciones en su uso debido a que la autofluorescencia de la clorofila presente en embriones somáticos puede interferir en su emisión de fluorescencia (Duque *et al.*, 2007).

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Establecer un protocolo de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para el mejoramiento genético de la variedad de café (*Coffea arabica* L. var. Catuaí.) con el fin ulterior de conferirle resistencia a enfermedades y plagas.

### **Objetivos específicos**

- Determinar el tipo de explante de café adecuado para la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*
- Determinar la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* adecuada para la transformación genética del café.
- Comprobar la integración de los genes reporteros *gfp* y *gus* en el genoma del café.

## **METODOLOGÍA**

### **Localización**

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica (UCR), Sede Rodrigo Facio, Montes de Oca, San Pedro, Costa Rica.

### **Material vegetal**

Para los experimentos de transformación genética se utilizaron embriones cigóticos y segmentos de hoja (1.5 x 0.75 mm) de vitroplantas de café var. Catuaí. Las semillas utilizadas se obtuvieron del Instituto Costarricense de Café (ICAFFE), mientras que las plantas *in vitro* utilizadas, fueron suministradas por la Escuela de Biología de la UCR.

### **Cepas de *Agrobacterium tumefaciens***

Las cepas de *A. tumefaciens* ATHV (resistencia a 50 mg/l de rifampicina) y GV3101 (resistencia a 50 mg/l de rifampicina + 50 mg/l de gentamicina + 100 mg/l de ampicilina), se transformaron con el plásmido pCAMBIA 1303 (resistencia a 50 mg/l de kanamicina).

### **Miniprep pCAMBIA 1303**

Se tomó una colonia de *Escherichia coli* pCAMBIA 1303 utilizando una punta estéril para pipeta de 1-10 µl y se cultivó en 5 ml de medio LB líquido con 50 mg/l de kanamicina en agitación constante (113 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 los pellets se almacenaron a -20°C. Para la obtención del ADN plasmídico pCAMBIA 1303 proveniente de *Escherichia 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* ATHV y GV3101 utilizando una punta estéril para pipeta de 1-10  $\mu$ l y se cultivó en 5 ml de medio LB líquido con el respectivo antibiótico 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 CaCl<sub>2</sub> 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 CaCl<sub>2</sub> frío. Finalmente, se alicuotaron 100  $\mu$ l de células competentes para ser almacenados a -20°C.

### **Transformación de *A. tumefaciens* ATHV y GV3101 con el plásmido pCAMBIA1303**

Las células competentes de *Agrobacterium* se descongelaron lentamente en hielo y se les agregó 1  $\mu$ g de ADN del plásmido pCAMBIA 1303. Los tubos se colocaron en hielo por 30 minutos y luego 15 minutos en nitrógeno líquido. Luego, los tubos se incubaron por 5 minutos a 37°C en un baño María y se les agregó 150  $\mu$ l de medio LB líquido (sin antibiótico) y se incubaron a 28°C en agitación constante a 100 rpm por 3 horas. Finalmente, la solución se cultivó en medio LB sólido con los respectivos antibióticos y se incubó por 48 horas a 28°C. Transcurrido este período, se determinó el número de colonias que crecieron en el medio complementado con el antibiótico kanamicina.

## Medios de cultivo

**Cuadro 1.** Composición de los medios de cultivo utilizados en la transformación genética de *C. arabica* L. var. Catuaí con *A. tumefaciens*

Medio de cultivo	Componentes del medio
Medio de pre-cultivo sólido	Medio Yasuda <i>et al.</i> (1985) suplementado con 1.1 mg/l de bencilaminopurina (BAP).
Medio de cocultivo sólido	Medio Yasuda <i>et al.</i> (1985) suplementado con 1.1 mg/l de BAP y 200 µM de acetosiringona.
Medio de post-cultivo sólido	Medio Yasuda <i>et al.</i> (1985) suplementado con 1.1 mg/l de BAP y 250 mg/l de cefotaxime
Medio de cocultivo líquido	Medio Yasuda <i>et al.</i> (1985) suplementado con 1.1 mg/l de BAP, 1.9 g/l de ácido 2-(N-Morfolino) etanosulfónico (MES) y 200 µM de acetosiringona
Medio LB ATHV::1303	Medio Luria Bertani (LB) suplementado con 100 mg/l de rifampicina y 50 mg/l de kanamicina
Medio LB GV3101::1303	Medio LB suplementado con 100 mg/l de rifampicina, 50 mg/l de kanamicina y 50 mg/l de ampicilina
Medio de selección de plantas transformadas	Medio Murashige & Skoog (1962) complementado con 100 mg/l de Myo-Inositol, 200 mg/l de Caseína hidrolizada, 100 mg/l de Extracto de malta, 4 mg/l de glicina, 1 mg/ml de BAP y 5 mg/l de higromicina.

### **Desinfección de las semillas y extracción de embriones cigóticos.**

A las semillas de café se les eliminó el pergamino y fueron colocadas en agua destilada por 16 horas. Luego, las semillas se colocaron en agua destilada y jabón por 5 minutos en agitación constante y luego en alcohol al 70% v/v por 5 minutos. Posteriormente, las semillas se sumergieron en NaOCl al 3.0% i.a por 30 minutos. Luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril en cámara de flujo laminar.

Con técnica aséptica se procedió a extraer los embriones cigóticos de las semillas. Los embriones se colocaron en una placa Petri con agua destilada estéril. Luego se pasaron a una solución de NaOCl al 0.01% i.a por 5 minutos con agitación manual para luego ser lavados 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, se colocaron en papel toalla estéril y se cultivaron 10 embriones por medio de pre-cultivo sólido en condiciones de oscuridad a 25°C por 48 horas.

### **Amplificación de los genes *virG* y *gfp* en las cepas de *A. tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1303 utilizadas en la transformación**

Utilizando las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::1303 y GV3101::1303 (transformadas con el plásmido pCAMBIA 1303), se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers para el gen *virG* y otra con los primers específicos para el gen *gfp*, esto con el fin de corroborar la presencia de los genes en las cepas.

En el caso de la amplificación de un fragmento del gen *virG*, la reacción se llevó a cabo en volúmenes de 25 µl, los cuales contienen 1 µl de ADN genómico, 0.5 U de Taq polimerasa, 1X de Buffer 10 X + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 µM de cada primer (At\_ *virG*\_1\_Forward: 5'-GCCGACAGCACCCAGTTCAC-3' y At\_ *virG*\_1\_Reverse: 5'-CCTGCCGTAAGTTTCACCTCAC-3') y H<sub>2</sub>O. El programa de amplificación se llevó a cabo con un primer ciclo de desnaturalización de cinco minutos a 94°C; treinta y cinco ciclos de: a) un minuto de desnaturalización a 94°C, b) un minuto de alineamiento a 60°C, c) un minuto de extensión a 72°C; y un último ciclo de extensión a 72°C por diez minutos. Se utilizaron controles negativos con agua y el plásmido pCAMBIA 1303 y positivos con ADN de las cepas silvestres ATHV y GV3101.

Para la amplificación del fragmento del gen *gfp*, la reacción se llevó a cabo en volúmenes de 25 µl, los cuales contienen 1 µl de ADN genómico, 0.5 U de Taq polimerasa, 1X de Buffer 10 X + (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.2 mM de cada dNTP, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.3 µM de cada primer (GFP\_1\_Forward: 5'-ATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGG-3' y GFP\_1\_Reverse: 5'-TTATTTGTATAGTTCATCCATGCATGTG-3') y H<sub>2</sub>O. El programa de amplificación se llevó a cabo con un primer ciclo de desnaturalización de tres minutos a 94°C; treinta y cinco ciclos de: a) un minuto de desnaturalización a 94°C, b) un minuto de alineamiento a 60°C, c) un minuto de extensión a 72°C; y un último ciclo de extensión a 72°C por diez minutos. Se utilizaron controles negativos con agua y positivos con el plásmido pCAMBIA 1303

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con 1.5 µl de GELRED para ser corridos por una hora a 100 voltios y transcurrido este tiempo se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVITEC Cambridge y se fotografió con un equipo UVIsave HD5.

### **Transformación genética de café mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

Se realizaron 4 experimentos utilizando dos tipos de explante de *Coffea arabica* L. var. Catuaí y dos cepas bacterianas de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1303 (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Experimentos realizados en la transformación genética de *C. arabica* L. var. Catuaí con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::1303 y GV3101::1303.

<b>Cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i></b>	<b>Tipo de explante</b>	<b>Número de explantes transformados</b>	<b>Densidad óptica (DO<sub>600nm</sub>)</b>
ATHV::1303	Segmentos de hoja	200	0.583
ATHV::1303	Embriones cigóticos	140	0.546
GV3101::1303	Segmentos de hoja	100	0.652

GV3101::1303	Embriones cigóticos	140	0.557
--------------	------------------------	-----	-------

Cuatro días previos a la transformación, se cultivó una colonia de la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::1303 y GV3101::1303 en 5 ml de medio LB líquido con los respectivos antibióticos. Este cultivo se colocó 48 horas a 220 rpm y 28°C.

