

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS  
DEL I.P.N. UNIDAD IRAPUATO**

**Transformación genética de *Coffea arabica* para desarrollo de resistencia a  
*Hypothenemus hampei***

TESIS QUE PRESENTA

**I.A. ELIANA VALENCIA LOZANO**

Para Obtener el Grado de  
**Maestro en Ciencias**

En la Especialidad de  
**Biotecnología de Plantas**

DIRECTORES DE TESIS

**JORGE EUGENIO IBARRA RENDÓN**

**MIGUEL ANGEL GOMEZ LIM**

IRAPUATO, GUANAJUATO, MEXICO.

AGOSTO 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por el apoyo financiero que me otorgó para la realización de este trabajo con la beca.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato por brindarme conocimientos, así como todas las facilidades otorgadas para la realización del posgrado.

Al Dr. Jorge Ibarra Rendón, por la asesoría y por permitirme ser parte de su grupo de trabajo.

Al Dr. Miguel Ángel Gómez Lim, por su dirección, asesoría y apoyo constante para la realización de este trabajo, además de permitirme ser parte de su equipo de trabajo.

A los doctores Stefan De Folter, Robert Winkler y Rafael Rivera Bustamante por sus acertadas sugerencias durante la realización de este trabajo como parte del comité tutorial.

Al Dr. José Luis Cabrera Ponce, por su sabia colaboración y enseñanzas en momentos críticos, que permitieron mi desarrollo profesional y personal; así como el valioso aporte de metodologías en los experimentos para obtención y transformación de la línea embriogénica de café.

A la Bio. Ana Laura Nieves y IQA Estefania Espinoza; por sus valiosos consejos, amistad, compañía y por hacer parte de la realización de esta meta.

A la IBT Anayetzi González, Sandra Chavez, Rosa Rangel, Aaron Barraza; por su amistad, consejos, apoyo y conocimientos brindados durante la realización de este trabajo.

A mis amigos del Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana; Marco Plancarte, Alejandra Aguilar, Diana, Yarely, Rafael, Alex, Uriel, Yardená, Cristian, Maite, Fernando, Adriana y Víctor; por compartir conmigo sus conocimientos y brindarme su amistad.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioinsecticidas; Mónica, Sebastián, Nadin, Rossy, Luis, Francisco, Katy, Priscilla, Leandro Gabriel Ordoñez, Yaritza Reinoso, Juventino Tlacumulco, Javier Luevano Borroel y Margarita Rodríguez.

A Marcelina Gracia Aguilar por su apoyo en microscopía, Alicia Chagolla por su apoyo en análisis de proteínas y Humberto R. Medina por su apoyo en el uso de nuevas técnicas moleculares.

A Dora Elia Anguiano; por todo su apoyo desde el momento de mi llegada a México y durante todo este tiempo de mi estancia en Cinvestav.

En general a todo el personal administrativo y de apoyo del Cinvestav Unidad Irapuato por su colaboración que contribuyó a llevar a cabo este proyecto.

*Dedico esta estrella a mis padres*

*José D. Valencia y Amparo Lozano*

*Por ser mi motor, mi fortaleza y por enseñarme a volar tras mis sueños.*

*Gracias*

*Aquí les entrego el fruto a la confianza depositada en mí.*

*Los Amo.*

## **Dedicatoria**

Gratitud y Amor a Dios por permitirme llegar a la culminacion de esta meta.

A mis padres Jose y Amparo; por su apoyo incondicional,

A mis hermanos Claudia, Juan Pablo y Catalina,

A mis sobrinos Arlex David y Bebe,

A la familia Chavez,

Que me han brindado amor y un hogar el cual agradezco de corazón.

# ÍNDICE

*Dedicatoria*

*Agradecimientos*

## ÍNDICE GENERAL

### ÍNDICE DE TABLAS

### ÍNDICE DE FIGURAS

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>3</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
1.1 Generalidades sobre <i>Coffea arabica</i> L. ....	8
1.1.1 Importancia económica del café.....	9
1.1.2 Factores que afectan la producción de café.....	11
1.2 Importancia económica de <i>Hypothenemus hampei</i> .....	11
1.2.1 Estrategias de control de la broca del café .....	12
1.3 Generalidades de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	13
1.3.1 Plantas modificadas genéticamente con genes <i>cry</i> .....	16
1.4 Transformación genética de café.....	16
1.4.1 Métodos de transformación genética .....	18
1.4.2 Biobalística.....	18
1.4.3 Agro infiltración y Agrospray .....	18
1.5 Cultivo <i>in vitro</i> de plantas .....	19
1.5.1 Origen y estado fisiológico del explante.....	20
1.5.2 Inducción de embriogénesis somática (ES) .....	21
1.5.3 Efectos de fuentes de carbono y reguladores de crecimiento.....	21

II.	<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	23
III.	<b>HIPOTESIS</b> .....	24
IV.	<b>OBJETIVOS</b> .....	24
	4.1 General .....	24
	4.2 Específico y actividades .....	<b>24</b>
V.	<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	25
	<b>5.1 Implementación de la región tóxica del gen <i>cry10Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> para transformación genética</b> .....	<b>25</b>
	5.1.1 Optimización de genes.....	25
	5.1.2 Selección y caracterización de vectores .....	26
	5.1.3 Amplificación por PCR del gen <i>cry10Aa</i> sintetizado .....	<b>27</b>
	5.1.4 Clonación en pCR/8GW/TOPO .....	<b>28</b>
	5.1.5 Recombinación en vector pMDC85.....	29
	5.1.6 Golden Gate Assembly en PVXmini.....	30
	5.1.7 Secuenciación del gen <i>cry10Aa</i> clonado en café.....	<b>31</b>
	<b>5.2 Establecimiento de Protocolo de cultivo <i>in vitro</i> para producción de línea embriogénica de café</b> .....	31
	5.2.1 Selección del tipo de explante .....	32
	5.2.2 Selección de técnica de desinfección .....	32
	5.2.3 Evaluación de medios de cultivo para inducción de ES .....	33
	5.2.4 Evaluación de medios de cultivo para producción de ES.....	34
	<b>5.3 Establecimiento de protocolo de transformación genética estable y transitoria de café</b> .....	<b>35</b>
	5.3.1 Preparación de material biológico para transformación .....	<b>35</b>
	5.3.2 Transformación genética mediante bombardeo de micro partículas recubiertas de ADN.....	37
	5.3.3 Transformación por agroinfiltración con <i>A. tumefaciens</i> en hojas de plantas de café.....	<b>37</b>
	5.3.4 Transformación por agrospray con <i>A. tumefaciens</i> en hojas de plantas de café.....	<b>39</b>
	5.3.4 Selección del material transformado .....	<b>41</b>

VI.	<b>RESULTADOS</b> .....	43
	<b>6.1 Implementación de la región tóxica del gen <i>cry10Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>israelensis</i> para transformación genética</b> .....	<b>43</b>
	6.1.1 Análisis de restricción de la clonación en pCR/8GW/TOPO .....	43
	6.1.2 Análisis de restricción de la clonación en pMDC85.....	44
	6.1.3 Análisis de restricción de la clonación en PVXmini .....	<b>45</b>
	6.1.2 Amplificación del gen <i>cry10Aa</i> .....	46
	6.1.3 Secuenciación y predicción de la proteína.....	46
	<b>6.2 Establecimiento de protocolo de cultivo <i>in vitro</i> para producción de línea embriogénica de café</b> .....	<b>48</b>
	6.2.1 Efecto en el desarrollo de callo en los diferentes medios de cultivo ...	48
	6.2.2 Obtención de línea embriogénica para transformación.....	<b>49</b>
	<b>6.3 Establecimiento de Protocolo de transformación genética estable</b> .....	<b>53</b>
	6.3.1 Selección del material transformado .....	53
	6.3.2 Análisis de expresión de la proteína Cry 10Aa en embriones.....	<b>57</b>
	<b>6.4 Establecimiento de protocolo de transformación genética transitoria</b> .....	59
	6.4.1 Expresión transitoria en hojas agroinfiltradas con pMDC85 y de hojas asperjadas PVX-mini y PVX-GFP.....	<b>60</b>
	6.3.3 Análisis de expresión de la proteína <i>Cry 10Aa</i> .....	<b>61</b>
VII.	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>62</b>
VIII.	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>66</b>
IX.	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	67
X.	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>68</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Taxonomía de café.....	8
Tabla 2. Principales ejemplos de cultivos transformados con genes <i>cry</i> .....	16
Tabla 3. Reactivos de PCR para amplificación del gen <i>cry10Aa</i> .....	27
Tabla 4. Reactivos de Golden Gate Assembly para clonación del gen <i>cry10Aa</i> .....	30
Tabla 5. Composición de medios para inducción de embriones somáticos en café. ....	33
Tabla 6. Composición de medios para producción de embriones somáticos en café. ....	34
Tabla 7. Respuesta morfogénica de genotipos de café.....	51
Tabla 8. Eficiencia de transformación genética estable de café mediante diferentes pretratamientos osmóticos.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Daño ocasionado por la broca.....	12
Fig. 2. Modo de Acción de toxinas <i>Cry</i> a nivel molecular.....	15
Fig. 3. Diagrama de las regiones genómicas; transcritos y productos de la delta-endotoxina <i>Cry10Aa</i> .....	25
Fig. 4. Clonación del producto de PCR en el vector pCR8/Gw/TOPO.....	28
Fig. 5. Recombinación del vector pCR8/Gw/TOPO y pMDC85.....	29
Fig. 6. Diagrama de clonación del Golden Gate Assembly.....	30
Fig. 7 Metodología de agroinfiltración y agrospray en hojas .....	40
Fig. 8. Mapa de vector de entrada y restricción.....	43
Fig. 9. Mapa de vector de salida y restricción.....	44
Fig. 10. Mapa de vector PVX-Bti y restricción.....	45
Fig. 11. Análisis de amplificación y clonación del gen <i>cry10Aa</i> .....	46
Fig. 12. Electroferograma de la secuenciación.....	46
Fig. 13. Estructuras tridimensionales de la delta-endotoxina <i>Cry10A</i> .....	47
Fig. 14 Etapas morfológicas de los explantes de hoja de café hasta el desarrollo del embrión somático. ....	49
Fig. 15. Línea embriogénica y proembriogénica para transformación. ....	50
Fig. 16. Selección del material transformado.....	54
Fig. 17. Expresión de la proteína verde fluorescente en embriones 5 días después del bombardeo.....	55
Fig. 18. Expresión de la proteína verde fluorescente en embriones 15 días después del bombardeo.....	55
Fig. 19. Expresión de la proteína verde fluorescente en embriones bombardeados 15 y 30 días después del bombardeo.....	56

Fig. 20 SDS-PAGE de proteínas extraídas de embriones.....	<b>58</b>
Fig. 21 Descripción de la amplificación realizada por cada par de oligos.....	<b>58</b>
Fig. 22. Amplificación por PCR del gen <i>cry10Aa</i> en clonas transformadas de café.....	<b>59</b>
Fig. 23. Expresión transitoria en hojas agroinfiltradas pMDC85 y asperjadas PVX-mini y PVX-GFP.....	<b>60</b>
Fig. 24. Análisis de expresión transitoria en hojas agroinfiltradas pMDC85 y asperjadas PVX-mini y PVX-GFP.....	<b>61</b>

## RESUMEN

El cultivo de café en México y en el mundo representa un gran potencial económico, lo cual ha determinado la búsqueda constante de alternativas para su eficiente manejo agronómico, principalmente el componente sanitario, logrando así aumentos en el rendimiento del cultivo. La utilización de diversas técnicas biotecnológicas que abarcan desde el cultivo *in vitro* hasta la transformación genética con genes que le confieren resistencia a plagas son cada vez más aplicadas debido a las grandes ventajas que ofrecen. En la actualidad se están realizando pruebas con materiales de café resistentes a plagas (*Leucoptera coffeella*), en los cuales los genes utilizados codifican para proteínas Cry.

La eficiencia de la expresión de los transgenes dependerá de la estrategia de transformación y de los genes a usar. Algunos factores limitantes en la expresión eficiente de las proteínas recombinantes, son el mal plegamiento, deficiencia en el uso óptimo de codones, proteólisis ocurrida *in-planta* o por el contrario la sobreexpresión, lo cual afectaría directamente el rendimiento y desarrollo de la planta.

En esta tesis se realizó la transformación genética de *Coffea arabica* para desarrollo de resistencia a *Hypothenemus hampei*, a través de la expresión de la proteína *Cry10Aa* de *Bacillus thuringiensis*; de forma estable en embriones somáticos de café y transitoria en hojas de las plantas *in situ*. La expresión se evaluó mediante la identificación de proteínas por secuenciación de péptidos (MS/MS).

Dentro de la metodología planteada para lograr nuestro objetivo, se diseñó la secuencia de genes de *cry10Aa* con un porcentaje de A-T óptimo para su expresión en café. Una vez establecido el protocolo e inducidos los embriones somáticos, se procedió a transformarlos mediante biobalística; comprobando

posteriormente la transformación con la expresión de genes reporteros y análisis de proteínas; comprobación que también fue usada para las plantas agroinfiltradas y asperjadas con *Agrobacterium*. Los resultados obtenidos demuestran que el café tiene la capacidad de expresar y producir la proteína *Cry10Aa*, tanto en embriones como en plantas con tejidos ya desarrollados.

En este trabajo se prevé el uso de *cry10Aa* como estrategia para el control de la broca; además se utiliza por primera vez la técnica de agroinfiltración y agrospray en café; como estrategia viable para el control de una plaga de importancia económica.

Es necesario continuar con las investigaciones; hasta lograr la regeneración de plantas capaces de resistir al ataque de *H. hampei* en etapa de maduración de frutos.