Luego, los 5 ml de suspensión bacteriana se cultivaron en 45 ml de medio LB líquido con los respectivos antibióticos + 100 mM de acetosiringona en agitación a 220 rpm por 48 horas a 28°C.

El día de la transformación, los cultivos bacterianos se distribuyeron en tubos Falcon de 50 ml y se centrifugaron a temperatura ambiente a 3500 rpm por 20 minutos y posteriormente se desechó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 20 ml de medio de cocultivo líquido. Se realizó una dilución 1:10 en la que se tomaron estos 20 ml de suspensión y se diluyeron en 180 ml de medio de cocultivo líquido. Para realizar la determinación de  $DO_{600nm}$ , se tomaron dos cubetas de Nanofotómetro IMPLEN. En una de ellas, se agregó 1 ml de medio de cocultivo líquido (utilizado como blanco) y en la otra cubeta se agregó 1 ml de suspensión bacteriana (muestra). La determinación se realizó en el Nanofotómetro IMPLEN, obteniendo una  $DO_{600nm}$  de entre 0.5 y 1.0.

La solución bacteriana (10 ml) se distribuyó en placas Petri y se colocaron 10 explantes por placa, los cuales se colocaron en una bomba de vacío por 30 minutos y posteriormente se colocaron en agitación constante a 100 rpm por 30 minutos. Transcurrido este tiempo se eliminó la suspensión bacteriana de las placas Petri, se tomó una alícuota de 100 µL para ser distribuida en medio sólido LB con los respectivos antibióticos y se rayó con el asa microbiológica para comprobar la viabilidad de la bacteria.

Posteriormente, los explantes se colocaron en papel toalla autoclavado para eliminar restos de suspensión bacteriana. Dichos explantes se cultivaron en medio de cocultivo sólido y las placas se colocaron en oscuridad por 48 horas a 28°C.

Transcurridas las 48 horas, los explantes se colocaron en placas Petri asépticas y se les agregó agua destilada bajo agitación constante a 100 rpm por 15 minutos. Este paso se repitió tres veces. Adicionalmente, los explantes se lavaron con agua destilada estéril + 500 mg/l de cefotaxime en agitación constante a 100 rpm por 30 minutos.

De cada lavado realizado, se tomó una alícuota de 100 µl y se distribuyó en medio sólido LB con los respectivos antibióticos y se rayó con el asa microbiológica para comprobar la viabilidad de la bacteria.

Para eliminar los restos de suspensión bacteriana, los explantes se secaron con papel toalla autoclavado y luego se cultivaron en medio de post-cultivo sólido. La expresión transitoria fue analizada 48 horas después mediante la prueba histoquímica de GUS.

### **Prueba histoquímica GUS para evaluar la expresión transitoria**

Dos días después de la transformación, se procedió a analizar la expresión transitoria del gen *gus* en los explantes transformados. Además, se realizó una prueba adicional a los explantes un mes después de transformados para verificar la estabilidad de la expresión del gen *gus*. La cantidad de explantes de cada transformación utilizados para realizar las pruebas se muestran en el cuadro 3.

**Cuadro 3.** Número de explantes por cada tratamiento utilizados para la prueba histoquímica GUS ( $\beta$ -glucuronidasa)

Cepa de <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Tipo de explante	Número de explantes evaluados dos días después de la transformación		Número de explantes evaluados 4 semanas después de la transformación	
		transformados	controles	transformados	controles
ATHV::1303	Segmentos de hoja	36	4	21	3
ATHV::1303	Embriones cigóticos	18	3	18	3
GV3101::1303	Segmentos de hoja	20	4	21	3
GV3101::1303	Embriones cigóticos	18	3	18	3

Los explantes se colocaron en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se agregó 1 ml de buffer de tinción [0.5 M de buffer de Fosfato de Sodio ( $\text{NaPO}_4$ ) a pH 7, 10% de Triton X-100, 0.1 M de Ferrocianuro de potasio ( $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), 0.1 M de Ferricianuro de potasio ( $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ), 0.5 M de EDTA, 20% de metanol y agua]. Los tubos se colocaron a  $-20^\circ\text{C}$  por una hora. Transcurrido este tiempo, se agregó 2  $\mu\text{l}$  de sustrato X-Gluc (7 mg de X-Gluc disueltos en 20  $\mu\text{l}$  de DMSO) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas.

Se eliminó la solución de los tubos y se agregó 1 ml de una solución de alcohol 95/ ácido acético (3:1) y se mantuvo por 48 horas a temperatura ambiente. Los explantes se colocaron en papel toalla para ser observados con el estereoscopio Nikon y se contaron cuantos explantes presentaban coloración azul y el número de puntos azules por explante.

Como controles negativos se utilizaron explantes a los cuales no se les aplicó el proceso de transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

### **Extracción de ADN de explantes transformados**

De los explantes transformados con el mejor protocolo de transformación (mejor cepa bacteriana y tipo de explante) se realizó una extracción de ADN para posteriormente utilizar este material en una amplificación de los genes *gfp* y *virG* mediante PCR.

Se tomaron 11 frascos con supuestos explantes transformados y un frasco control (explante sin transformar). Cada frasco contenía tres explantes, los cuales se pesaron para obtener un peso total de 100 mg de tejido y se colocaron en tubos Eppendorf con 500  $\mu\text{l}$  de Buffer de extracción (50 mM de Tris-HCl, pH 8, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 10 mM de Mercaptoetanol y 4% de Triton X-100) y 2 balines estériles. Se colocaron en el macerador marca Retsch® por 8 minutos a máxima frecuencia para luego centrifugar el macerado a 14000 rpm por 2 minutos. El sobrenadante se transfirió a otro tubo Eppendorf de 1.5 ml y se le agregaron 300  $\mu\text{l}$  de Buffer P3 (previamente diluido en una relación 1:2 de buffer P3 y etanol absoluto) del kit de extracción de ADN marca OMEGA y se mezcló por inversión del tubo 3 veces. El contenido se pasó a una columna para ser centrifugado a 14000 rpm por 1 minuto y luego la columna se transfirió a un tubo de colecta nuevo. Se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de buffer de lavado (previamente diluido en una relación 1:1,5 de buffer de lavado y etanol absoluto) y se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm. Se descartó el líquido y se volvió a agregar buffer de lavado, se centrifugó y

se descartó el líquido para luego colocar la columna en un tubo nuevo de colecta que se centrifugó a 14000 rpm por 2 minutos para eliminar restos del buffer de lavado y a la vez, secar la columna. Se colocó la columna en un tubo de 1.5 ml y se agregaron 100 µl de agua para PCR previamente calentada a 65°C, se dejó reposar 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm. Se descartó la columna y el líquido obtenido (que contiene el ADN) se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Se realizó la cuantificación del ADN extraído por medio del Nanodrop Lite, utilizando para ello 1.5 µl de cada muestra y 1.5 µl de agua para PCR como blanco.

### **Amplificación del gen codificante de la proteína verde fluorescente (GFP)**

Con el ADN obtenido de los supuestos explantes transformados, se realizó una PCR, esperándose un fragmento de aproximadamente 790 bp correspondiente a un fragmento del gen *gfp*. Se utilizaron controles negativos (agua) y positivos (ADN plasmídico de pCAMBIA 1303). La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones anteriormente descritas.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con 1.5 µl de GELRED para ser corridos por una hora a 100 voltios y transcurrido este tiempo se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVITEC Cambridge y se fotografió con un equipo UVIsave HD5.

### **Amplificación del gen *virG***

Con ADN obtenido de los explantes transformados positivos para el gen *gfp*, se realizó una PCR, esperándose un fragmento de aproximadamente 390 bp correspondiente al gen *virG*. La amplificación se llevó a cabo de acuerdo a las especificaciones anteriormente descritas.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con 1.5 µl de GELRED para ser corridos por una hora a 100 voltios y transcurrido este tiempo se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVITEC Cambridge y se fotografió con un equipo UVIsave HD5.

### **Amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S**

Con ADN obtenido de los explantes de café transformados y no transformados, se realizó una PCR para asegurarse de su integridad y calidad, esperándose un fragmento de aproximadamente 481 bp correspondiente a la región 18S.

La reacción se llevó a cabo en volúmenes de 25  $\mu$ l, los cuales contienen 5  $\mu$ l de ADN genómico, 0.5 U de Taq polimerasa, 1X de Buffer 10 X +  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.25 mM de cada dNTP, 1.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0.2  $\mu$ M de cada primer (18S\_1\_Forward: 5'-AGGTAGTGACAATAAATAACAA-3' y 18S\_1\_Reverse: 5'-TTTCGCAGTTGTTTCGTCCTTC-3') y  $\text{H}_2\text{O}$ . El programa de amplificación se llevó a cabo con un primer ciclo de desnaturalización de diez minutos a 95°C; treinta ciclos de: a) treinta segundos de desnaturalización a 94°C, b) treinta segundos de alineamiento a 53°C, c) un minuto y treinta segundos de extensión a 72°C; y un último ciclo de extensión a 72°C por diez minutos.

Los productos de PCR se cargaron en un gel de agarosa al 1% y se tiñeron con 1.5  $\mu$ l de GELRED para ser corridos por una hora a 100 voltios y transcurrido este tiempo se observó el gel en un transiluminador de luz ultravioleta marca UVITEC Cambridge y se fotografió con un equipo UVIsave HD5.

### **Selección de plantas transformadas**

Transcurridas cuatro semanas después de la transformación mediada por *A. tumefaciens*, los embriones cigóticos se cultivaron en frascos tipo Gerber con 20 ml de medio de selección (medio MS con 100 mg/l de myo-Inositol, 200 mg/l de caseína hidrolizada, 100 mg/l de extracto de malta, 4 mg/l de glicina y 1 mg/ml de BAP) complementado con 5 mg/l de higromicina. Se cultivaron tres explantes por frasco. Se colocaron en condiciones de 12 h luz/12 h oscuridad a 25°C. Se incluyeron controles no transformados.

## RESULTADOS

### Evaluación de la transformación de las cepas ATHV y GV3101 de *A. tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA1303

Luego de la transformación de las cepas de *A. tumefaciens* ATHV y GV3101 con el plásmido pCAMBIA 1303, se observó el crecimiento de colonias en los diferentes medios de cultivo empleados (Cuadro 4 y 5), donde se obtuvieron 40 y 38 colonias de ATHV y GV3101 respectivamente transformadas con el plásmido pCAMBIA 1303 (Figuras 7A y 7B).

**Cuadro 4.** Evaluación del crecimiento de las colonias en los diferentes medios de cultivo luego de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV con el plásmido pCAMBIA 1303

Medio de cultivo	pCAMBIA 1303/choque térmico	H <sub>2</sub> O/choque térmico	pCAMBIA 1303/sin choque térmico
LB	✓	✓	✓
LB + 50 mg rifampicina	✓	✓	✓
LB + 50 mg rifampicina + 50 mg kanamicina	✓ 40 colonias	X	X
LB + 25 mg spectinomocina	X	X	X

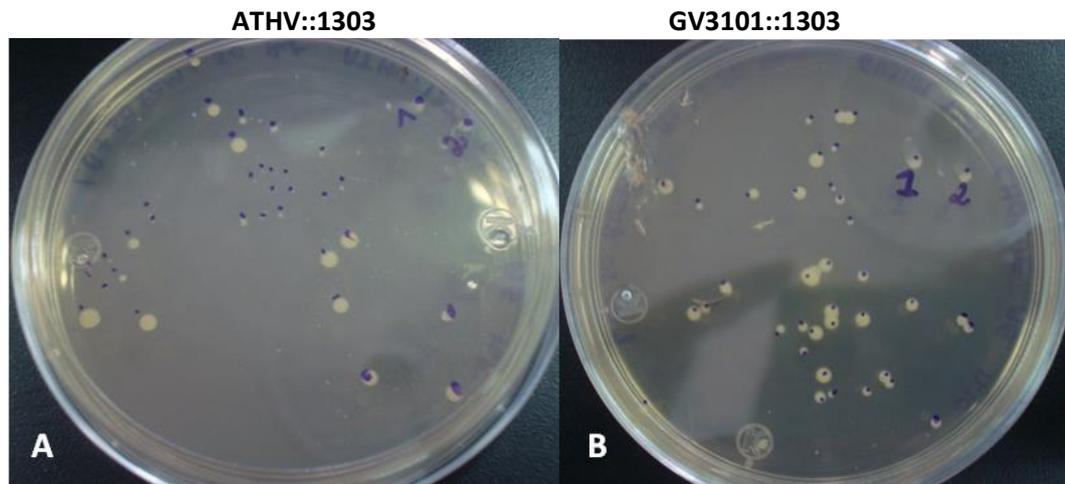
✓ se refiere al crecimiento de colonias en el medio y X se refiere a la ausencia de las mismas en el medio.

**Cuadro 5.** Evaluación del crecimiento de colonias en los diferentes medios de cultivo luego de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 con el plásmido pCAMBIA 1303

Medio de cultivo	pCAMBIA 1303/choque térmico	H <sub>2</sub> O/choque térmico	pCAMBIA 1303/sin choque térmico
LB	✓	✓	✓
LB + 50 mg rifampicina + 100 mg ampicilina	✓	✓	✓
LB + 50 mg rifampicina + 100 mg ampicilina + 50 mg kanamicina	✓ 38 colonias	X	X
LB + 25 mg spectinomocina	X	-	-

✓ se refiere al crecimiento de colonias en el medio y X se refiere a la ausencia de las

mismas en el medio.

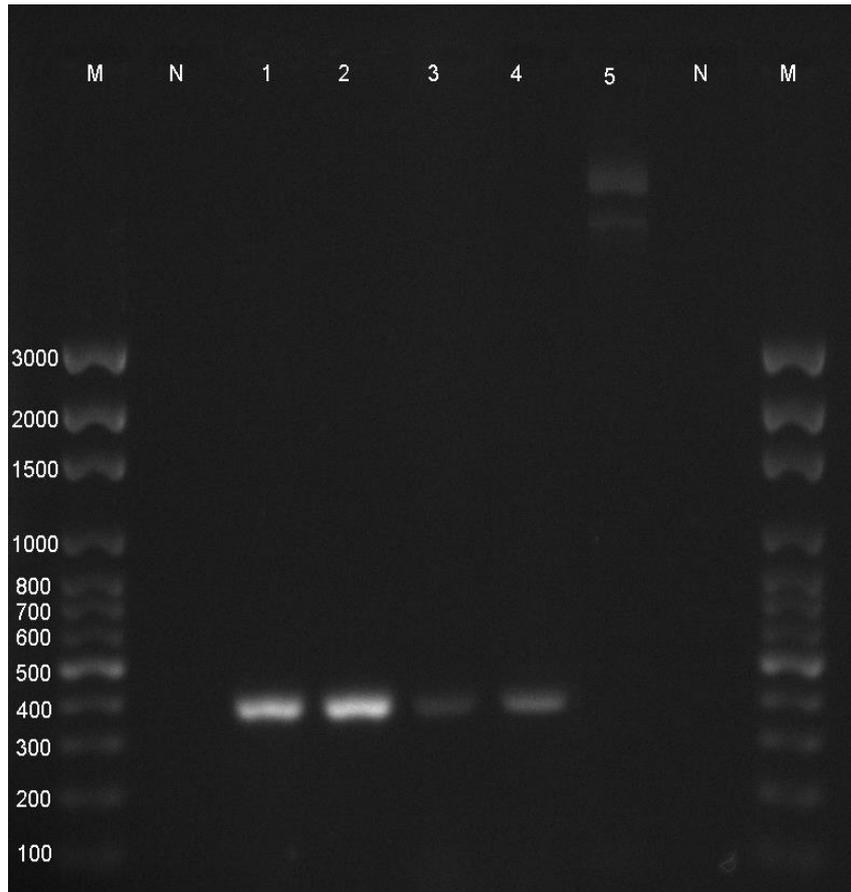


**Figura 7.** Colonias obtenidas luego de la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV y GV3101 con el plásmido pCAMBIA 1303. (A) Colonias de ATHV::1303 (B) Colonias de GV3101::1303

#### **Comprobación de la transformación de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1303**

Luego de realizar la amplificación por PCR del gen *virG* en las cepas silvestres de *Agrobacterium tumefaciens* ATHV y GV3101, así como las cepas transformadas con el plásmido pCAMBIA 1303, se observó una banda de aproximadamente 390 bp correspondiente a un fragmento del gen *virG* amplificado en todas las cepas de *Agrobacterium* (Figura 8).

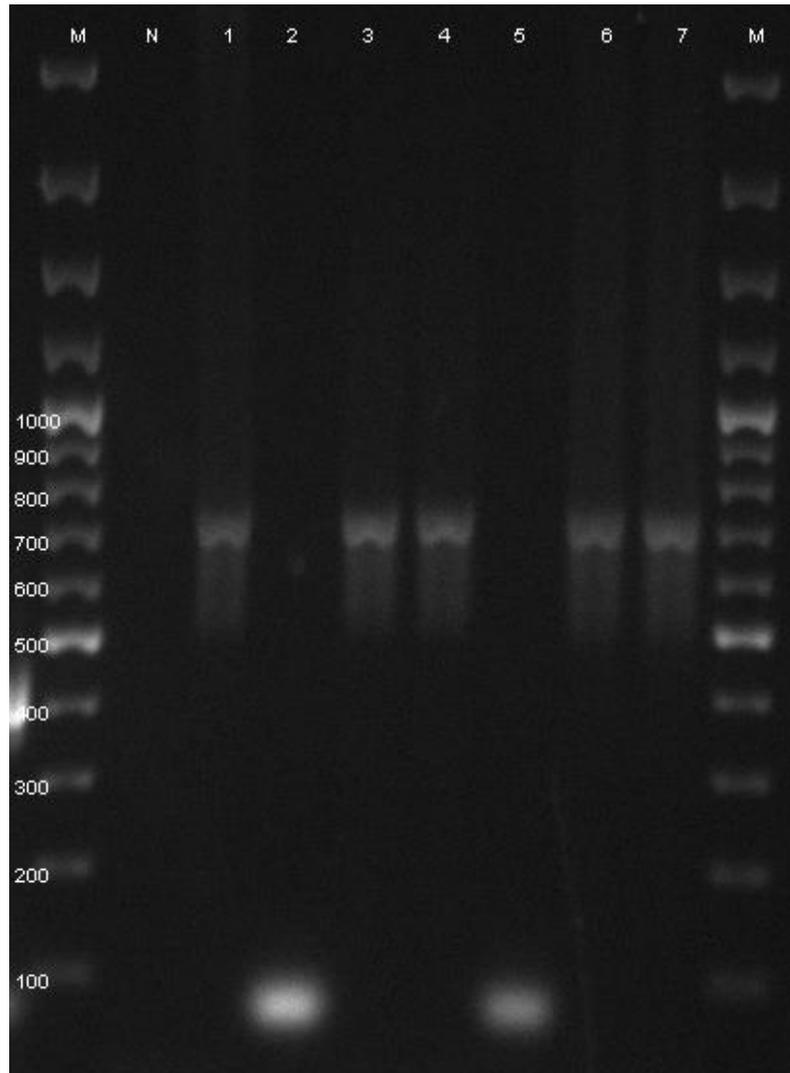
No se observó la banda al utilizar el ADN del plásmido pCAMBIA 1303.