## ABSTRACT

Coffee cultivation in Mexico and the world has a great economic potential, which has led to a permanent pursuit of alternatives for efficient agricultural management; mainly the sanitation component, achieving increases in crop yield. The use of several biotechnological techniques ranging from *in vitro* culture to genetic transformation with genes that confer resistance to pests, are becoming more commonly applied due to the great advantages they offer. Tests are currently being applied to materials resistant to pests (*Leucoptera coffella*), where the genes used are coding for *Bacillus thuringiensis* Cry proteins.

The expression efficiency of foreign genes will depend on the transformation strategy and genes used. Some limiting factors are the efficient expression of recombinant proteins; by factors such as misfolding, deficiency in optimal codon usage, proteolysis *in-planta* or otherwise overexpression; which directly affects plant yield and development.

In this thesis, the approach was the genetic transformation of *Coffea arabica* to develop resistance to *Hypothenemus hampei*, through the expression of the protein *Cry10Aa* of *B. thuringiensis* stably in coffee somatic embryos and transiently directly on plant tissues *in situ*. The expression was evaluated by identifying proteins by peptide sequencing (MS/MS).

Within the methodology proposed to achieve our goal, the *cry10Aa* gene sequence was designed with a percentage of A-T optimal for expression in coffee; once the protocol was established and the somatic embryos were induced, transformation was performed by biobalistics; subsequently checking transformation with reporter genes expression and protein analysis; a test that was also used for agroinfiltrated plants and sprayed with *Agrobacterium*. The results show that coffee has the ability to express and produce the *Cry10Aa*

protein, both in embryos and plants with developed tissues.

In this work the use of *cry10Aa* as a strategy for the control of coffee borer beetle; also using for the first time the agroinfiltration and agrospray techniques as a viable strategy for the control of a pest of economic importance.

It is necessary to continue the research line; until the achievement of regeneration of plants able to withstand the attack of *H. hampei* in fruit ripening stage.

## I.INTRODUCCIÓN

La producción de café en México presenta retos muy importantes para cumplir con la demanda interna y para competir en el mercado internacional de este producto. La principal limitante que se presenta en este momento, es el incremento de plagas y enfermedades, en las zonas de alta producción del país como Chiapas, Veracruz, Oaxaca, Puebla y Guerrero.

Una alternativa eficiente, sería la generación de plantas de café resistentes a estas problemáticas mediante el uso de la ingeniería genética. La ingeniería genética es una técnica que permite extraer uno o más genes del genoma de un organismo fuente (bacterias, hongos, plantas) y transferirla a otro organismo receptor, donde se introduce al genoma de la planta, de manera que el organismo receptor adquiere la capacidad de formar nuevos productos, sin alterar sus características originales.

Al usar esta técnica especialmente en variedades de alto rendimiento, se podría avanzar en la solución a estas problemáticas y desarrollar variedades mejoradas de café, que presenten resistencia o tolerancia genéticas a enfermedades o plagas, que permitan la reducción en el uso de agroquímicos nocivos, una renovación de cafetales por variedades con mayores rendimientos y de esta manera lograr un incremento en la relación beneficio/costo.

La obtención de variedades mejoradas, inicia con el desarrollo de un protocolo de cultivo *in vitro* que permita el desarrollo de líneas embriogénicas aptas para transformación, la selección de la técnica de transformación que se desea emplear para la expresión de los genes y el establecimiento de diferentes metodologías para la regeneración de plantas resistentes con capacidad de expresar proteínas de interés. En nuestro caso lograr la expresión de endotoxinas Cry de la bacteria *Bacillus thuringiensis*.



Las proteínas *Cry* se caracterizan por ser toxinas que provocan lisis celular en el epitelio intestinal de los insectos blanco por medio de la formación de poros en las microvellosidades apicales de la membrana celular (Bravo *et al.*, 2001; Maagd *et al.*, 2001), cuando se encuentran en su forma activa. Los niveles de expresión de la toxina dependerán de la metodología de transformación y de la traducción de la proteína realizada por la planta.

Ferré y colaboradores (2002) demostraron que modificar la codificación sin alterar la secuencia de aminoácidos, resulta en una expresión del 0.3% de proteína total de la planta, sin embargo en técnicas como la agroinfiltración o la transformación directa de cloroplasto se puede aumentar la expresión de la proteína al 3%, debido a que la expresión en cloroplastos es similar a la de procariontes (Maliga, 2004); además, cada célula contiene miles de cloroplastos con capacidad de sostener un alto número de copias funcionales del gen heterólogo (Goldstein & Thomas 2004).

En café uno de los primeros reportes de transformación genética exitosa, se describió en 1995 cuando J. van Boxtel y colaboradores, transformaron por biobalística explantes a partir de hojas. Posteriormente se transformó *C. arabica* y *C. canephora* con el gen *cry1Ac* que le confiere resistencia a *Leucoptera coffeella*, minador de las hojas del cafeto, obteniendo plantas resistentes al insecto, evaluadas con bioensayos tanto en laboratorio como en campo. (Leroy *et al.*, 2000; B. Perthuis *et al.*, 2005).

Con estos antecedentes se ha demostrado que el genoma del café permite la transformación por metodologías convencionales de ingeniería genética. Por esta razón se propone la aplicación de nuevas técnicas de transformación, las cuales presentan una rápida expresión de las endotoxinas de *B. thuringiensis* después de la aspersión de los cultivos con inóculos de *Agrobacterium* o la infiltración de los mismos.

El inóculo aplicado es una mezcla de vectores de expresión basados en vectores con proteínas de movimiento del virus X de la papa (PVX), citoplasma y una recombinasa. Esta técnica de agrospray se usó para la protección de plantas de *Nicotiana benthamiana* contra larvas del gusano del tabaco *Manduca sexta* (Giritch, *et al.* 2011). Razón por la cual la aplicación de esta técnica en cultivo de café para la expresión de endotoxinas que le confieran resistencia al cultivo contra insectos, específicamente contra la broca del café, sería una alternativa viable con un resultado novedoso que brindaría una estrategia de control eficiente contra la plaga en periodos de tiempo cortos.

De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se desea demostrar que el uso de diferentes técnicas de transformación de plantas permitirá la expresión del gen *cry10Aa* de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* en *Coffea arabica*, como un futuro desarrollo biotecnológico para el control efectivo de *Hypothenemus hampei*.

## Antecedentes

### 1.1 Generalidades sobre *Coffea arabica* L.

El café pertenece a la gran familia de las rubiáceas, compuesta por 500 géneros y más de 6,000 especies, la mayoría de origen tropical y con amplia distribución geográfica (Bridson, 1988). De las 103 especies descritas en el género *Coffea*, 41 son originarias del África continental, donde se distribuyen a lo largo de la zona tropical húmeda. Aproximadamente 59 se encuentran silvestres en la isla de Madagascar, mientras que al menos tres, son originarias de las islas Mascarenas, particularmente de Mauricius y las Islas de la Reunión (Arcilla *et al.*, 2003). El género *Coffea* incluye aproximadamente cien especies, no obstante, cuatro de estas se mencionan como cultivadas comercialmente: *C. arabica*, *C. canephora*, *C. liberica* y *C. dewevrei* destacándose las dos primeras, como especies de importancia económica mundial (Alvarado, 1994) (Tabla 1).

Tabla 1. Taxonomía del café.

Taxonomía	Nombre
Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Sub-división	<i>Angiospermae</i>
Clase	<i>Magnoliata</i>
Sub-clase	<i>Asteridae</i>
Orden	<i>Rubiales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i> .
Especie (s)	<i>arabica, canephora, liberica, dewevrei</i>

Fuente: Alvarado, 1994.

Las plantas de café son arbustos que pueden llegar hasta los 12 metros, sus inflorescencias son pareadas, sus flores hermafroditas de corolas blancas o

ligeramente rosadas. El estilo puede ser muy largo y sobresalir de la corola. El fruto se ha clasificado como una drupa indehisciente, formado por dos semillas muy características del género. (Arcila *et al.*, 2003).

En el desarrollo del fruto del cafeto se pueden distinguir cinco etapas (Arcila y Jaramillo, 2003). La primera comienza una vez que el óvulo es fecundado e inicia el crecimiento del ovario; en la segunda, el fruto crece rápidamente en peso y volumen, con altos requerimientos de agua; la tercera presenta una alta demanda de nutrientes, se endurece la almendra y la disponibilidad de agua es muy importante. Esta etapa es el período en el que inician los ataques de plagas como el barrenador de la semilla del fruto debido al aumento en el porcentaje de materia seca. Los primeros 30 días son el periodo más crítico ya que es el periodo en que inicia el insecto a colonizar nuevos frutos.

Finalmente el endospermo llena el grano entero y es la época de maduración o cambio de color del fruto, período en que inicia la recolección del grano. Si el fruto se sobre madura, cambia su coloración rojiza a violeta oscuro y normalmente se seca y puede caerse, permitiendo que los estados inmaduros de la broca se desarrollen normalmente y se conviertan en un foco permanente de nuevas generaciones de brocas. Desde el momento de la floración hasta la maduración del fruto transcurre un período de 180 a 330 días en promedio, dependiendo de la variedad y de la oferta ambiental de la región donde se encuentre el cultivo (Arcila *et al.*, 2007; Jaramillo *et al.*, 2011).

### **1.1.1 Importancia económica del café**

El café es uno de los productos agrícolas más importantes en el mercado mundial y uno de los cultivos tropicales perennes con mayor área cultivada en el mundo (Berthouly y Etienne, 1999). Según la organización internacional del café (ICO), la producción promedio mundial durante el período 2015/16 fue de

143.4 millones de sacos de 60 kilogramos distribuidos entre las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. El 75 % del café consumido en el mundo se obtiene de *Coffea arabica*, cultivada en su mayoría en América Latina, con un aporte de 71.14 millones de sacos. La especie *Coffea canephora* representa el 25% restante y se cultiva principalmente en Brasil, África y Asia, con una producción de 41.26 millones de sacos (ICO.org, 2016).

En México un porcentaje de producción correspondiente a 95 % es de la especie *arabica* y en un 5 % a *canephora* (Fira.gob, 2016). En la actualidad México ocupa el quinto lugar con un aporte del 3.5% de la producción mundial con un equivalente de 273,000 toneladas (5 millones de sacos) (FAO, 2016). Esta producción se obtiene en una superficie de 666,375 hectáreas, de la cual el 90.3 % se concentra en cinco estados: Chiapas (37.2 %), Veracruz (20.3 %), Oaxaca (17.6 %), Puebla (8.9 %) y Guerrero (6.3%) (Fira.gob, 2016) en altitudes que van desde los 300 hasta casi los 2,000 metros sobre el nivel del mar en zonas que exhiben una gran variedad de climas, suelo y tipos de vegetación.

No obstante, la elevación más indicada para la producción del café se sitúa entre los 600 y 1200 metros, justo en la franja de transición o entre las regiones ecológicas tropical y templada.

Esta producción nacional de café se está viendo reducida principalmente por periodos prolongados de sequía, presencia de la roya del cafeto (*Hemileia vastatrix*) en los principales estados productores (Universal, 2016), y con una alta repercusión económica al causar un daño directo a los granos para cosecha, la broca (*Hypothenemus hampei* Ferrari) (Le Pelley, 1968; Obando, 2002, SAGARPA, 2016), estos factores deben ser controlados para lograr un incremento en el rendimiento de la cafecultura mexicana.

### **1.1.2 Factores que afectan la producción de café**

La cafecultura en México se ve afectada por factores fitosanitarios capaces de ocasionar pérdidas en el rendimiento, superior al 50%. Una de ellas es la enfermedad conocida como roya (*Hemileia vastatrix*), la enfermedad más destructiva del cafeto y la de mayor importancia económica a nivel mundial. Esta enfermedad provoca la caída prematura de las hojas, propiciando la reducción de la capacidad fotosintética así como el debilitamiento de los árboles y en infecciones severas puede ocasionar muerte regresiva en ramas e incluso la muerte de los árboles (APS, 2011).

Otro factor importante a nivel de plaga es la broca (*H. hampei*), coleóptero que ataca directamente el fruto del café, cuando éste alcanza el 20% de materia seca en las primeras etapas del período de maduración. Por consiguiente, ocasiona importantes pérdidas en el rendimiento, por mermas en la calidad del grano, debido a que se alimenta y cumple su ciclo reproductivo durante varias generaciones en el grano (Le Pelley, 1968). Estas pérdidas pueden llegar a un 80 por ciento de la producción y en algunos casos ocasionar pérdidas totales (López, 1994).

### **1.2 Importancia económica de *Hypotenemus hampei***

Una de las problemas que enfrenta el sector cafetero desde 1978 es la presencia de la Broca del Café, *Hypothenemus hampei*, considerada hoy en día como la plaga más perjudicial del cultivo, que si no se le controla puede causar pérdidas hasta del 80% de la producción. Esta plaga no solo afecta la producción sino que disminuye la calidad, debido a la pérdida de peso de los granos, al aumento en la cantidad de frutos vanos y a la caída de los frutos inmaduros; sobre todo cuando no se aplican las medidas de control necesarias para contrarrestar sus efectos nocivos (Fig. 1). Si no se controla esta plaga el daño económico puede oscilar entre los 45 a 227 kilogramos de café cereza por hectárea (SAGARPA, 2011).

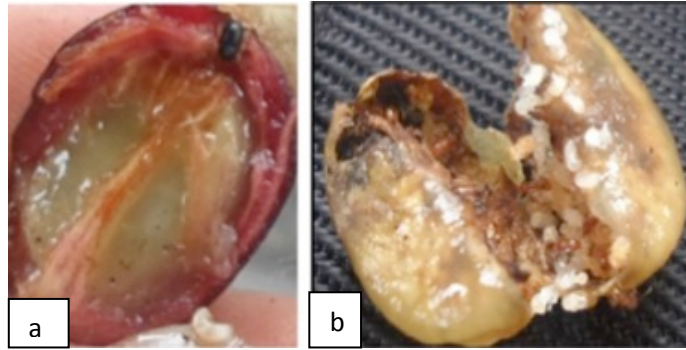


Fig. 1. Daño ocasionado en el grano de café por la broca a) Entrada de la hembra por el micrópilo del fruto; b) Fruto completamente barrenado con posturas y larvas de primer instar.

### 1.2.1 Estrategias de control de la broca del café

Dentro de las estrategias de manejo y control de la broca, se ha planteado la estrategia del Manejo Integrado de la Broca (MIB), el cual combina prácticas agronómicas, biológicas, genéticas, culturales y químicas, tendientes a reducir las poblaciones de la broca a niveles que no causen daños económicos.

Dentro de las estrategias genéticas, la obtención de plantas transgénicas de café resistentes a la broca han sido objeto de estudio, por lo cual se ha trabajado en identificación y evaluación *in vitro* e *in vivo* de proteínas insecticidas como quitinasas y quitobiosidasas (Góngora, 1999), inhibidores de alfa amilasas (Valencia *et al.*, 2000; Góngora y Acuña, 2008) e inhibidores de aspártico proteasas (Molina *et al.*, 2010; Molina *et al.*, 2011).

Para el control biológico se han usado parasitoides como: *Prorops nasuta* Waterston, *Heterospilus coffeicola* Schmiedeknecht (Le Pelley, 1968), *Cephalonomia stephanoderis* Betrem, *Phymastichus coffea* LaSalle y hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* (Murphy & Moore, 1990).

Si se utilizan adecuadamente las estrategias biológicas, con cronogramas de liberación y prácticas culturales como recolección de frutos caídos, pueden ser

eficientes para controlar la plaga. Cuando esto no sucede se tienen que ejecutar acciones de choque como el uso de productos químicos como el Endosulfán.

Este insecticida y acaricida organoclorado está clasificado como un producto de alta toxicidad, alto potencial de bioacumulación y contaminación ambiental. Razones por las cuales su uso se encuentra limitado y/o prohibido en diferentes países. De igual forma, es difícil el control de la broca con insecticidas debido a que permanece protegida la mayor parte de su vida en el interior de los frutos. Por estas razones el uso de variedades resistentes es una estrategia de alto potencial

### **1.3 Generalidades de *Bacillus thuringiensis***

El descubrimiento de *B. thuringiensis* fue en el año de 1901 cuando el japonés S. Ishiwata aisló un bacilo causante de una enfermedad en larvas del gusano de seda, *Bombyx mori*, llamándolo *sotto* bacilo y en 1915 fue aislado por Ernest Berliner en Alemania de la polilla de la harina, *Ephestia kuehniella*. La aplicación como bioinsecticidas ocurrió hasta 1938 que se comercializó como Sporeine, para combatir larvas de lepidópteros *Lymantria dispar* y *Ostrinia nubilalis* (Ibarra, 1986).

Dentro de su clasificación taxonómica y morfológica *B. thuringiensis*, pertenece a la familia Bacillaceae, presente células vegetativas en forma de bastón, flageladas de 1-1.2  $\mu\text{m}$  de ancho por 3-5  $\mu\text{m}$  de largo, agrupadas en cadenas de 2-3 células, es Gram positiva aerobia estricta y esporógena.

Durante su cultivo y asociada a la formación de esporas, sintetiza cristales de naturaleza proteica y con propiedades insecticidas llamadas  $\delta$ -endotoxinas o proteínas Cry y Cyt, activas contra insectos lepidópteros, coleópteros, dípteros, entre otros (Feitelson, 1998).



Actualmente las  $\delta$ -endotoxinas Cry y Cyt se clasifican en Cry1 hasta Cry71 y de Cyt1 a Cyt2 basados en la identidad de su secuencia primaria (Crickmore et al., 1998). Otras clasificaciones son con base en la forma de los cristales (bipiramidal, cuboidal, romboide plano, esférico o compuesto de dos tipos de cristal) y/o de la composición de las proteínas insecticidas del cristal y la bioactividad contra los insectos blanco o el caso de cepas con inclusiones de cristales separados como *B. thuringiensis* serovar *israelensis*.

Esta cepa se identificó a finales de la década de los 70 en la ribera de un río en Israel por lo que se denominó *Bt israelensis* (*Bti*) (Goldberg & Margalit, 1977). Su actividad altamente tóxica contra *Aedes* y *Culex* la clasifica como una cepa con actividad contra dípteros (Tyrell, 1979). Estudios realizados por Méndez-López et al. 2003 y Hernández et al., 2009, en el laboratorio de Bioinsecticidas del CINVESTAV, Irapuato, México, lograron demostrar el efecto de la cepa en larvas de estados tempranos de *Hypotenemus hampei*. Este serovar se encuentra completamente secuenciado en el plásmido pBtoxis, donde se encuentran los genes que codifican para cry4A, cry4B, cry10a, cry11 y cyt (Berry y Col., 2002)

La mayoría de las proteínas Cry son producidas en inclusiones cristalinas, donde se encuentran como protoxinas de entre 70 y 130 kDa, aproximadamente (Bravo et al., Soberon et al., 2009). Cuando éstas son activadas por proteasas se provocan cortes en la molécula, dando como resultado una toxina de tres dominios completamente activada con un tamaño molecular aproximado de 55 a 65 kDa (Bravo et al., 2007). En este momento la toxina Cry tiene alta afinidad hacia receptores específicos presentes en las microvellocidades celulares del intestino del insecto blanco (Bravo et al., 2005; De Maagd et al., 2001)

Se ha observado principalmente que la caderina funciona como receptor primario el cual al interactuar con la toxina Cry provoca un cambio conformacional en la proteína que deriva en la pérdida de la alfa-hélice 1 en el

Dominio I, que a su vez facilita la oligomerización y la formación de un pre-poro (Gómez *et al.*, 2002).

Se ha documentado que una vez formado el oligómero, este tiene alta afinidad hacia receptores secundarios como las fosfatasas alcalinas (ALP) y aminopeptidasas N (APN) que permiten su inserción en la membrana celular (Bravo *et al.*, 2004; Bravo *et al.*, 2007) (Fig. 2). La inserción conlleva a la formación de poros que permiten el paso de iones y agua, proceso que provoca un desequilibrio osmótico y por lo tanto lisis celular y la consecuente muerte del insecto (Gómez *et al.*, 2002). De igual forma la ruptura de la membrana ocasiona una severa septicemia y la muerte del insecto (Bravo *et al.*, 2005; De Maagd *et al.*, 2001).

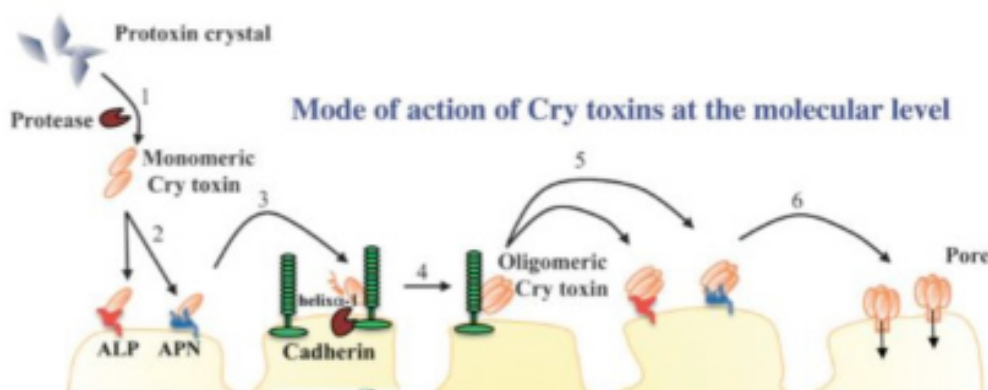


Fig. 2. Modo de acción de toxinas Cry a nivel molecular; *modificado a partir de Pardo-López et al.* 2013. Ilustra la activación de proteasas al ingresar la toxina al intestino del insecto, separando los dominios; el dominio II, establecerá las interacciones con los receptores secundarios, fosfatasas alcalinas (ALP) o aminopeptidasas (APN) y caderinas con lo que se inicia la inserción en la membrana celular y su posterior procesamiento. El dominio III, se vincula a las subunidades y esta unión a las ALP y APN desencadena un desequilibrio osmótico y se forman los poros.

### 1.3.1 Plantas modificadas genéticamente con genes *cry*.

En el año de 1987 se presentó el primer reporte de la inserción de genes que codifican para delta-endotoxina de Bt en plantas de tabaco (Barton *et al.* 1987) Seguido de esto se han desarrollado importantes transformaciones genéticas en cultivos de importancia económica a nivel mundial; algunos de estos ejemplos se citan en la tabla 2.

Tabla 2. Principales ejemplos de cultivos transformados con genes *cry*.

Cultivos transformados	Gen/Toxina	Orden de la plaga	Referencia
Algodón	cry1Ab, cryAc	Lepidóptero	Perlak, <i>et al.</i> ,1991.
Maíz	cry1Ab, Cry9C	Lepidóptero	Koziet, <i>et al.</i> ,1993, Jansens , <i>et al.</i> ,1997
Papa	cry3Aa, Cry1Ab	Coleóptero y Lepidóptero	Perlak, <i>et al.</i> ,1993 Chakrabarti, <i>et al.</i> ,2000.
Arroz	cry1Ac, cry1Ab	Lepidóptero	Nayak, <i>et al.</i> ,1997 Shu, <i>et al.</i> ,2000
Café	Cry1Ac	Lepidóptero	Leroy <i>et al.</i> , 2000

### 1.4 Transformación genética de Café

La transformación genética de café surge de la necesidad de desarrollar productos que representen una ventaja competitiva para la agricultura. Para ello se establece la característica que se desea mejorar o el genotipo alternativo que

expresara características diferentes. Una vez establecido el objetivo de la transformación se selecciona el mecanismo mediante el cual se insertara el gen de interés.

La transformación genética de café fue descrito por primera vez por Barton *et al.* (1991) que trabajó en la electroporación de protoplastos de *Coffea arabica*. En el mismo año J. Spiral y V. Petiard intentaron transformar protoplastos por *Agrobacterium*. En 1992 Feng *et al.*, utilizando cotiledones y embriones somáticos de *C. arabica* integraron un gen de resistencia a kanamicina. Sin embargo, en ningún caso se logró regenerar plantas transgénicas.

Fue hasta 1993 cuando J. Spiral *et al.*, utilizando un co-cultivo de *Agrobacterium rhizogenes* transformaron embriones somáticos de la especie *C. canephora*, logrando regenerar plantas transformadas, pero todas expresaron un patrón de raíz no viable.

En 1995 J. van Boxtel *et al.*, lo transformaron por biobalística, usando por primera vez como promotor el factor de elongación de *Arabidopsis* (EF-1a). Este promotor se usó posteriormente con *A. tumefaciens* para la transformación de *C. arabica* y *C. canephora* con el gen *cry1Ac* que le confiere resistencia a *Leucoptera coffeella*, minador de las hojas del cafeto, obteniendo más de 100 eventos de transformación y la regeneración de plantas resistentes al insecto, probadas a través de bioensayos en laboratorio y campo (Leroy *et al.*, 2000; B. Perthuis *et al.*, 2005).

Otros trabajos con regeneración eficiente de plantas transformadas de café se generaron al usar un doble promotor de virus del mosaico de la coliflor (35S) y bombardeo de microparticulas (Silva *et al.*, 2006; M. Gatica-Arias; 2008; Albuquerque *et al.*, 2009).

### **1. 4.1 Métodos de transformación genética**

Los métodos básicos para transferencia de genes al café son: electroformación de protoplastos; transferencia mediada por *Agrobacterium* y bombardeo de micropartículas.

### **1.4.2 Biobalística**

Este método consiste en el envío de micropartículas de tungsteno u oro, recubiertas de DNA purificado, impulsadas por presión de gas (helio), dentro de una cámara conectada a una bomba de vacío, sobre el material genético que se desea transformar a velocidades de alrededor de 300 m/s, las cuales pueden penetrar la pared y la membrana celular e introducir el material genético en células vivas, para su posterior expresión e incorporación estable, ya sea en el núcleo, cloroplasto o mitocondria (Birch y Bower, 1994).

En 1987 se establecen las bases de la balística biológica y en 1990 se transforman embriones de maíz y se obtienen plantas transgénicas fértiles bajo el uso de esta técnica (Gordon- Kamm *et al.* 1990).

### **1.4.3 Agroinfiltración y Agrospray**

La transfección transitoria es una técnica medida por vectores virales, con los cuales se logra la introducción y producción de proteínas de interés en diferentes tipos de células y organismos. Esta metodología esta mediada por *Agrobacterium* y por una unidad de transcripción que lleva un promotor, un terminador y una parte de codificación, que se transcribirán en un núcleo, incluso sin la integración al ADN en un cromosoma de la planta. Tal expresión resulta en una reprogramación transitoria de una célula vegetal.

Dicha reprogramación se ha logrado y se ha convertido en una herramienta estándar de laboratorio para la evaluación rápida de diferentes experimentos genéticos (Marillonnet *et al.*, 2005).

La agroinfiltración es una alternativa que permite la expresión de proteínas en plantas a altos niveles y en tiempos de expresión cortos (4 a 10 días). Dentro de las características de esta técnica está el uso de vectores con genoma de ARN de virus de plantas (Leuzinger, 2013) lo que permite una alta multiplicación, acumulación y posterior distribución en toda la planta del gen de interés. Para lograr la expresión de transgenes, éstos deben insertarse en el genoma del virus a través de tres técnicas: 1) Reemplazo de genes no esenciales del virus (como la envoltura) por los genes de interés; 2) Inserción de genes de interés bajo el control de un promotor adicional y 3) Fusión de genes, donde el gen de interés se fusiona a uno viral (Gómez Lim, 2011).

El agrospray fue una tecnología desarrollada por Nomad Bioscience GmbH, donde se asperja *Agrobacterium* con surfactantes (detergentes). Esta tecnología está en etapas tempranas pero tienen un gran potencial en la agricultura y en la manufactura de biomateriales. En la agricultura se podría “reprogramar” transitoriamente un cultivo para ser resistente a plagas, a estrés abiótico o mejorar la producción de compuestos y las plantas no serían transgénicas y el producto se podría comercializar como una solución para asperjar.