**Figura 8.** Electroforesis con productos amplificados del gen *virG* en *Agrobacterium tumefaciens* (M) marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) control negativo (agua) (1) *A. tumefaciens* ATHV (2) *A. tumefaciens* ATHV::1303 (3) *A. tumefaciens* GV3101 (4) *A. tumefaciens* GV3101::1303 (5) Control con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303

Para el caso de la amplificación del gen correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP), el cual se encuentra en el plásmido pCAMBIA 1303, se observaron los fragmentos esperados, en los cuales ambas cepas bacterianas transformadas con el plásmido pCAMBIA 1303 muestran una banda de aproximadamente 790 bp (Figura 9).

En las cepas silvestres ATHV y GV3101 no se observó una banda para el gen *gfp*.



**Figura 9.** Electroforesis con productos amplificados del gen *gfp* en *Agrobacterium tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1303 (M) Marcador Molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) control negativo (agua) (1) control con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303 (2) control con *A. tumefaciens* ATHV (3-4) productos amplificados de la cepa ATHV::1303 (5) control con *A. tumefaciens* GV3101 (6-7) productos amplificados de la cepa GV3101::1303

**Expresión transitoria del gen *gus* en los tejidos de café transformados con *A. tumefaciens* ATHV::1303 y GV3101::1303**

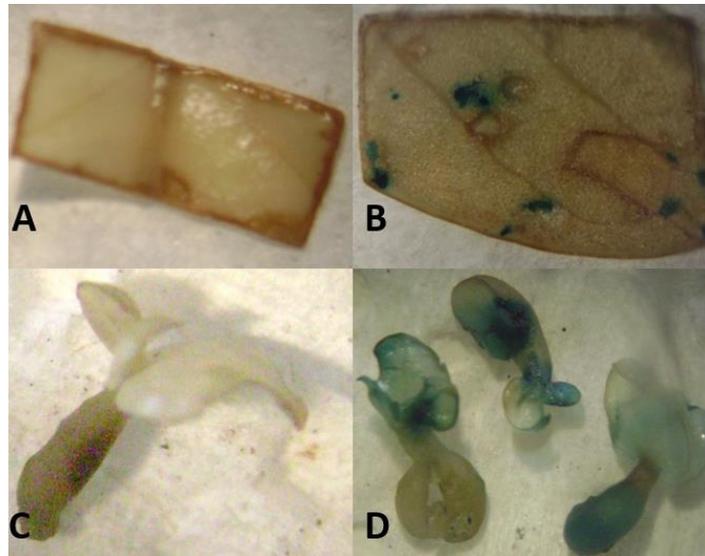
Para la determinación del tipo de explante más adecuado para realizar la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, en el cuadro 6 se observa que basándose en los resultados obtenidos de la prueba de expresión transitoria del gen *gus*, los embriones cigóticos obtuvieron mejores porcentajes de transformación que los segmentos de hoja tanto a los dos días como a las cuatro semanas posteriores a la transformación. Asimismo, al comparar los porcentajes de transformación entre las dos cepas de *A. tumefaciens* en la transformación de los embriones cigóticos, se observa que la cepa ATHV::1303 obtuvo los mejores resultados de expresión del gen *gus*. Así, se determinó que la mayor expresión transitoria del gen *gus* se observó al utilizar la cepa ATHV::1303 y embriones cigóticos, tanto a los dos días como a las 4 semanas posteriores a la transformación genética.

**Cuadro 6.** Expresión transitoria del gen *gus* en segmentos de hoja y embriones cigóticos a los dos días y cuatro semanas después de la transformación con *A. tumefaciens* ATHV::1303 y GV3101::1303

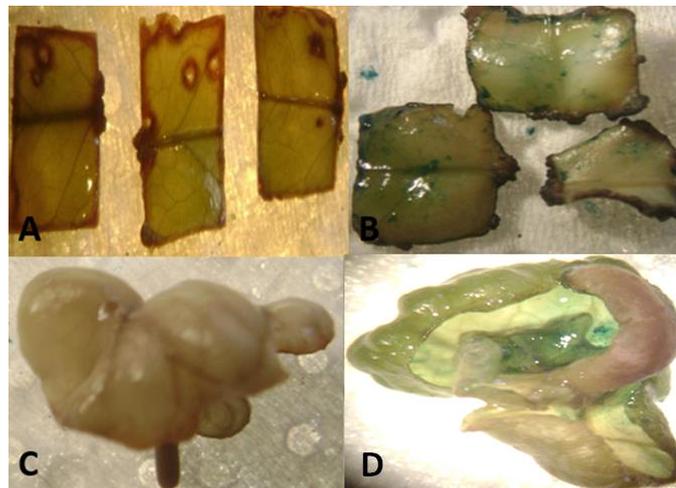
Bacteria	Tipo de explante	Dos días		Cuatro semanas	
		% Explantes transformados	# Foci por explante <sup>a</sup>	% Explantes transformados	# Foci por explante <sup>a</sup>
ATHV::1303	Embriones cigóticos	100,0	1,0±0,0	50,0	1,3±1,6
GV3101::1303		61,1	0,9±1,1	38,9	0,7±1,0
----		0,0	0,0±0,0	0,0	0,0±0,0
ATHV::1303	Segmentos de hoja	61,1	2,1±3,2	0,0	0,0±0,0
GV3101::1303		45,0	1,8±3,3	42,9	0,4±0,5
----		0,0	0,0±0,0	0,0	0,0±0,0

**a: Promedio ± desviación estándar**

Como se muestra en las figuras 10 y 11, se observó una coloración azul en algunas áreas o zonas de los segmentos de hoja y embriones cigóticos analizados, evidenciando la expresión del gen *gus*. Dicha coloración no se observó en los controles negativos.



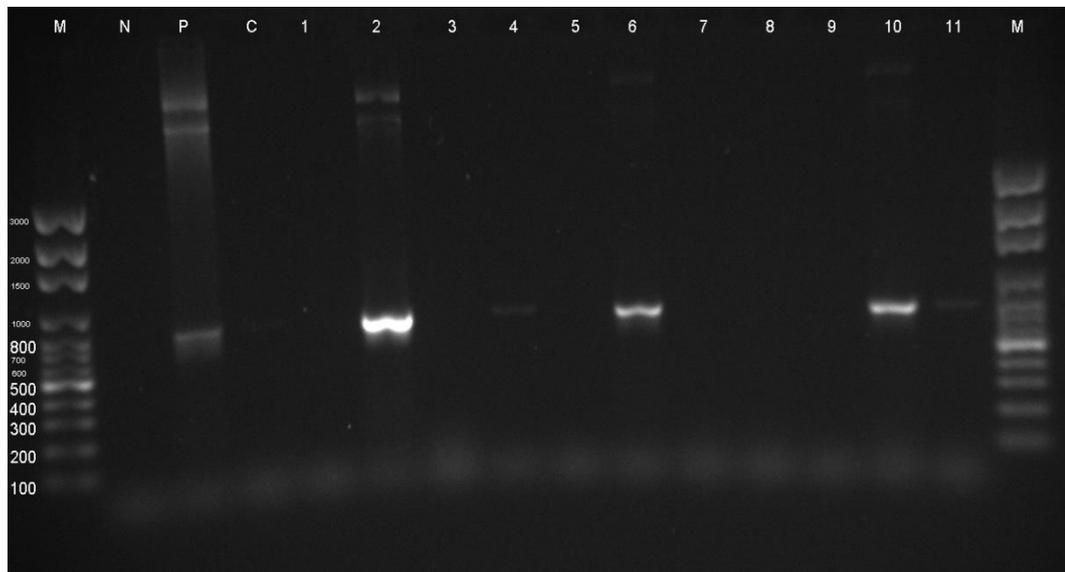
**Figura 10.** Expresión transitoria del gen reportero *gus* a los 2 días posteriores a la transformación genética con *A. tumefaciens*. A) Control negativo con segmento de hoja no transformado; B) Segmento de hoja transformado; C) Control negativo con embrión cigótico no transformado; D) Embriones cigóticos transformados.