### **1.5 Cultivo *in vitro* de plantas**

Las técnicas de cultivo *in vitro* de plantas involucran el aislamiento de células, tejidos y órganos en un medio de nutrientes aséptico bajo condiciones controladas, con el objeto de obtener rápidamente multiplicación asexual de las células vegetales. Cualquier tejido dado, compuesto de células con un núcleo competente es un explante potencialmente apropiado para la iniciación de un cultivo *in vitro*.

El desarrollo de protocolos para regeneración de plantas *in vitro* de café inició en 1970 con la evaluación y selección de diferentes órganos de la planta tales como entrenudo jóvenes (Staritsky, 1970), brotes ortotrópicos (Sharp, *et al.* 1973), hojas (Söndahl y Sharp, 1973) y óvulos y anteras (Lanaud, 1981) en los cuales se observó un desarrollo de embriones, con baja frecuencia.

En 1985 Yasuda *et al.*, estableció un medio de cultivo con 6-bencilaminopurina, citocinina como único regulador de crecimiento necesario para obtener una mayor frecuencia embriogénica en explantes de hojas. Este medio de cultivo fue la base para establecer las diferentes estrategias de producción de embriones somáticos; para estudios morfológicos y de transformación genética.

Posteriores trabajos acerca de la inducción de embriones somáticos en café han demostrado la necesidad de combinar una auxina (2,4-D) y una citocinina (cinetina KIN o bencilaminopurina BAP) (Van Boxtel & Berthouly, 1995), siendo la citocinina la de mayor concentración en el medio, incrementándose la frecuencia embriogénica al emplear 6-bencilaminopurina (García y Memendez, 1987; Dufour & Carasco, 1991; Neuenschwander y Baumann, 1992; Berthouly y Michaux-Ferriere, 1996).

### **1.5.1 Origen y estado fisiológico del explante**

Diferentes estudios en café han demostrado que la inducción de embriogénesis somática depende del genotipo que se utilice (Sondahl *et al.*, 1991). Esta expresión también depende de la potencialidad celular del explante, debido a que no se observa la misma respuesta en todos los explantes de igual genotipo, lo que hace el sistema de producción dependiente de un número importante de variables. Un ejemplo claro del efecto del genotipo se observa entre especies *C. arabica* y *C. canephora* y entre cada una de sus respectivas variedades (Etienne *et al.*, 1999).

### **1.5.2 Inducción de embriogénesis somática (ES)**

La embriogénesis somática es la más clara expresión del fenómeno de potencialidad celular enunciado por Haberlandt en 1902, quien hizo el primer intento de cultivar células vegetales aisladas *in vitro* en un medio de cultivo. Pero White en 1934 demostró la potencialidad indefinida de crecimiento en raíces de tomate, estableciendo pautas para la diferencia entre organogénesis y embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es un proceso biológico por medio del cual se obtienen embriones perfectamente organizados a partir de células somáticas, debido a la totipotencialidad de las células vegetales para formar un nuevo individuo genéticamente idéntico a la célula madre (Berthouly, 1997).

Estos embriones somáticos se desarrollan cumpliendo todas las fases de un embrión cigótico (globular, torpedo y cotiledonario en dicotiledóneas) (Ammirato, 1983). Los embriones somáticos presentan una estructura bipolar, con meristemos apicales y desarrollo del suspensor en extremos de un mismo eje (Denchev *et al.*, 1992; Solano, 2001). Además, los embriones somáticos se caracterizan por no presentar conexión vascular con el tejido materno (Litz y Jarret, 1991).

### **1.5.3 Efectos de fuentes de carbono y reguladores de crecimiento**

Las fuentes de carbono proveen de energía a las células además de mantener el potencial osmótico en el medio de cultivo. Strickland y colaboradores en 1987, indican que la maltosa incrementa la producción de embriones somáticos en comparación a la sacarosa, pero en *Coffea* se ha observado una mejor respuesta al usar sacarosa. Sin embargo se ha evaluado el uso de maltosa, glucosa y fructuosa en la inducción de embriones somáticos y la diferencia está dada por el genotipo (Fuentes *et. al* 2000).



Los primeros trabajos de medios de cultivo en café realizados por Yasuda en 1985 resaltan el papel de las citocininas en la producción de embriones somáticos. Dentro de las citocininas más usadas en café, la bencilaminopurina (BAP), tiene efectos positivos en la embriogénesis somática de *Coffea arabica* y del híbrido Arabusta (Dublin, 1981; Yasuda *et al.*, 1985) mientras que los embriones somáticos de *Coffea canephora* responden mejor al 2-iP (N-isopentenil adenina) (Hatanaka *et al.*, 1991). Estos autores indican que las auxinas inhiben la embriogénesis somática en *Coffea canephora*.

Litz y Jarret en 1991 resaltaron el uso de auxinas en la obtención de embriogénesis somática de alta frecuencia, originada principalmente por el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y el ácido indolacético (AIA).

## II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad el sector cafetalero nacional necesita recuperar la producción y alcanzar rendimientos que permitan satisfacer la demanda nacional y competir en el mercado internacional. Con esta finalidad, se están desarrollando estrategias como la renovación de los cafetales por parte de diversas instituciones con la finalidad de repoblar los cafetales con variedades de mayor productividad, resistentes a plagas y enfermedades, así como incrementar la densidad de poblacional.

Para cumplir estas metas se requiere conocer las principales plagas y enfermedades que limitan la producción en México, tales como la roya del café (*Hemileia vastatrix*), la cual en infecciones severas puede ocasionar la muerte de la planta, y el barrenador del fruto (*H. hampei*) que en infestaciones muy altas puede generar pérdidas hasta del 80% de la producción.

En el presente trabajo se plantea una estrategia para la producción de plantas de café resistentes a la broca, o plantas que puedan expresar esta resistencia en el período de mayor ataque (120 a 150 días después de iniciar el desarrollo del fruto), con el uso de genes que codifican para la proteína Cry10Aa de *B. thuringiensis* serovar *israelensis*, la cual tiene efecto toxico letal sobre las larvas de primer instar de este insecto, siendo una alternativa para el control efectivo de *Hypothenemus hampei*.

### III. HIPOTESIS

El uso de diferentes técnicas de transformación de plantas permitirá la expresión del gen *cry10Aa* de *Bacillus thuringiensis* en *Coffea arabica*, como un futuro desarrollo biotecnológico para el control efectivo de *Hypothenemus hampei*.

### IV. OBJETIVOS

#### 4.1 OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS

Establecer un protocolo que permita la expresión estable o transitoria del gen *cry10Aa* de *B. thuringiensis* en clones transgénicos o frutos de café, para el control de la broca, *Hypothenemus hampei*.

#### 4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS Y ACTIVIDADES

**Fase I-Implementar la región toxica del gen *cry10Aa* de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* para transformación genética.**

1. Diseñar la región tóxica del gen que expresa la toxina Cry10Aa, para sintetizarla con codones optimizados
2. Realizar la construcción de vectores para la transformación.

**Fase II- Establecer el Protocolo de cultivo *in vitro* para producción de línea embriogénica de café.**

3. Establecer el proceso de la embriogénesis somática de café.

**Fase III- Establecer el Protocolo de transformación genética estable *in vitro* y transformación transitoria *in situ* de café.**

4. Generar clones transgénicos con el uso de embriones somáticos y bombardeo de DNA.
5. Transformar tejidos de café por agroinfiltración y agrospray
6. Analizar la inserción y expresión del gen heterólogo.

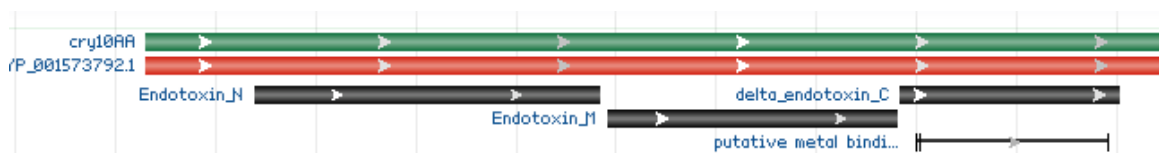
## IV. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Implementación de la región tóxica del gen *cry10Aa* de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* para transformación genética

#### 5.1.1 Optimización de codones

La secuencia analizada ha sido la correspondiente a la encontrada en la NC\_010076 de NCBI, (*Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* plásmido pBtoxis, complete sequence) la cual tiene un total de 127,923 pares de bases (pb). La secuencia correspondiente al gene *cry10Aa* inicia en 39,061 pb a 41,088 pb, teniendo así un total de 2,028 pb, codificando para una proteína de 675 aminoácidos (WP\_001070502).

Esta proteína se expresa de forma silvestre hasta el codón de AAT (N). Se ha reportado que en este codón debería de iniciar el ORF2, pero al analizar la secuencia completa en el plásmido se encontró un GAP, de 48 pb, que corta y separa la proteína, de la secuencia formadora del cristal (Hernández, 2006) convirtiendo a Cry10Aa en una proteína acristalífera y truncada. Esto se confirmó con la eliminación del GAP y la unión del ORF1 y la secuencia que debería corresponder al ORF2 (Esta región se seleccionó por ser una secuencia conservada de Cry4Aa), logrando con ello la formación del cristal en Cry10Aa (Hernández, 2006) (Fig. 3).



**Fig. 3.** Diagrama de las regiones genómicas, transcritos y productos de la delta- endotoxina Cry10Aa (ORF1), descritos en NCBI, (secuencia de nucleótidos y de aminoácidos discriminados por cada dominio) del primer marco de lectura.

La optimización de codones se realizó con la secuencia de nucleótidos original en Bti, para producción de aminoácidos que traducen para la endotoxina. Con el fin de establecer la optimización con la mayor cantidad de codones conservados de Bti se utilizaron tres diferentes métodos, uno de ellos manual que permitía establecer los codones preferenciales en café, conservando parte de los codones usados por la bacteria. Con esta estrategia se logró disminuir el porcentaje de A-T de los genes *cry* de 64% al 55% establecido como óptimo para la expresión de este tipo de proteínas en dicotiledóneas (Ely, 1993; Maliga, 2004). Se utilizaron dos plataformas: la de Genscript y la plataforma de Integrated DNA technologies, donde se observó el porcentaje de frecuencia de codones y se comparó con frecuencia de los mismos, para producir aminoácidos codificantes para cafeína.

Los principales cambios se dieron en el nucleótido final del codón, que codifica para aminoácidos como Leucina, Valina, Acido aspártico, Isoleucina y en casos muy específicos en Serina, Treonina, Arginina y Prolina. Con esto se logró establecer la mayor frecuencia conservada y óptima de codones, para producir la endotoxina en la planta. Se seleccionó la región consenso de las diferentes optimizaciones con el software multialin versión 5.4.1 y se envió a sintetizar a Genescript.

La secuencia final del gen que codifica para la delta endotoxina fue de un total de 1990 pares de bases incluidos sitios de restricción específica *BsaI* para la ligación en el vector pMDC85 y el vector viral PVX-mini.

### **5.1.2 Selección y caracterización de vectores**

Se seleccionó el plásmido pMDC85, el cual es un vector para análisis de localización subcelular de proteínas (Curtis, 2003), utilizado para transformaciones estables y agroinfiltración de hojas (Kobayashi, et al. 1985). Es un plásmido binario que cuenta con doble copia del promotor 35S del virus del

mosaico de la coliflor y el terminador NOS de *A. tumefaciens*, la tecnología Gateway (attr1, attr2), el gen *hpt* (higromicina fosfotransferasa) que le confiere resistencia a higromicina en plantas, y el gen *ntplI* (neomicina fosfotransferasa II) que le confiere resistencia a kanamicina en bacterias (Curtis, 2003), el cual fue suministrado por el Dr. Stephan De Folter y el PVX-mini y PVX-GFP por el Ms. Marco Plancarte.

### 5.1.3 Amplificación por PCR del gen *cry10Aa* sintetizado

La secuencia completa del gen *cry10A* se obtuvo mediante un análisis *in silico* de la secuencia del Genbank correspondiente al ORF1 (AN: AL731825), con el software de Snapgene (2015).

Se diseñaron iniciadores específicos para amplificar la región tóxica del gen *cry10Aa*, con los software Oligocalculator, AmplifX y Snapgene y se añadieron los sitios de restricción BsaI. Estos sitios permiten la clonación del gen utilizando la técnica de Golden Gate Assembly en el plásmido PVX-mini (Tabla 3).

Los oligos diseñados fueron:

Directo: 5' gGGTCTCACATGAACCCCTAC 3'

Reverso: 3' ATCTGAGACCTCCTTGAGTGATTG 5'

Tabla 3. Reactivos de PCR para amplificación del gen *cry10Aa*

Reactivos	Volumen (µl/)
Buffer 5x	5
MgCl <sub>2</sub>	1.5
dNTPS 10mM	0.5
Oligo directo 10mM (Sigma)	0.5
Oligo reverso 10 mM (Sigma)	0.5
DNA digerido (10 ng/ µl)	2
Taq DNA polimerase 10x (Invitrogen)	0.5
H <sub>2</sub> O Mili-Q estéril	39.5
<b>Volumen Total</b>	<b>50</b>

El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min; seguida de 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 segundos; alineamiento a 58°C durante 30 segundos; extensión 72°C durante 2 min y un ciclo de extensión final de 10 min a 72°C.

Las amplificaciones se analizaron por electroforesis en agarosa al 1% (p/v) para verificar la presencia de una banda de 1,996 pb y posteriormente realizar el corte y purificación del ADN con el kit Gel DNA Recovery de Zymo Research™β.