**Figura 11.** Expresión estable del gen reportero *gus* a las 4 semanas posteriores a la transformación genética con *A. tumefaciens*. A) Control negativo con segmentos de hoja no transformados; B) Segmentos de hoja transformados; C) Control negativo con embrión cigótico no transformado; D) Embrión cigótico transformado.

### **Integración del gen *gfp* en los explantes transformados con *A. tumefaciens* ATHV::1303**

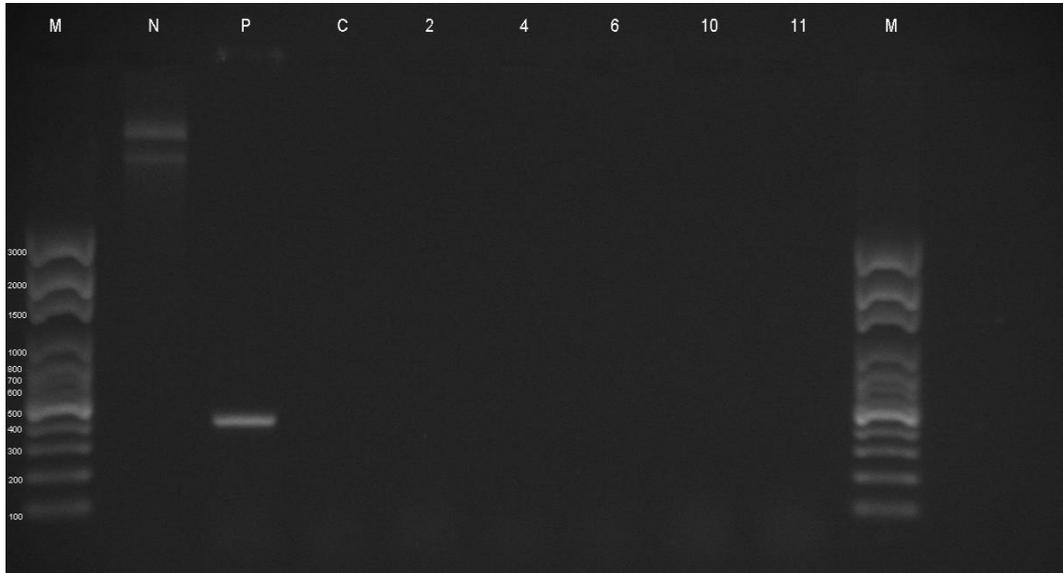
Con las muestras de ADN extraídas de los embriones cigóticos transformados con *A. tumefaciens* ATHV::1303, se realizó una PCR para amplificar un fragmento del gen *gfp*, el cual se encontraría presente en caso que las supuestas plantas transgénicas hayan incorporado en su genoma el plásmido pCAMBIA 1303. En la figura 12 se muestran los resultados de la amplificación, en los cuales se observa un fragmento de aproximadamente 790 bp correspondiente al gen *gfp* en las muestras 2, 4, 6, 10 y 11. Así, se obtuvo un porcentaje de embriones transgénicos del 45.5%, provenientes de 11 muestras correspondientes a un pool de 33 explantes, donde cada muestra equivale a los 3 explantes utilizados en la extracción de ADN.



**Figura 12.** Amplificación de un fragmento del gen *gfp* de las supuestas plantas transformadas (M) Marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) Control negativo (agua) (P) Control positivo con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303 (C) Control con planta no transformada (1-11) Productos de PCR de muestras de ADN de diferentes explantes transformados

### Amplificación del gen *virG* en supuestas plantas transgénicas

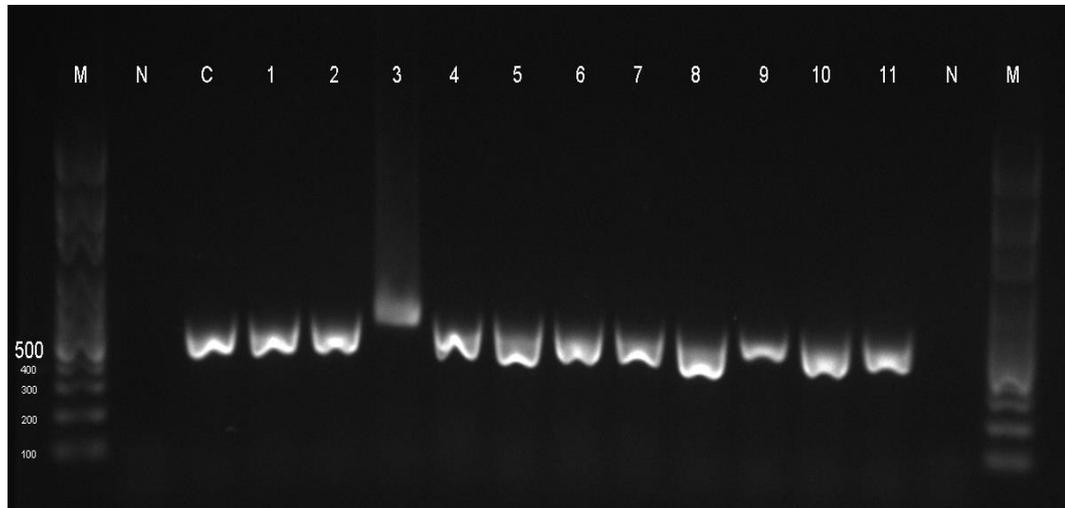
Con los explantes positivos para el gen *gfp*, se realizó la amplificación del gen *virG*, el cual se puede observar en la figura 13.



**Figura 13.** Amplificación de un fragmento del gen *virG* de plantas transformadas (M) Marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) Control negativo con ADN plasmídico de pCAMBIA 1303 (P) Control positivo con ADN de *A. tumefaciens* ATHV::1303 (C) Producto de PCR con ADN control con planta no transformada (2, 4, 6, 10, 11) Productos de PCR de muestras de ADN de diferentes explantes transformados positivos para el gen *gfp*.

### Amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S en los explantes transformados con *A. tumefaciens* ATHV::1303

En la figura 14 se observa una banda correspondiente al fragmento amplificado del gen de la subunidad ribosomal 18S en todas las muestras analizadas.



**Figura 14.** Amplificación de la región 18S (M) Marcador molecular de 100 bp (Phenix Research) (N) Control negativo (agua) (C) Producto de PCR de muestra de ADN de planta no transformada (1-11) Productos de PCR de muestras de ADN de diferentes explantes transformados

## DISCUSIÓN

Esta investigación tuvo por objetivo establecer un protocolo de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para el mejoramiento genético de la variedad Catuaí de café (*Coffea arabica* L.). Para ello, se determinó el tipo de explante adecuado y la mejor cepa de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación genética de café.

En una primera instancia, se analizaron dos cepas de *A. tumefaciens* (ATHV y GV3101) para asegurar su identidad y que contaran con los elementos genéticos necesarios para que la transformación genética pudiera llevarse a cabo. Esto se llevó a cabo por medio de la técnica de PCR y utilizando cebadores que amplifican el gen *virG* y *gfp*.

Se comprobó la presencia de la región *virG* en las bacterias utilizadas (Figura 8), al amplificarse un fragmento del mismo de un tamaño aproximado de 390 bp (Horlemann et al., 2003). Estas cepas poseen un vector binario, en el cual los genes virulentos (*vir*) y el T-ADN, se encuentran ubicados en diferentes plásmidos dentro de la bacteria, con lo que la amplificación obtenida fue la esperada, asegurando que el proceso de transformación genética posterior pudiera realizarse.

Además, con el uso de cebadores específicos para el gen *gfp*, incluido en el plásmido pCAMBIA 1303, se logró observar un fragmento de aproximadamente 790 bp (Gatica, 2012) en ambas cepas bacterianas transformadas, indicando la integración eficiente del plásmido pCAMBIA 1303 en las cepas de *A. tumefaciens*.

### **Optimización del protocolo de transformación genética en café.**

Existen diferentes factores que intervienen en la transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium*, lo cual finalmente determina el éxito o fracaso en la transferencia del gen de interés, así como su posterior integración y expresión. A pesar que estos factores varían entre especies, la edad de la planta, el tipo de tejido y la cepa de *Agrobacterium* a utilizar, el tiempo y condiciones de inoculación del tejido con la bacteria, densidad y período de precultivo de la bacteria, deben ser tomados en cuenta (Valderrama et al., 2005).

Algunas cepas de *Agrobacterium* son más virulentas que otras en especies determinadas, y algunos genotipos son más o menos sensibles a diferentes cepas. Estas variaciones pueden deberse a diferencias en la habilidad de la bacteria de atacar las células vegetales o por su maquinaria de transferencia de T-ADN. Por estas razones, la compatibilidad entre la cepa y el cultivo a usar es un factor importante en el establecimiento y optimización de un protocolo de transformación genética (Khidr, 2007).

Se ha descrito que la utilización de compuestos fenólicos en la realización de la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* mejora el porcentaje y la eficiencia de la transformación, ya que el aumento en la cantidad de estas sustancias logra una mayor inducción de los genes *vir*, al ser la acetosiringona una de las sustancias que la planta libera en condiciones *in vivo* cuando sufre alguna herida (Blanco *et al.*, 2003).