#### 5.1.4 Clonación en pCR/8GW/TOPO

Después de purificar el producto de PCR del gen *cry10Aa*, este fue clonado al vector *pCR™8/GW/TOPO® TA Cloning®*. Este vector tiene la tecnología *Gateway®* el cual cuenta con sitios *AttL1* y *AttL2* para clonación específica y posterior recombinación homóloga con el vector final, el pMDC85. La resistencia del vector es a la espectinomicina.

La ligación del gen en el vector *TOPO8* así como la amplificación de éste en *E. coli* se realizó bajo las condiciones recomendadas por el fabricante. Las clonas que se obtuvieron se analizaron por electroforesis en agarosa para comprobar la correcta clonación de transgen (Fig. 4).

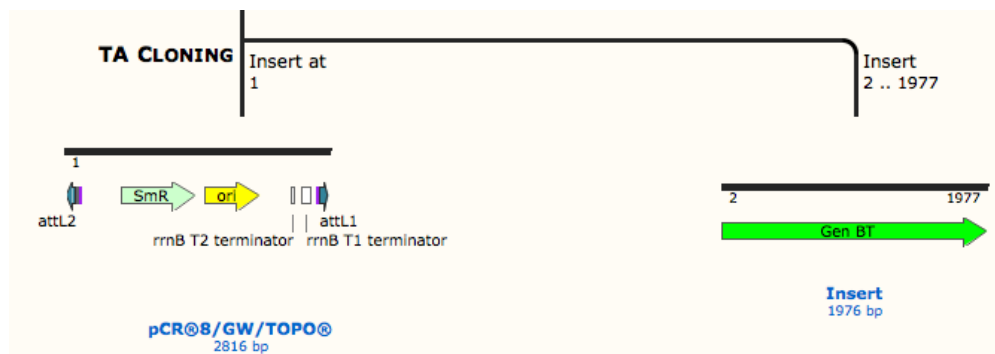


Fig.4. Esquema *in silico* de la clonación del producto de PCR en el vector pCR8/Gw/TOPO; generado Snapgene.

### 5.1.5 Recombinación en vector pMDC85

Para la recombinación homóloga de los sitios GW (AttL<sub>1-2</sub> y AttR<sub>1-2</sub>) de los plásmidos de entrada *TOPO8-cry10Aa* y de salida *pMCD85* se utilizó la enzima *Gateway<sup>®</sup> LR clonase<sup>™</sup> II Enzyme Mix, TOPO8-cry* la cual garantiza que el inserto se clone en la dirección correcta y que el marco de lectura del gen esté en sentido para que la traducción sea funcional bajo el enhancer del promotor de expresión. La reacción de clonación se llevó a cabo utilizando el protocolo del fabricante.

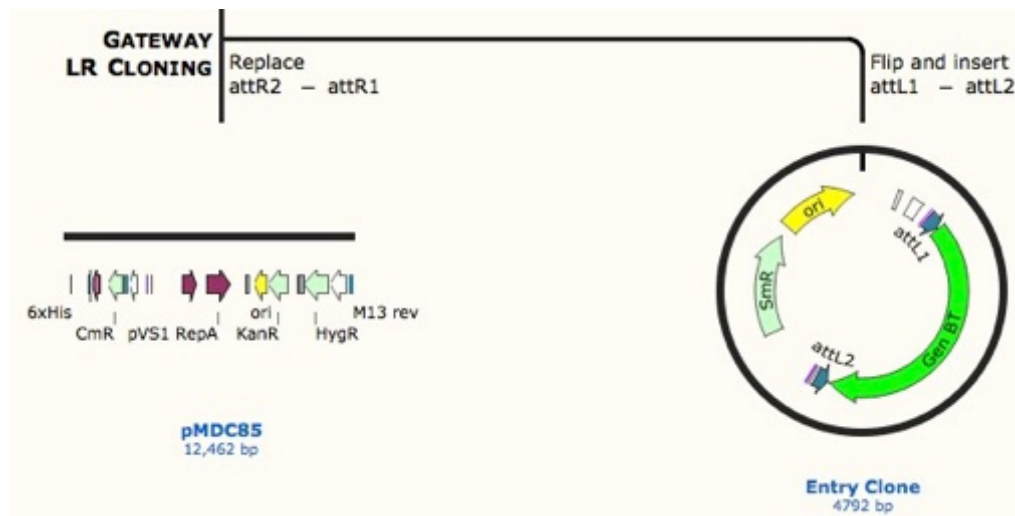


Fig. 5. Recombinación del vector pCR8/Gw/TOPO y pMDC85; utilizando la enzima *LR clonasa*; generado *in silico* en Snapgene.

### 5.1.6 Golden Gate Assembly en PVXmini

Conocido como el ensamble de puerta de oro (Engler et al. 2008), tiene sus orígenes en 1996, cuando por primera vez se demostró que las inserciones múltiples podrían ser clonadas en un vector principal utilizando una secuencia específica de reconocimiento o actividades simultáneas (la restricción con una enzima tipo IIS y la ligación con T4 DNA ligasa) (Padgett, and Sorge, 1996). Este método y sus métodos derivados explotan la capacidad de las endonucleasas de restricción tipo IIS (REases) para clonar el ADN fuera de la secuencia de



reconocimiento. Los insertos y los vectores de clonación son diseñados con un sitio de reconocimiento tipo IIS, contiguo al sitio de clonación, de manera que la endonucleasa puede eliminar la secuencia de reconocimiento y clonar el inserto en el vector principal.

Dentro de las ventajas de este método es que el número de religaciones son bajas porque la secuencia saliente no se reconoce por la endonucleasas y por lo tanto no se religa o inserta en sentido opuesto y permite el ensamblaje ordenado de múltiples fragmentos simultáneamente. El sitio de restricción se elimina del producto ligado, por lo que la digestión y la ligación se pueden llevar a cabo simultáneamente (Sanjana, et al., 2012) (Fig. 6, Tabla 4).

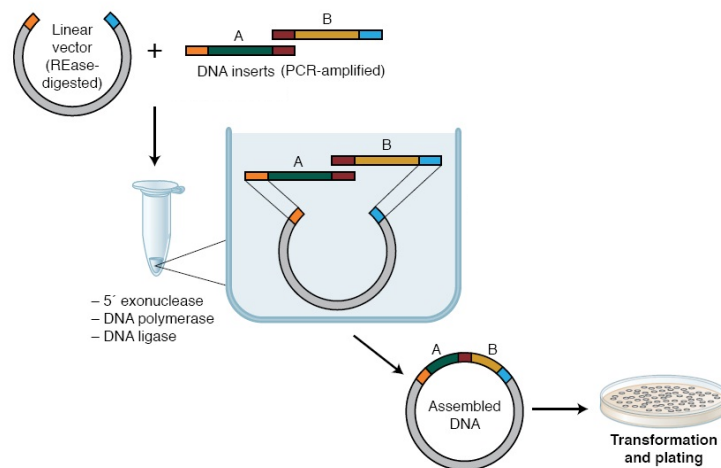


Fig. 6. Diagrama de clonación del Golden Gate Assaembly; Tomado de <https://www.neb.com/>, (2016).

Tabla 4. Reactivos de Golden Gate Assembly para clonación del gen cry10Aa

Reactivos	Volumen ( <sup>001</sup> /)
Plásmido PVX-mini (400 ng)	1
Plásmido PUC57 con Bti (100 ng)	1
Buffer 10X de ligación	2
BSAI 1x (10 unidades )	1
Ligasa (3 unidades)	1
H <sub>2</sub> O Mili-Q estéril	14
<b>Volumen Total</b>	<b>20</b>

Programa: 30 ciclos (2 min. a 37 °C y 3 min. a 16°C); un ciclo (5 min a 50°C) y un ciclo (5 min a 80°C). Modificado de (Medina R. H, 2016).

### **5.1.7 Secuenciación del gen *cry10Aa* clonado en café**

Se tomó una muestra representativa de las clonas positivas y el ADN plasmídico *pMDC85-cry10Aa* purificado, se secuenció en Macrogen Corp. Con los datos obtenidos se realizó un alineamiento de los sitios de inicio, fusión y terminación del transgen para corroborar su correcta clonación en el vector de expresión *pMDC85-cry10Aa*.

Por otro lado, con la misma secuencia se realizó una predicción *in silico* de la estructura tridimensional de la proteína. Para ello se utilizó el software *I-TASSER* (Zhang 2008) con el que se obtuvo la predicción de la proteína en formato “pbs” y por último se empleó el software PyMOL. Con el cual se visualizó la estructura de la proteína en tercera dimensión. Se analizó la predicción de la estructura con respecto a la estructura típica de la delta-endotoxina Cry10Aa, con el objetivo de detectar posibles cambios estructurales.

### **5.2 Establecimiento de protocolo de cultivo *in vitro* para producción de línea embriogénica de café.**

Los ensayos para establecer el protocolo óptimo de obtención de embriones somáticos de café y transformación estable se realizaron en el laboratorio de transformación genética en el Departamento de Ingeniería Genética Cinvestav-Irapuato, bajo la dirección del Dr. José Luis Cabrera Ponce, con quien se diseñaron los diferentes ensayos para la selección de métodos de desinfección, medios de cultivo de inducción, medios de maduración de embriones y la transformación genética por biobalística de la línea embriogénica obtenida previamente.

### **5.2.1 Selección del tipo de explante**

De las plantas de café de 8 meses de edad provenientes de Tapachula, Chiapas, se seleccionaron muestras de hojas jóvenes, la segunda o tercera hoja en sentido descendente desde la parte apical del brote y las hojas adultas, hojas de las partes bajas de la planta con longitudes mayores a los 7 cm. Las muestras se tomaron de 5 variedades: Arabica o típica, Garnica, Oro Azteca, Maragogipe y Bourbon. El proceso de desinfección de las hojas procedentes de invernadero se tomó de la metodología descrita por Cabrera-Ponce (2015).

- 1) Se ubica el desecador en la campana de extracción de gases y se ubican las hojas dentro, posteriormente se vierte el hipoclorito de sodio (NaOCl) 50 ml y ácido clorhídrico (HCl) 50 ml y se tapa inmediatamente. Se deja el material por 15 minutos.
- 2) Una vez que los explantes fueron expuestos al gas, en la campana de flujo laminar se realizan 2 lavados con agua estéril.
- 3) Se ubican los explantes sobre el medio de cultivo de prueba, se toman las muestras para realizar los cortes (0.5 cm<sup>2</sup>) y se procede a cultivar (12 cortes por caja petri).

### **5.2.3 Evaluación de medios de cultivo para inducción de ES**

Previa revisión bibliográfica, se seleccionaron los medios descritos por Yasuda *et al.*, 1985; Leroy *et al.*, 2000, Albuquerque *et al.*, 2009, Giridhar, *et al.*, 2004, Bobadilla, *et al.*, 2013, Mukul-Lopez *et al.*, 2012. Se realizaron modificaciones de diferentes variables y se incluyó un control, para lograr respuestas comparativas. Todos los medios utilizados tienen como base las sales minerales del medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962).

El cambio principal es en el contenido de vitaminas, reguladores de crecimiento y agente gelificante. En la tabla 5 y 6 se muestra la composición de los medios de cultivo. Las condiciones de crecimiento fueron en oscuridad a 25°C.

A los medios de cultivo se les ajustó el pH a 5.8. Posteriormente los mismos se esterilizaron en una autoclave durante 21 minutos a 121° C.

Tabla 5. Composición de medios para inducción de embriones somáticos en café.

<b>Especie</b>	<b>Medio</b>	<b>Medio Inducción de callo (MIC)</b>	<b>Referencia</b>
<i>Coffea arabica</i> , <i>C. Canephora</i>	Triacantanol	TRIA(4.8mg/l), BAP (0,3 mg/l) ½ MS, Sacarosa 2% Gelrite 0.25% - 0,7%	Giridhar, <i>et al.</i> , 2004.
<i>Coffea arabica</i>	Yasuda - BAP	¼ MS; BAP (1 mg/l), Sacarosa 3%, Glucosa 6%, Gelrite 0.25%	Yasuda, <i>et al.</i> , 1985.
<i>Coffea arabica</i>	MIC-6	½ MS; 2,4D (0,5mg/l), IBA(1mg/l), 2iP (2mg/l), Sacarosa 3%, Gelrite 0,25% - 0,7%	Bobadilla, <i>et al.</i> , 2013.
<i>Coffea arabica</i> , <i>C. Canephora</i>	MIC-L1	½ MS, vitaminas de malta (400mg/L), caseina (100mg/l), 2-4D (0,5mg/l), IBA (1mg/l), 2iP(2mg/l) , Sacarosa 3%, Gelrite 0,2%	Leroy <i>et al.</i> 2000, Albuquerque et al., 2009 .

## 5.2.4 Evaluación de medios de cultivo para producción de ES

Después de la inducción del callo proembriogénico se procedió a subcultivarlos cada 30 días en medios que permitieran el desarrollo y la producción de embriones somáticos de café.

Tabla 6. Composición de medios para inducción de embriones somáticos en café.

Especie	Medio	Medio producción de embriones (MPE)	Referencia
<i>Coffea arabica</i> , <i>C. Canephora</i>	Triacantanol	½ MS, BAP (0,9 mg/l), AIA (0,57mg/l), Tiamina (100mg/l), Sacarosa 2% Gelrite 0.25%	Giridhar, <i>et al.</i> , 2004.
<i>Coffea arabica</i>	Yasuda - BAP	½ MS; 2,4D (1mg/l), KIN (1mg/l), L-cisteína (40mg/l), Sacarosa 3%, Gelrite 0.25%	Yasuda, <i>et al.</i> , 1985.
<i>Coffea arabica</i>	MPE-6	MS; 2,4D (1mg/l), BAP(4mg/l), Sacarosa 3%, Gelrite 0,25%	Bobadilla, <i>et al.</i> , 2013.
<i>Coffea arabica</i> , <i>C. Canephora</i>	MPE-L2	½ MS, Tiamina (20mg/l), Extracto de malta (800mg/L), caseína (200mg/l), Adenina(60mg/l), 2-4D (1mg/l), BAP (4mg/l), Sacarosa 3%, Gelrite 0,32%	Leroy <i>et al.</i> 2000, Albuquerque <i>et al.</i> , 2009
<i>Coffea arabica</i> , <i>C. Canephora</i>	Suspensiones celulares	MS, L-cisteína (35mg/l), 2,4D (1mg/l), BAP (2mg/l) - KIN (2mg/l), ANA (0,5mg/l)	Mukul-Lopez <i>et al.</i> , 2012

### **5.3 Establecimiento de Protocolo de transformación genética estable y transitoria de café.**

Para el bombardeo de tejido embriogénico de café, se realizaron los siguientes pasos previos: preparación de material biológico, preparación de microproyectiles, aislamiento y purificación del DNA para el bombardeo, recubrimiento del oro o tungsteno con el DNA y diseño experimental de bombardeo.

#### **5.3.1 Preparación material para transformación**

1) Se seleccionaron masas proembriogénicas, previa evaluación de viabilidad de núcleo competente y masas embriogénicas (de 12 a 25 embriones por cada estructura embriogénica). Se realizaron 5 experimentos, cada uno de 12 placas más 3 controles para un total de 75 placas (aprox. 25 estructuras embriogénicas por caja).

La mitad del material correspondió a masas proembriogénicas con núcleo potencial viable (prueba con azul de Evans) y el resto a masas embriogénicas de 12 a 25 embriones por estructura.

2) Las estructuras competentes se disectaron en segmentos de 5 mm y se subcultivaron en el centro de la caja Petri en un área de 4 cm<sup>2</sup> en medio MPE, 3 días antes del bombardeo, conservándose en condiciones de oscuridad a 25°C.

3) En los experimentos 001 y 005 se aplicó un tratamiento osmótico de sacarosa al 12% y manitol + sorbitol 0.2M, por 16 horas antes del bombardeo y 16 horas después (Cabrera, 2015.)

**Preparación de microproyectiles de oro (Au)-tungsteno (W); tomado de Cabrera-Ponce ,1997.**

1. Pesar 60 mg de partículas de Au o W
2. Resuspender en 2 mL de HNO<sub>3</sub> 0.1 N y sonificar por 20 minutos
3. Centrifugar a 10,000 rpm x 2 minutos
4. Eliminar sobrenadante y aplicar 2 mL de etanol concentrado, sonicar brevemente.
5. Centrifugar a 10,000 rpm x 2 minutos.
6. Eliminar sobrenadante, resuspender en 1 mL de agua desionizada estéril.
7. Tomar 4 alícuotas de oro de 250 µL resuspender cada una en un tubo con 750 µL de agua desionizada estéril
8. La concentración final de Au o W en cada uno de los tubos es de 15 / µL
9. Almacenar a -20 °C

**Recubrimiento del DNA a los microproyectiles de oro; tomado de Cabrera-Ponce (1996).**

Previo al aislamiento y purificación del ADN del plásmido pMDC85+Bti y TACH-Ctrl).

1. Mezclar
  - a. 50 µL de oro (750 µg)
  - b. 10 µg de DNA
  - c. 50 µl de CaCl<sub>2</sub> 2.5 M
  - d. 20 µl de espermidina base libre 0.1 M
2. Mezclar y sonicar hasta observar que el oro se resuspenda en forma homogénea
3. centrifugar 10 segundos a 10,000 rpm
4. lavar con 400 µl de etanol absoluto
5. centrifugar 10 segundos a 10,000 rpm
6. Eliminar sobrenadante

7. Resuspender en 60  $\mu$ l de etanol concentrado
8. Sonicar brevemente
9. Aplicar 10  $\mu$ l de mezcla en las membranas Kapton (macroacarreadores)
10. Por cada disparo hay 12  $\mu$ g de oro con 1.6  $\mu$ g de DNA. Preparación para 6 disparos.

### **Diseño experimental**

Se realizaron 5 experimentos cada uno de 12 placas más 3 controles para un total de 75 placas (aprox. 20 estructuras competentes por caja). La mitad del material correspondió a masas proembriogénicas con núcleo potencial viable (comprobado por tinción con azul de Evans) y el resto a masas embriogénicas (12 a 25 embriones por estructura).

#### **5.3.2 Transformación genética mediante bombardeo de micropartículas recubiertas de ADN**

El sistema de bombardeo de micropartículas que se utilizó en este trabajo fue el sistema de helio de alta presión PDS 100-He, diseñado por Sanford et al. (1991).

Los parámetros de bombardeo fueron; Presión de disparo: 900 psi (Rosillo et al.; 2003) y 1,350 psi (Ribas et al., 2005). Partículas de 1.2  $\mu$ m (oro) y 0.73  $\mu$ m (M10- Tugsteno); un disparo por placa, concentración de partículas; 125  $\mu$ g/por disparo, concentración de DNA, 1.66  $\mu$ g/por disparo; evacuación 0.07 atmósferas y distancia recorrida por DNA/Au o W; 7 centímetros.

#### **5.3.3 Transformación por agroinfiltración con *A. tumefaciens* en hojas de plantas de café**

Se realizaron tres ensayos independientes por agroinfiltración usando un inóculo mixto de dos cultivos de *Agrobacterium* que albergan al vector pMDC85-Bti más



el plásmido PEAQ (plásmido que contiene el factor p19 – para evitar el silenciamiento post-traducciona; producido como respuesta a la expresión de

una proteína heteróloga en la planta) y un control positivo pICH7410-GFP el cual forma parte del sistema MagnICON (ICON Genetics, Alemania) que consiste en un virus desensamblado el cual requiere al plásmido con el gen de interés (Bti o GFP), así como a los vectores pICH14011 (Integrasa) y pICH15879 (Citoplasma).

En el primer ensayo se evaluaron diferentes concentraciones de los dos plásmidos, para seleccionar el tratamiento con mayor expresión de la proteína. Los tratamientos se dividieron en concentraciones de pMDC85-Bti: PEAQ; 1) 1:1, 2) 1:2 y 3) 1:3, y se replicaron en *Nicotiana benthamiana*.

El tratamiento seleccionado correspondió a la relación 1:3 (1 de pMDC85-Bti: 2 PEAQ), y con este tratamiento se realizó el ensayo final. En él se evaluó la presencia de la proteína 2, 4, 6 y 8 días después de la agroinfiltración de las hojas en la planta de café. Para este ensayo se agroinfiltraron 40 hojas de café, 20 agroinfiltradas con la relación 1:3 de pMDC85-Bti: PEAQ y las otras 20 con el P-GFP, cada 2 días se colectaron 10 hojas agroinfiltradas (5 de cada plásmido) y 5 hojas sin ningún tratamiento para control negativo, sumergidas inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y procesadas para el protocolo de extracción de proteínas.

El inóculo mixto de las cepas con pMDC85, PEAQ, P-GFP, Integrasa y citoplasma en *Agrobacterium*, se realizó en medio YEB más el antibiótico kanamicina 50 mg/L para las dos primeras y carbenicilina 100 mg/L para las tres siguientes, se incubaron en agitación a 200 RPM a 28°C hasta alcanzar una DO a 600 nm de 1.2 para pMDC85-Bti y PEAQ; y de 1.5 para los otros vectores según la técnica de Marillonnet (2004).

Se realizaron dos mezclas 1) pMDC85-Bti y PEAQ y 2) citoplasma, integrasa y P-

GFP; se agregó acetosiringona 200  $\mu$ M y se dejó en incubación por 2 horas a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó la mezcla a 4,500 RPM por 20 minutos y el pellet se resuspendió en MES 10mM y MgSO<sub>4</sub> 10mM en una dilución 1:10. La agroinfiltración se realizó previa selección de hojas en la planta de café de 18 meses (Fig. 7a). Para esto se hizo una pequeña herida en el envés de la hoja y se realizó presión con una jeringa sin aguja con la solución del *A. tumefaciens* con los vectores de expresión, llegando a los espacios intracelulares de la hoja. (Fig. 7b-7c).

#### **5.3.4 Transformación por agrospray con *A. tumefaciens* en hojas de plantas de café**

La técnica de agrospray es una tecnología desarrollada por Nomad Bioscience GmbH, donde se asperja un inóculo de *Agrobacterium* con los plásmidos a utilizar, junto con surfactantes. Es una técnica que presenta alto potencial en la agricultura. Los vectores usados forman parte del sistema MagniCON (ICON Genetics, Alemania) descrito anteriormente. La diferencia es que el plásmido de citoplasma se evaluó con especificidad dirigida a apoplasto (pICH31340) y a citosol (pICH28544). El plásmido que expresa la proteína Cry10Aa, está bajo el control de la proteína de movimiento del virus X de la papa (PVX) y el control positivo es la misma construcción pero expresando la proteína verde fluorescente (GFP).

Se realizó la preparación del inóculo para las dos construcciones (protocolo descrito en la metodología de agroinfiltración) y se adicionó a la mezcla de *Agrobacterium* el agente surfactante: 1 ml de 0.1% de solución de carborundum (w/v) (Fisher Scientific, Atlanta, GA, USA, 2002) y 0,1% Silwet L-77 (Giritch, *et al.*, 2011). Con el inóculo final se asperjaron 40 hojas por cada construcción cada 2 días y se colectaron 20 hojas agroinfiltradas (10 de cada plásmido, 5 con efecto a citosol y 5 a apoplasto) y 5 hojas sin ningún tratamiento para control negativo. Se congelaron inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y se procesaron para el protocolo de extracción de proteínas.

Se asperjaron 2 plantas diferentes (una para evaluar expresión dirigida a citosol y otra para evaluar la expresión dirigida a apoplasto) y por planta 4 ramas (2 para expresión de Bti y 2 para expresión de GFP). El agrospray se aplicó previa selección de hojas en la planta de café de 18 meses (Fig. 7d).

Se observan las microheridas ocasionadas después de aplicación del inóculo con el agente surfactante, las cuales permitirán la entrada de los vectores a los espacios intracelulares de la hoja (Fig. 7e-7f).

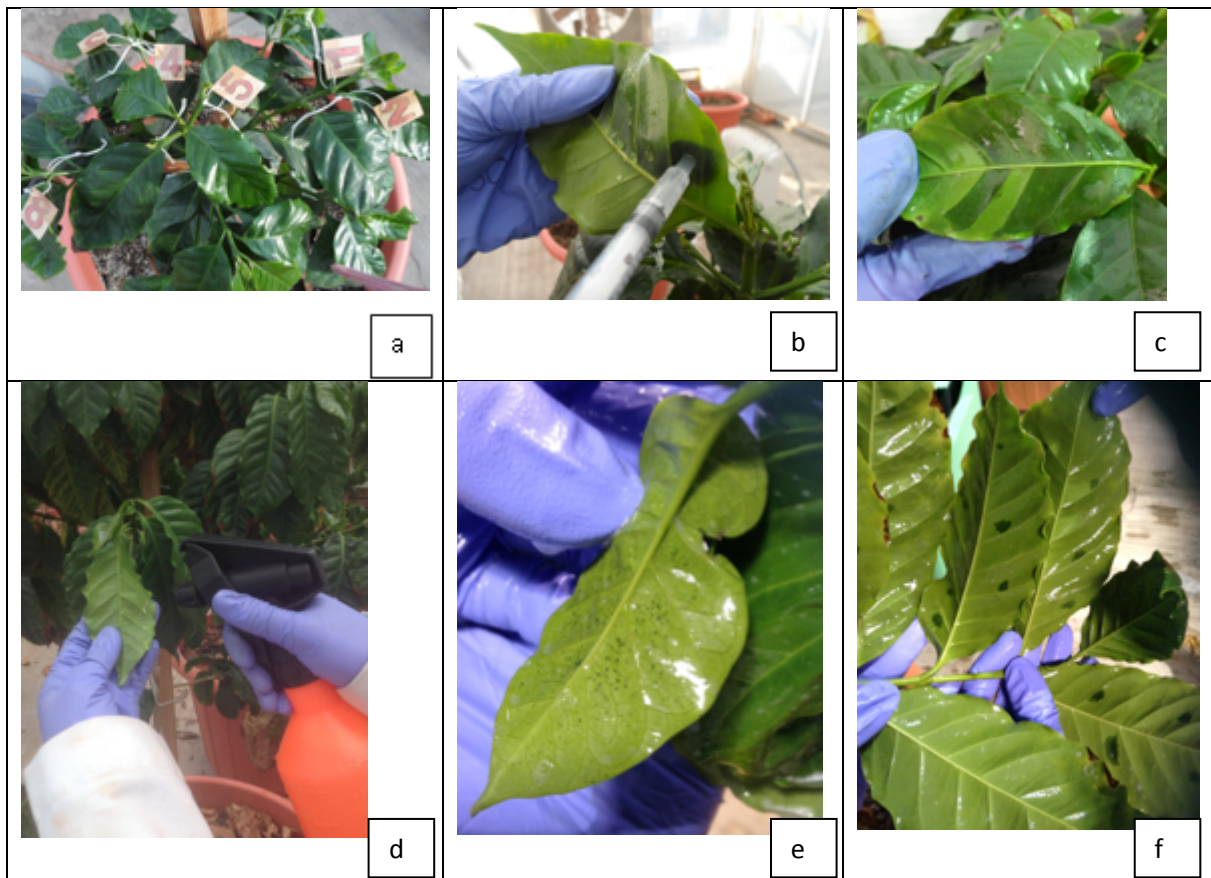


Fig. 7. Procedimiento de agroinfiltración y agrospray en hojas de café. Se muestra: .a) la selección de las hojas a agroinfiltrar en la planta de café; b) la infiltración del inóculo de *Agrobacterium* con los vectores de transformación; c) movimiento a través de los espacios intracelulares de la hoja; d) Se muestra la aplicación con spray del inóculo en el envés de la hoja; e) las microheridas para entrada, y f) infiltración del inóculo de *Agrobacterium* con los vectores de transformación a través de los espacios intracelulares de la hoja.