Por su parte, el uso de la agroinfiltración en el protocolo ha sido referido como un método efectivo en la transformación genética de cultivos como el frijol (Liu *et al.*, 2005), algodón (Leelavathi *et al.*, 2004), trigo (Cheng *et al.*, 1997) y café (Canche-Moo *et al.*, 2006). Así, al sumergirse la planta huésped en una suspensión bacteriana líquida y ser sometida a una disminución de presión seguida de una rápida re-presurización, se logró la introducción de la bacteria al interior del tejido vegetal, esto aunado al hecho de que se colocaron los explantes con la bacteria en agitación para aumentar más el contacto entre el microorganismo y el explante, mejorando la penetración y así ampliando la eficiencia en la transferencia (Subramanyam *et al.*, 2010). Canche-Moo *et al.* (2006) lograron rendimientos del 33% en la transformación de embriones de *Coffea canephora* al utilizar en la metodología tiempos de infiltración al vacío de 4 minutos a 400 mm de Hg.

En estudios realizados en semillas de lenteja (*Lens culinaris*), al combinar la estrategia de sonicación con 5 minutos de infiltración, se mejoró la actividad transitoria GUS en 68% de los explantes (Chopra *et al.*, 2012). Asimismo, en semillas de girasol (*Helianthus annuus* L.) la aplicación de vacío resultó en una mejor eficiencia de transformación que la sonicación con un 16.5% y 2.5% de eficiencia respectivamente (Sujatha *et al.*, 2012).

Los días de cocultivo del explante con la bacteria son de vital importancia en un sistema de transformación genética. A pesar que éste podría debilitar el crecimiento del explante e influenciar la tasa de transformación (Ying *et al.*, 2013), en este caso los dos días empleados no parecieron afectar el crecimiento y desarrollo de los transformantes.

En una transformación de *C. arabica* con *Agrobacterium tumefaciens*, Acuña (2002) determinó después de evaluar diferentes tiempos de cocultivo, que la mayor expresión transitoria del gen *gus* e integración del ADN en el genoma de los explantes se obtuvo aplicando 4 días de cocultivo. Estos resultados difieren de las conclusiones de Petri (2005), en las que a pesar que el tiempo de cocultivo es variable entre especies y el más usual en estudios de transformación es un período de 48 horas, el autor afirma que tiempos superiores a 3-4 días suelen originar problemas para controlar el crecimiento posterior de *Agrobacterium* en los explantes. Estos resultados contradictorios pueden deberse a diferencias en especies utilizadas o en el antibiótico utilizado posteriormente para eliminar la bacteria.

Una transformación exitosa no solamente depende de la eficiencia en la regeneración de la planta, sino también de la subsecuente eliminación de la bacteria de las células transformadas, ya que la presencia de *Agrobacterium* representa un problema al momento de identificar posibles transformantes o puede interferir en el crecimiento y desarrollo del explante. Esto se logra adicionando uno o varios antibióticos al medio de cultivo en el que se encuentran los explantes (Tang *et al.*, 2000). En este caso, el uso del cefotaxime en el cuarto lavado de los explantes transformados y su presencia en el medio de post-cultivo sólido, ha sido indicado para eliminar bacterias transformadas (Loaiza y Valverde, 2006). La concentración utilizada en los ensayos (250 mg/l) mostró lograr la eliminación de las cepas, inhibiendo su regeneración luego del cocultivo.

En un trabajo realizado por Subramanyam *et al.* (2010), se evaluaron concentraciones de cefotaxime (de 0 a 800 mg/l) con el fin de determinar la concentración óptima para eliminar *Agrobacterium tumefaciens* en explantes transformados de banana Rasthali. En ella, se encontró que una concentración de 500 mg/l del antibiótico tuvo el menor efecto negativo en el desarrollo y multiplicación de los explantes transformados y simultáneamente logró una completa eliminación de la bacteria, mientras que concentraciones superiores a la óptima afectaron la inducción de brotes.

La función de los genes marcadores en los procedimientos de transformación genética es de suma importancia, ya que gracias a ellos se puede determinar si el ADN introducido en las células vegetales se ha integrado de manera efectiva y estable en el genoma de la planta (Carranza, 2011). Las pruebas de expresión transitoria son utilizadas frecuentemente como indicadores para el desarrollo de transformación estable en muchas plantas y tejidos (De Guglielmo *et al.*, 2010). En este caso, para la visualización de la expresión del plásmido incorporado, el sistema del gen de la  $\beta$ -D-glucuronidasa (GUS) ha probado ser muy versátil, aunque la detección de su expresión conlleva generalmente la destrucción del tejido (Carranza, 2011). Además, recientemente en café se han realizado experimentos de transformación genética utilizando el gen *sgfp* (proteína verde fluorescente sintética) y el *DsRFP* (proteína roja fluorescente) (Mishra y Slater, 2012).

Así, basándose en los resultados obtenidos con la prueba GUS, *A. tumefaciens* ATHV::1303 mostró ser la cepa bacteriana más adecuada para la transformación genética de café. La cepa ATHV es conocida por su alto grado de virulencia, ya que es una derivación de la EHA101, la cual a su vez proviene de la cepa supervirulenta silvestre A281 (Khidr, 2007), mientras que la *A. tumefaciens* GV3101 posee una virulencia menor. Resultados similares al comparar estas dos cepas fueron obtenidos por Khidr (2007), donde en una transformación genética de *Cucurbita pepo* L., la cepa ATHV arrojó los mejores resultados de expresión transitoria GUS al obtener que el número de puntos azules en los explantes transformados con esta cepa fue de 22, mientras que de la cepa GV3101 solamente se obtuvieron 2 puntos, con lo que la primera cepa fue escogida para los ensayos posteriores.

Estos resultados se pueden relacionar con los obtenidos en la presente investigación, donde independiente del tipo de explante utilizado para la transformación genética, la cepa ATHV::1303 mostró mayores porcentajes de transformación que la GV3101::1303, con lo que se denota una virulencia superior incluso en diferentes géneros de plantas.

El tipo de planta y de explante empleados afectan la eficiencia en la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Valderrama *et al.*, 2005). Se observó una mayor expresión transitoria y estable del gen *gus* en embriones cigóticos en comparación a los segmentos de hoja, donde en los embriones transformados con la cepa ATHV::1303 (cepa escogida como la más adecuada para el protocolo optimizado), se obtuvo un porcentaje de expresión de 100% a los dos días posteriores a la

transformación y de 50% luego de 4 semanas, mientras que con la misma cepa bacteriana y segmentos de hoja se obtuvieron porcentajes inferiores de 61.1% y 0% respectivamente. Basado en estos resultados, los embriones cigóticos se eligieron como el explante más adecuado para el protocolo optimizado de transformación genética. En cultivos leñosos, se ha probado que un método eficiente de producción de variedades transgénicas se ha logrado usando los embriones cigóticos, donde mostró ser eficiente no solamente para transformación genética, sino para investigación de genómica funcional dirigida a la caracterización de la inserción del ADN-T y para estabilidad de la expresión y/o silenciamiento transgénico (Ribas *et al.*, 2011). Tu *et al.* (2005) lograron la transformación exitosa de *Hyoscyamus niger* mediada por *A. tumefaciens* utilizando embriones cigóticos y sus resultados mostraron que este tipo de explantes pueden ser una fuente alternativa para una transformación y regeneración eficiente de plantas transgénicas en especies recalcitrantes. También en maní (*Arachis hypogaea* L.)(Mckently *et al.*, 1995), algodón (Leelavathi *et al.*, 2004) y *Arabidopsis thaliana* (Sangwan *et al.*, 1991) se han logrado altos porcentajes de transformación, donde en esta última planta se obtuvieron tasas de transformación de 76% al utilizar embriones cigóticos como explante.

Luego de la transformación, para verificar la integración del T-ADN en el genoma de las plantas de café, se utilizaron cebadores específicos para el gen *gfp* en muestras de ADN de explantes provenientes del tratamiento óptimo escogido (ATHV::1303 y embriones cigóticos). De las 11 muestras analizadas con los cebadores para el gen *gfp*, 5 de ellas amplificaron satisfactoriamente un fragmento del gen, mientras que las 6 restantes no presentaron la banda esperada. Por otro lado, las muestras positivas para el gen *gfp* fueron analizadas por PCR para el gen *virG*, donde no hubo amplificación, con lo que se aseguró la ausencia de contaminación bacteriana con *Agrobacterium tumefaciens*. Análisis similares fueron llevados a cabo por Canche-Moo *et al* (2006) en *Coffea canephora*, en los cuales se realizó un ensayo de PCR para la amplificación del gen *Vir E2* para obtener datos confiables sobre la naturaleza de las muestras de ADN presuntamente transgénicas, es decir, que la amplificación positiva obtenida previamente en una PCR con el gen *DsRFP* no fue causada por contaminación bacteriana. En esta investigación, la eficiencia de transformación fue de un 45.5%, obtenida al relacionar la cantidad de muestras positivas a la amplificación del gen *gfp* (5); donde cada una de las muestras representa los tres explantes iniciales utilizados

para realizar la extracción del ADN, con el número de muestras totales (11).