### 5.3.4 Selección del material transformado

#### Embriones somáticos

La selección de las clonas de café se realizó por la supervivencia observada en el antibiótico y la expresión de gen reportero, los cuales son características que se integran de manera conjunta con el gen de interés, ya que ambos se expresan bajo el mismo promotor en el vector de transformación.

Después de la transformación, las estructuras proembriogénicas y embriogénicas se subcultivaron en medio de producción de embriones con 50 mg/l de higromicina y el control con 100 mg/L de kanamicina; estas concentraciones se determinaron después de realizar una curva de mortalidad y observar el 100 por ciento de mortalidad en las concentraciones seleccionadas anteriormente. Las clonas regeneradas se subcultivaron cada 15 días. Aunque trabajos anteriores recomiendan 100 mg/L de higromicina (Leroy *et al.*, 2000) y 400 mg/L de kanamicina (Albuquerque *et al.*, 2009), en nuestro caso las dosis necesarias fueron más bajas.

La evaluación con visualización del gen reportero se realizó a los 5, 15 y 30 días después del bombardeo. Las imágenes se obtuvieron usando un stereomicroscopio de fluorescencia Leica - MZ10FluoIII (optic 0.63 Zeiss) con una cámara DC 300F (Leica Microsystems, Welzlar, Germany) con 3 filtros de GFP para plantas (el filtro usado fue ET: CFP2) con una onda de excitación de 470-540 nm, y onda de emisión de 525-550 nm.

Finalmente se realizó la extracción de proteínas de los embriones a partir de 1 g de material vegetal macerado en nitrógeno líquido, para lo que se usaron 3ml de buffer de extracción (Tris-HCl 500 mM, EDTA 50 mM, sacarosa 700 mM, KCl 100 mM, 2% de betamercaptoetanol y PMSF 2 mM a un pH 8), se agitó la muestra en hielo por 10 min y se agregaron 3 ml de buffer Tris saturado con fenol y se dejó 10

min a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos.

Se recuperó la fase superior (acuosa) y se adicionaron 3 ml de buffer de extracción, se agitó y se centrifugó a 10,000 gravedades por 10 min. Después se recuperó la fase acuosa y a esta fase se le adicionaron 4 volúmenes de solución de precipitación (acetato de amonio 0.1 M en metanol) y se dejó toda la noche a -20°C, después se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min, se realizaron 3 lavados con solución de precipitación fría y un lavado con acetona fría, se deja secar el pellet y resuspendió en 0.1 ml de buffer EIF (Thiourea 2M, Urea 8M, Chaps 4%, Tritón 2%, DTT 50 mM) (Thiellement, 2007).

### **Expresión de GFP en hojas transformadas.**

Las hojas transformadas en invernadero se evaluaron en la noche, desde el día dos hasta el día ocho con lámpara UV y se realizó la extracción de proteínas de las muestras de hojas. Estas se maceraron, posteriormente se adicionó el buffer de extracción ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$  1%, Tween 80 0.1%) en relación 1:1, se filtró y ajustó el pH, se incubó a 45 °C por 20 minutos y se centrifugó durante 15 min a 10,000 rpm a 4°C, se resuspendió el pellet en PBS 1x a pH 7.2 (NaCl 138 mM, KCl 3 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,1 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.5 mM) se dejó en agitación toda la noche a 4°C, se centrifugó a 10,000 RPM por 15 min y se cuantificó cada muestra.

Se verificó la integridad de las proteínas separándolas mediante electroforesis SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato Sódico) al 10%, corrida a 110V por 1 hora. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie; y la cuantificación de proteína se determinó por el método de Bradford (1976), la absorbancia se leyó a 595 nm y se utilizó una curva estándar de calibración de 0.1 a 2 mg/ml de albúmina sérica de bovino (BSA).

## IV. RESULTADOS

### 6.1 Implementación de la región tóxica del gen *cry10Aa* de *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* para transformación genética

#### 6.1.1 Análisis de restricción de la clonación en pCR8/gw/topo

La secuencia correspondiente al gen *cry10Aa* sintetizada en el pUC57 con un peso de 1,976 pb, amplificada y clonada en el pCR8/gw/topo se confirmó mediante PCR y mediante digestión con la enzima *EcoRI*; con la cual se deben de obtener 3 bandas 2799 pb, 1342 pb y 616 pb, las cuales corresponden a la liberación y corte del gen en el plásmido clonado. Se verifico mediante un gel de agarosa (Fig.8b) y se realizó la construcción del plásmido *in silico* con el programa Snapgene (Fig. 8a).

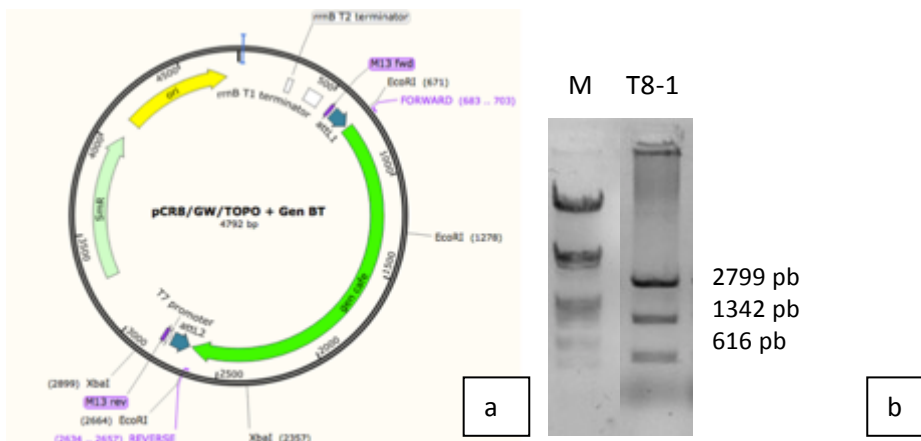
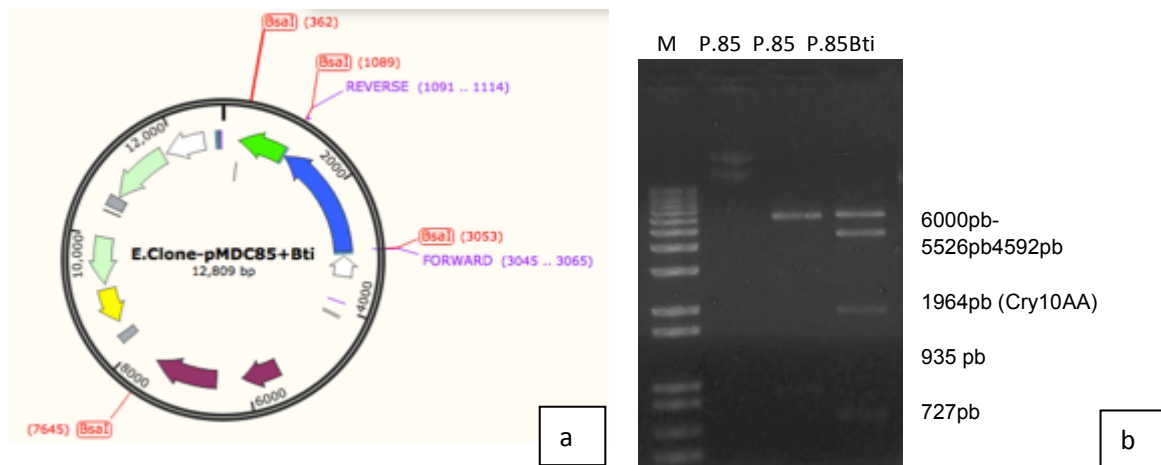


Fig. 8. Mapa del vector de entrada y restricción a) vector pCR8/gw/topo + Gen *cry10Aa*; b) Análisis de restricción con enzima *EcoRI* (2799 pb, 1342 pb y 616 pb), Marcador de peso molecular de Lambda DNA/*EcoRI*+*HindII*).

### 6.1.2 Análisis de restricción de la Clonación en pMDC85

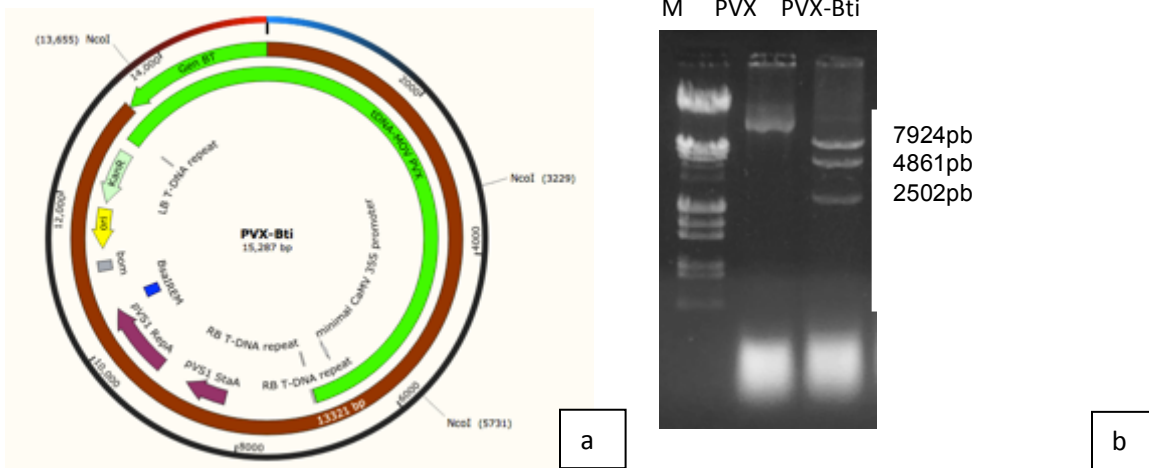
La secuencia correspondiente al gen *cry10Aa* sintetizada en el pUC57 con un peso de 1,976 pb, amplificada y clonada en el vector de transformación de plantas pMDC85, se confirmó mediante PCR y mediante digestión con la enzima *BsaI*; con la cual se deben de obtener 4 bandas: 5,526pb, 4,592pb, 1,964 pb y 727pb. La banda de 1,964 pb correspondería al inserto del gen *cry10Aa* en el plásmido clonado. Se verificó mediante un gel de agarosa (Fig. 9b) y la construcción del plásmido *in silico* con el programa Snapgene (Fig. 9a).



**Fig. 9. Mapa de vector de salida y restricción.** A) Vector pMDC85 + gen *cry10Aa*. b) Análisis de restricción con la enzima *BsaI* M: Kb plus, P85, Plásmido sin digerir, P85d Plásmido vacío (6001pb, 5526pb, 935 pb), y P85-Bti Plásmido Pmdc85con Bti (5526pb, 4592pb, 1964 pb, 727pb).

### 6.1.3 Análisis de restricción de la clonación en PVX

El vector PVX se construyó con sitios específicos de reconocimiento para la secuencia sintetizada del gen *cry10Aa* en el PUC57, esto permitió utilizar el protocolo de clonación Golden Gate Assemblyn el cual se realiza el corte, la ligación y la clonación en una sola reacción en el termociclador. La clonación del gen se confirmó mediante PCR y mediante digestión con la enzima *NcoI* con la cual se deben de obtener 3 bandas: 7924pb, 4861pb y 2502 pb, las cuales cortan al gen y al plásmido indicando el sentido de clonación del inserto. Se verifico con la visualización de la digestión en el gel de agarosa (Fig.10b) y la construcción del plásmido con los sitios de corte *in silico* con el programa Snapgene (Fig.10a)

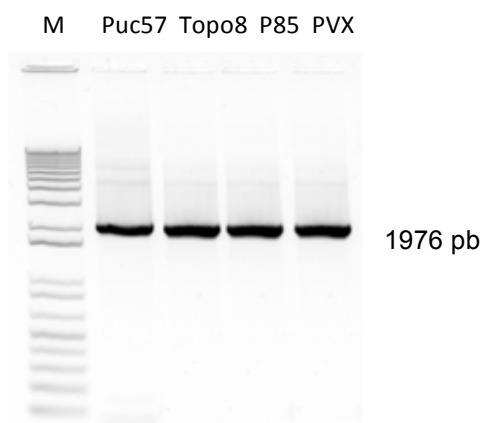


**Fig. 10 Mapa del vector de PVX-Bti y restricción** a) vector PVX-mini + Gen Bti; clonado en sentido indicando los sitios de corte con la enzima *NcoI* b) Análisis de restricción con enzima *NcoI* M, Marcador de peso molecular de Lambda DNA/EcoRI+HindIII. PVX, plásmido sin digerir y PVXBti, plásmido digerido con *NcoI* (7924 pb, 4861 pb y 2502 pb).



#### 6.1.4 Amplificación del gen *cry10Aa*.

Se amplificó como testigo positivo el plásmido PUC57, con el gen sintetizado de *cry10Aa* de *Bti* con el programa establecido de PCR y posteriormente se amplificó el gen en todas las construcciones que se utilizaron para transformación de café (pCR8/GW/TOPO, pMDC85 y PVX).



**Fig. 11** Análisis de amplificación y clonación del gen *Cry10Aa*. Marcador 1Kb plus, carril 1, 2, 3, amplificación del gen de la delta endotoxina *Cry10Aa* en PUC57, pCR8/GW/TOPO, pMDC85 y PVX (1.96kpb).

#### 6.1.3 Secuenciación del gen *cry10Aa* clonado en café

Se obtuvo la secuencia del gen clonado en pMDC85, y con ésta se analizaron los sitios de inicio, fusión y terminación del gen. Con el diseño de oligos internos que amplificaran desde la base 491 hasta la 1366; más el uso de los externos que amplificaron desde la base 1 a 626 y de la 1996 a 1312; se logró obtener la secuenciación completa del gen *cry10Aa* expresado en café con un empalme del 97.8 % de la secuencia optimizada y la secuencia expresada. Sin observar presencia de mutaciones específicas. El 2.2% faltante corresponde principalmente a 40 nucleótidos del inicio de la secuencia que no se lograron secuenciar.