Para asegurarse que la calidad del ADN extraído no hubiera influenciado la no amplificación de algunas de las muestras al realizar la PCR para el gen *gfp* (Figura 12), se utilizaron cebadores universales para el gen 18S. En este caso, al obtenerse el fragmento amplificado esperado en todas las muestras (Figura 14), se infiere que la calidad del ADN extraído no tuvo influencia alguna en este aspecto, y que la razón de no haber logrado obtener los fragmentos esperados se debió a que el ADN no poseía la secuencia codificante para el gen *gfp*, es decir, las muestras de donde se obtuvo el ADN no eran explantes transgénicos.

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

Se determinó que los embriones cigóticos son el explante más adecuado para realizar la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en *Coffea arabica* L. var. Catuaí

Se determinó que la cepa de *A. tumefaciens* ATHV::1303 es la cepa más adecuada para la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* en *Coffea arabica* L. var. Catuaí

Por medio de la amplificación del gen *gfp* por la técnica de PCR, y la prueba histoquímica GUS, se logró comprobar la integración de los genes reporteros en el genoma de *Coffea arabica* L. var. Catuaí

### Recomendaciones

Se recomienda la secuenciación de los productos amplificados de PCR, para confirmar la presencia de los genes reporteros en los explantes transformados.

Estandarizar la densidad óptica a utilizar en la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Realizar un paso de sonicación previo a la metodología con vacío y agitación de los explantes para mejorar los rendimientos en la transformación genética.

Realizar pruebas con otro tipo de inductores de los genes *vir* como lo son la glucosa y la azacitidina para obtener el compuesto que lleve a los mejores resultados de transformación genética.

Realizar pruebas de sensibilidad previas a la transformación con el fin de establecer las concentraciones de antibióticos letales para explantes no transformados y así, realizar una selección de explantes transformados de una manera más rápida.

## BIBLIOGRAFÍA

ACUÑA, J. 2002. Contribución al desarrollo de sistemas de transformación genética para la obtención de plantas resistentes a la broca del café *Hypothenemus hampei* Ferrari. CENICAFÉ. Colombia

ACUÑA, P y BETANCO, W. 2007. Evaluación de la incidencia natural de *Beauveria bassiana* (Bals) Viull, sobre *Hypothenemus hampei* (Ferrari) y *Leucoptera coffeella* (Guérin-Méneville) en el cultivo de café en dos zonas cafetaleras de Nicaragua. Trabajo de Diploma. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Agronomía. Managua, Nicaragua

ALULIMA, M. 2012. Alternativas agroecológicas para el manejo del café (*Coffea arabica*). Monografía previo a la obtención del título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Cuenca. Facultad de Ingeniería Agronómica. Cuenca, Ecuador.

ARCILA, J; FARFÁN, F; MORENO, A; SALAZAR, L; HINCAPIÉ, E. 2007. Sistemas de producción de café en Colombia. Capítulo 2: Crecimiento y desarrollo de la planta de café. Chinchiná, Cenicafé. 309 p

BLANCO, M; VALVERDE, R; GÓMEZ, L. 2003. Optimización de la transformación genética con *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense* 27 (1): 19-28

CADENA, G y GAITÁN, A. 2006. Las enfermedades del café: logros y desafíos para la caficultura colombiana del siglo XXI. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). No. 77

CANCHE-MOO, R; KU-GONZÁLEZ, A; BURGEFF, C; LOYOLA, V; RODRIGUEZ, L; CASTAÑO, E. 2006. Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell Tiss Org Cult* 84: 373-377

CÁRDENAS, S. 2007. Caracterización morfológica y agronómica de la colección núcleo de café (*Coffea arabica* L.) del CATIE. Tesis Maestría. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza.

CARRANZA, D. 2011. Transformación de células vegetales. Obtención de plantas transgénicas. Genes Marcadores.

- CHENG, M; FRY, J; ZHOU, H; HIRONAKA, C; DUNCAN, D; CONER, T; WAN, Y. 1997. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol* 115:971-980
- CHOPRA, R; APARNA, P; SAINI, R. 2012. Use of sonication and vacuum infiltration for *Agrobacterium*-mediated transformation of an Indian lentil (*Lens culinaris* Medik.) cultivar. *Sci Hortic* 143: 127–134
- DE GUGLIELMO, Z; FERNANDEZ, R; HERMOSO, L; ALTOSAAR, I; MENÉNDEZ, A. 2010. Optimización de los parámetros de transformación genética de café mediante biobalística con el gen reportero GUS. *Acta Biológica Venezolana*. Vol. 30 (1-2):23-24
- DE GUGLIELMO, Z. 2009. Ingeniería genética aplicada al café. *Revista UDO Agrícola* 9 (3): 475-486
- DUQUE, A; DE SOUSA, S; ATAÍDE, M; SANTOS, D; FEVEREIRO, M. 2007. Use of fused *gfp* and *gus* reporters for the recovery of transformed *Medicago truncatula* somatic embryos without selective pressure. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 90: 325-330 DOI 10.1007/s11240-007-9268-6
- EIRA, M; DA SILVA, A; DE CASTRO, R; DUSSERT, S; WALTERS, C; BEWLEY, D; HILHORST, H. 2006. Coffee seed physiology. *Braz. J. Plant Physiol.*; 18 (1): 149-163
- FERNÁNDEZ, R; DE GUGLIELMO, Z; MENÉNDEZ, A. 2010. Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación N° 71*. Vol. 34. 28: 87-84
- FERNÁNDEZ, S y CORDERO, J. 2007. Biología de la broca del café *Hypothenemus hampei* (Ferrari) (Coleóptera: Curculionidae: Scolytinae) en condiciones de laboratorio. *Bioagro* 19 (1): 35-40
- FERREIRA, A; PROTASIO, L; GONZAGA, L. 2006. Genetic transformation of coffee. *Plant Physiol.*, 18(1): 83-94
- GATICA, A. 2012. Metabolic engineering of flavonoid biosynthesis in hop (*Humulus lupulus* L.) for enhancing the production of pharmaceutically active secondary metabolites. University of Hohenheim
- GATICA, A; ARRIETA, G; ESPINOZA, A. 2009. Optimization of coffee (*Coffea arabica*) transformation parameters using *uidA* and *hpt* genes: effect of osmotic pre-treatment, helium pressure and target distance. *Revista Biología Tropical* 57: 151-160

GONZÁLEZ, P Y BARRERO, C. 2008. ¿Podemos pintar los genes de las plantas?. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas. Universidad Politécnica de Madrid.

HORLEMANN, C; SCHWEKENDIEK, A; HOHNLE, M; WEBER, G. 2003. Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.). Plant Cell Rep 22: 210-217. DOI 10.1007/s00299-003-067 6-8

INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA (ICAPE). 2011. Guía Técnica para el Cultivo del Café. 1ª ed. Heredia, Costa Rica. 72 p. ISBN 978-9977-55-041-4

INSTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA (ICAPE). 2013. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. San José, Costa Rica. Tomado de [http://www.icafe.go.cr/sector\\_cafetalero/estadsticas/infor\\_activ\\_cafetal/actual/InformeActividadCafetalera.pdf](http://www.icafe.go.cr/sector_cafetalero/estadsticas/infor_activ_cafetal/actual/InformeActividadCafetalera.pdf) el 14 mayo de 2014.

INTERNATIONAL COFFEE ORGANIZATION. 2014. Aspectos botánicos. Tomado de [http://www.ico.org/es/botanical\\_c.asp?section=Acerca\\_del\\_caf%C3%A9](http://www.ico.org/es/botanical_c.asp?section=Acerca_del_caf%C3%A9) el día 15 marzo de 2014.

KHIDR, Y. 2007. Development of a strategy to induce RNA-silencing in squash against virus diseases by genetic transformation. Institute for special crop cultivation and crop physiology. University of Hohenheim.

KUMAR, V; MADHAVA, M; RAVISHANKAR, G. 2006. Developments in coffee biotechnology-in vitro plant propagation and crop improvement. Plant Cell Tiss Organ Cult. 87: 49-65. DOI 10.1007/s11240-006-9134-y

LEE, L Y GELVIN, S. 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. Plant Physiology. Vol. 146, pp. 325-332

LEELAVATHI, S; SUNNICHAN, V; KUMRIA, R; VIJAYKANTH, G; BHATNAGAR, R; REDDY, V. 2004. A simple and rapid *Agrobacterium* mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. Plant Cell Rep 22:465470

LIU, Z; PARK, B; KANNO, A; KAMEYA, T. 2005. The novel use of a combination of sonication and vacuum infiltration via *Agrobacterium*- mediated transformation of kidney bean (*Phaseolus vulgaris* L.) with lea gene. Mol Breed 16:189-197

LLOP, P. 2003. Caracterización molecular de la pérdida del poder patógeno en *Agrobacterium tumefaciens*. Departamento de Protección Vegetal y Biotecnología. Universidad de Valencia. Servei de Publicacions. Valencia, España. 203 p

LOAIZA, J y VALVERDE, R. 2006. Transformación genética de *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia* mediante *Agrobacterium rhizogenes*. *Agronomía Costarricense* 30(1): 27-34. ISSN: 0377-9424

MARKER GENE TECHNOLOGIES, INC. 2014. M1594-pCAMBIA1303 Plant Expression Vector. Tomado de <http://www.cambia.org/daisy/cambia/2048/version/1/part/4/data/pCAMBIA1303.pdf?branch=main&language=default> el día 01 febrero de 2013.

MARKER GENE TECHNOLOGIES, INC. 2014. Product Information Sheet. Plant Expression Vectors (pCAMBIA series). Tomado de [http://www.markergene.com/product\\_sheets/pis1582.pdf](http://www.markergene.com/product_sheets/pis1582.pdf) el día 20 marzo de 2013

MARTÍNEZ, M; CABRERA, J; HERRERA, L. 2004. Las plantas transgénicas: una visión integral. E-Gnosis. Vol. 2. Universidad de Guadalajara, México.

MCKENTLY, A; MOORE, G; DOOSTDAR, H; NIEDZ, R. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryo axes and the development of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 14:699–703

MISHRA, M y SLATER, A. 2012. Recent Advances in the Genetic Transformation of Coffee. *Biotechnology Research International*. DOI: 10. 1155/2012/580857

MOHAMMADZADEH, R; ZAMANI, M; MOTALLEBI, M; NOROUZI, P; JOURABCHI, E; BENEDETTI, M; DE LORENZO, G. 2012. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated introduction of polygalacturonase inhibiting protein 2 gene (PvPGIP2) from *Phaseolus vulgaris* into sugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *Australian Journal of Crop Science*. *AJCS* 6 (8): 1290-1297

MORILLO, S. 2011. Evaluación del control de *Agrobacterium tumefaciens* mediante la aplicación de agentes antibióticos en rosas. Informe del proyecto de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agropecuario. Sangolquí, Ecuador. 85 p

PACURAR, D; THORDAL, H; PACURAR, M; PAMFIL, D; BOTEZ, C; BELLINI, C. 2011. *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 6: 76-81

PETRI, C. 2005. Transformación genética del Albaricoquero (*Prunus armeniaca* L.), mediada por *Agrobacterium*, y regeneración de plantas transformadas. Universidad de Murcia. Departamento de Biología Vegetal

RIBAS, A; DECHAMP, E; CHAMPION, A; BERTRAND, B; COMBES, M; VERDEIL, J; LAPEYRE, F; LASHERMES, P; ETIENNE, H. 2011. *Agrobacterium*-mediated genetics transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biology*, 11:9-2

SANGWAN, R; BOURGEOIS, Y; SANGWAN-NORREEL, B. 1991. Genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* zygotic embryos and identification of critical parameters influencing transformation efficiency. *Mol Gen Genet* 230:475–485

SUBRAMANYAM, K; SUBRAMANYAM, K; SAILAJA, K; SRINIVASULU, M; LAKSHMIDEVI, K. 2010. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Rep*. DOI 10.1007/s00299-010-0996-4

SUJATHA, M; VIJAY, S; VASAVI, S; VEERA, P; CHANDER, S. 2012. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledons of mature seeds of multiple genotypes of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 110:275–287

TANG, H; REN, Z; KREZAL, G. 2000. An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from walnut somatic embryos and for the effects on the proliferation of somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell Reports* 19: 881-887

TEMIS, A; LÓPEZ, A; SOSA, M. 2011. Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. 21: 54-74

TU, S; SANGWAN, R; RAGHAVAN, V; VERMA, D; SANGWAN-NORREEL, B. 2005. Transformation of pollen embryo-derived explants by *Agrobacterium tumefaciens* in *Hyoscyamus niger*. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 81:139–148

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO. 2014. Historia natural del cafeto. Descripción botánica y métodos de cultivo. Tomada de [http://dieumsnh.gfb.umich.mx/i\\_historia\\_natural\\_del\\_cafeto.htm](http://dieumsnh.gfb.umich.mx/i_historia_natural_del_cafeto.htm) el día 16 marzo de 2014.

VALDERRAMA, A; ARANGO, R; AFANADOR, L. 2005. Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería Genética Natural Aplicada”. Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín. Vol. 58.No. 1.p 2569-2585

YING, H; SHENG, X; YING, J; LONG, Y; QING, Y. 2013.Plant Regeneration and *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *Achyranthes bidentata* using Cotton EREBP Gene. Brazilian Archives of Biology and Technology.Vol. 56 n3. pp:349-356

## ANEXOS

**Anexo 1.** Resultados de la prueba histoquímica GUS realizada a los explantes dos días posteriores a su transformación genética.

Transformación de segmentos de hoja con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303				Transformación de segmentos de hoja con <i>A. tumefaciens</i> GV3101::1303			
Muestra	Explante	GUS*	Puntos azules	Muestra	Explante	GUS	Puntos azules
0 (Control)	1	0	0	0 (Control)	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
	4	0	0		4	0	0
1	1	1	4	1	1	0	0
	2	1	4		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
	4	1	11		4	0	0
2	1	1	2	2	1	1	13
	2	1	2		2	1	7
	3	1	1		3	1	6
	4	0	0		4	1	1
3	1	1	4	3	1	1	2
	2	1	1		2	1	1
	3	1	15		3	1	1
	4	1	3		4	1	1
4	1	1	1	4	1	0	0
	2	1	1		2	0	0
	3	1	3		3	1	4
	4	1	4		4	0	0
5	1	0	0	5	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	1	1		3	0	0
	4	1	1		4	0	0
6	1	0	0				
	2	0	0				
	3	0	0				
	4	0	0				
7	1	0	0				
	2	0	0				
	3	0	0				
	4	0	0				

8	1	1	1				
	2	1	2				
	3	0	0				
	4	0	0				
9	1	1	5				
	2	1	2				
	3	1	4				
	4	1	5				
Transformación de embriones cigóticos con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303				Transformación de embriones cigóticos con <i>A. tumefaciens</i> GV3101::1303			
Muestra	Explante	GUS	Puntos azules	Muestra	Explante	GUS	Puntos azules
0 (Control)	1	0	0	0 (Control)	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
1	1	1	1	1	1	1	1
	2	1	1		2	1	3
	3	1	1		3	1	1
2	1	1	1	2	1	1	3
	2	1	1		2	1	1
	3	1	1		3	1	1
3	1	1	1	3	1	0	0
	2	1	1		2	0	0
	3	1	1		3	0	0
4	1	1	1	4	1	0	0
	2	1	1		2	0	0
	3	1	1		3	1	1
5	1	1	1	5	1	1	1
	2	1	1		2	0	0
	3	1	1		3	0	0
6	1	1	1	6	1	1	1
	2	1	1		2	1	1
	3	1	1		3	1	3

\*: 0 y 1 se refieren a una prueba GUS negativa o positiva respectivamente

**Anexo 2.** Resultados de la prueba histoquímica GUS realizada a los explantes cuatro semanas posteriores a su transformación genética.

Transformación de segmentos de hoja con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303				Transformación de segmentos de hoja con <i>A. tumefaciens</i> GV3101::1303			
Muestra	Explante	GUS*	Puntos azules	Muestra	Explante	GUS	Puntos azules
0 (Control)	1	0	0	0 (Control)	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
1	1	0	0	1	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
2	1	0	0	2	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
3	1	0	0	3	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
4	1	0	0	4	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
5	1	0	0	5	1	1	1
	2	0	0		2	1	1
	3	0	0		3	1	1
6	1	0	0	6	1	1	1
	2	0	0		2	1	1
	3	0	0		3	1	1
7	1	0	0	7	1	1	1
	2	0	0		2	1	1
	3	0	0		3	1	1
Transformación de embriones cigóticos con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::1303				Transformación de embriones cigóticos con <i>A. tumefaciens</i> GV3101::1303			
Muestra	Explante	GUS	Puntos azules	Muestra	Explante	GUS	Puntos azules
0 (Control)	1	0	0	0 (Control)	1	0	0
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
1	1	1	3	1	1	0	0
	2	1	1		2	0	0
	3	0	0		3	0	0

2	1	1	4	2	1	0	0
	2	1	2		2	0	0
	3	1	4		3	0	0
3	1	1	1	3	1	1	3
	2	1	1		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
4	1	1	3	4	1	1	3
	2	1	4		2	1	2
	3	0	0		3	0	0
5	1	0	0	5	1	1	1
	2	0	0		2	0	0
	3	0	0		3	0	0
6	1	0	0	6	1	1	1
	2	0	0		2	1	1
	3	0	0		3	1	1

\*: 0 y 1 se refieren a una prueba GUS negativa o positiva respectivamente

**Anexo 3.** Resultados de la cuantificación del ADN extraído de embriones cigóticos transformados con *A. tumefaciens* ATHV::1303 por medio del Nanodrop Lite

Muestra	Concentración de ADN (ng/μl)	A <sub>260/280</sub>
Control (ADN de explante no transformado)	15	1.86
1	26	1.65
2	80.7	1.63
3	61.3	1.98
4	13.6	1.38
5	35	1.45
6	13.2	1.96
7	24.7	1.72
8	36.9	1.72
9	22.1	1.65
10	45	1.98
11	55	1.81