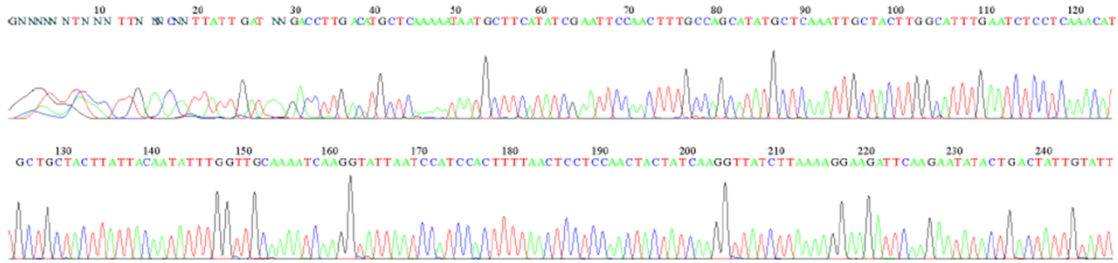


Fig. 12. Electroferograma del inicio de la secuenciación. (240 pb iniciales) de un producto final de 1976 pb. secuenciadas del gen *cry10Aa*.

### Predicción de la proteína

Con la secuencia optimizada se realizó una predicción de la proteína en 3D, donde se obtuvo la estructura tridimensional desde diferentes ángulos como se observa en la Figura 13, con la cual se determinó que la optimización de codones no afecta la conformación estructural de la delta-endotoxina Cry10Aa y que esta podría ser funcional.

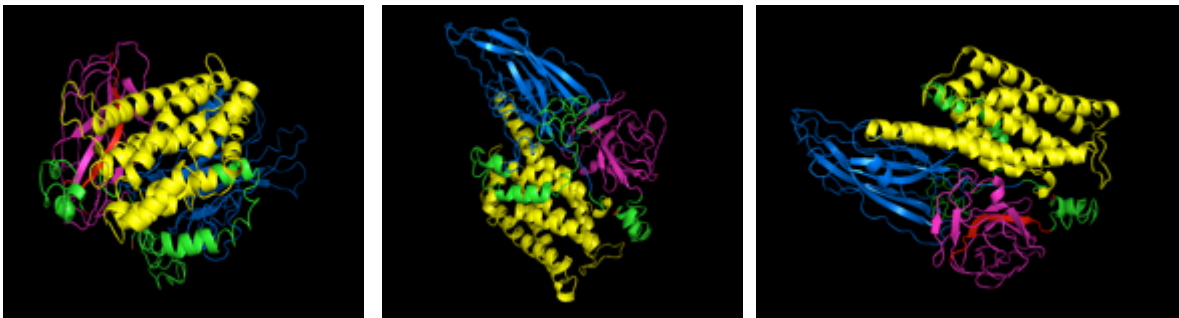


Fig. 13. Estructuras tridimensionales de la delta-endotoxina Cry10Aa. Se pueden observar los 3 dominios de la proteína Cry. En color amarillo el dominio I, que consiste en un paquete de 7  $\alpha$ -hélices antiparalelas, donde la hélice 5 está rodeada por las demás, color azul, el dominio II que consta de 3 láminas antiparalelas acomodadas en lo que se ha llamado un  $\beta$ -prisma; y en verde-lila, el dominio III consiste de 2 láminas  $\beta$  antiparalelas; y en color rojo corresponde al final conservado del dominio III de las  $\delta$ -endotoxinas Cry, en nuestro corresponde a la secuencia NIYIDKIEFIP.

## **6.2 Establecimiento de Protocolo de cultivo *in vitro* para producción de línea embriogénica de café**

### **6.2.1 Efecto en el desarrollo de callo e inducción de embriones en los diferentes medios de cultivo.**

En los experimentos realizados se evaluaron diferentes medios de cultivo (Yasuda et al., 1985; Leroy et al., 2000, Albuquerque et al., 2009, Giridhar, et al., 2004, Bobadilla, et al., 2013, Mukul-Lopez et al., 2012), para inducir formación de callos con estructuras competentes múltiples, adaptados para genotipos comerciales mexicanos (Arábigo o típico, Garnica, Oro Azteca, Maragogipe y Bourbon).

Se logró establecer como resultado exitoso, la inducción de embriones somáticos descrita en el protocolo de Leroy y colaboradores (2006). (Fig. 14), con variaciones cronológicas de subcultivos (dos meses en medio de inducción de callo (MIC), (Fig. 14a-14b) y a los 60 días se subcultivó al medio de producción de callos embriogénicos (MPE) descrito por Leroy (2006). En este medio se observa el desarrollo de embriones a los 120 días (Fig. 14c-14d), y una producción estable de masas embriogénicas a los 210 días (Fig. 14e-14f).

El medio de Leroy, contiene diferentes fuentes de carbono, como principal diferencia con respecto a otros medios, tales como el de Bobadilla (2013) que solo utiliza sacarosa. Aunque estos dos medios fueron los de mejor respuesta a la inducción de callos proembriogénicos (Fig. 14g-14h), en el de Bobadilla el inicio de formación de embriones fue a los 180 días (Fig. 14i), con una diferencia de 60 días con respecto al medio de Leroy.

Finalmente se observó el desarrollo de masas embriogénicas a los 200 días (fig. 14j) pero a diferencia del medio anterior se presentó un mayor desarrollo de callos proembriogénicos (PEM) con alta capacidad de división celular con núcleo

viables para transformación, pero sin una definición estable de embriones (Fig. 14k-14l.).

La variedad de mejor respuesta y de la que se obtuvo la línea embriogénica estable, para transformación por biobalística fue la variedad Arabiga o Típica.

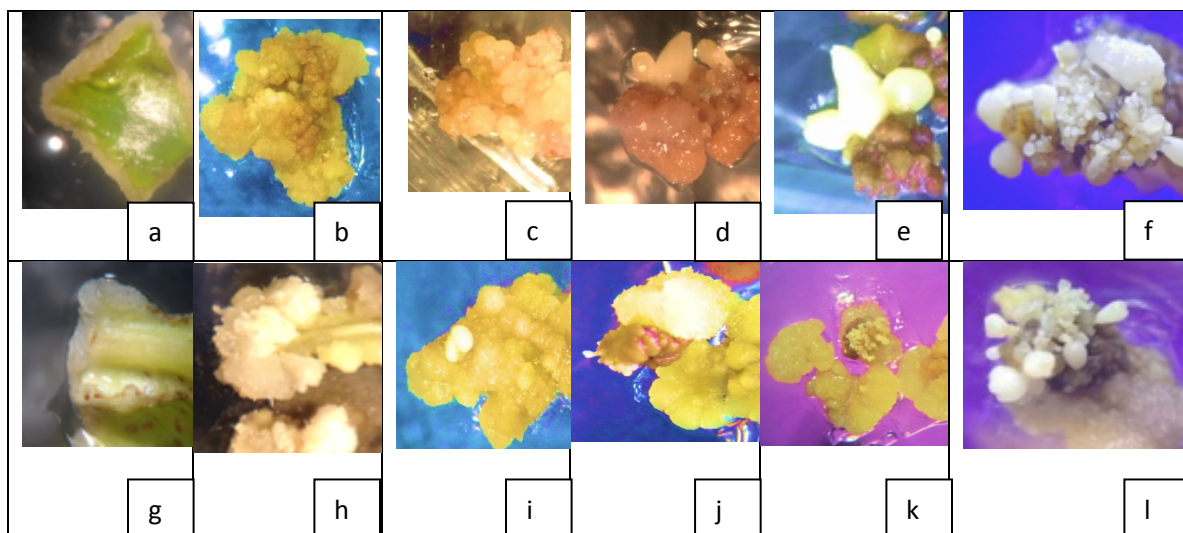


Fig. 14 Etapas morfológicas de los explantes de hoja de café hasta el desarrollo del embrión somático. Respuesta en medio de Leroy (a-f), a) respuesta del explante a los 15 días b) desarrollo del callo, 30 días c) subcultivo a MPE, 90 días, d) desarrollo de embriones 120 días, e) 180 días, f) establecimiento de línea embriogénica, 210 días. Respuesta en medio de Bobadilla (g-m) g) Respuesta del explante, 15 días, h) desarrollo del callo, 30 días, i) subcultivo a MPE, 90 días, j) desarrollo de estructuras proembriogénicas 120 días, e) desarrollo de PEM, y embriones 180 días, f) establecimiento de línea embriogénica no estable por desarrollo de masas proembriogénicas no definidas y bajo números de embriones.

### 6.2.2 Obtención de línea embriogénica para transformación

Se estableció la variedad Arábica o típica como la variedad con potencial genético para generación de embriones somáticos de forma estable. Esto responde a las pruebas realizadas con 4,315 explantes de hojas distribuidos en seis variedades evaluadas en doce tratamientos de medio de cultivos seleccionados para producción de una línea embriogénica (Tabla 7); siendo el medio de Leroy en el

cual se logró establecer la línea embriogénica, obteniendo alta producción de embriones con estructuras competentes definidas (Fig. 15.a-b-c ).

El medio de Bobadilla se conservó debido a la alta producción de masas proembriogénicas viables (Fig.15d) y el desarrollo de alguno embriones (Fig. 15e). La viabilidad se determinó mediante la prueba de tinción con azul de Evans (Fig. 15f-15g) la cual mostró un desarrollo viable del núcleo celular siendo grande y definido, razón por la cual este material también fue bombardeado.

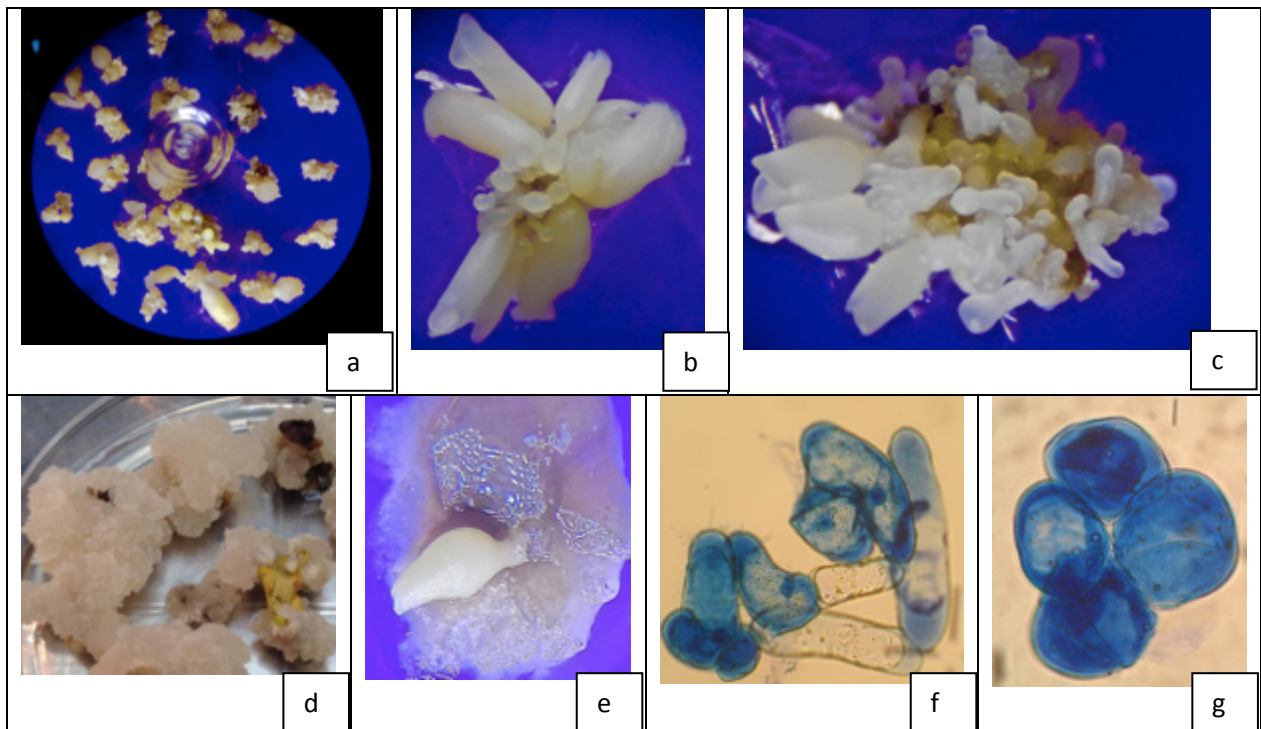


Fig. 5. Línea embriogénica y proembriogénica para transformación. a) Distribución de embriones para bombardeo con micropartículas, b-c) Estructuras embriogénicas de 12 a 25 embriones por cada una en diferentes estados de desarrollo d) Estructuras proembriogénicas e) embrión desarrollado en PEM f-g) tinción del núcleo con azul de Evans (teñido es viable – incoloro no viable).

La frecuencia de inducción de callo fue variable para los genotipos evaluados, en el caso de la variedad Arabiga o típica se observó una alta plasticidad y respuesta de inducción al presentar respuesta morfológica en siete de los doce medios con

un promedio de 43.6% del total de explantes evaluados. Seguida por la variedad Garnica con 15.2% de respuesta promedio en cinco medios; la variedad Bourbon con 17.3% en tres medios y la variedad Oro Azteca; la cual solo presento respuesta en el medio de Bobadilla con un 5% de respuesta del total de explantes evaluados (Tabla 7)

Tabla 7. Respuesta morfogénica de genotipos de café, porcentaje de inducción de callos en 12 medios de cultivos evaluados en 6 variedades de café.

Variedades							
Medios evaluados	Arabiga %	Bourbon %	Caturra %	Garnica %	Maragogipe %	Oro Azteca %	
MS	0	0	0	0	0	0	0
Sales de Yasuda (1985), Glucosa, BAP	0	0	0	0	0	0	0
Sales de Yasuda (1985), Glucosa, BAP Ultrafiltrado	0	0	0	0	0	0	0
Sales de Yasuda (1985), Sacarosa, BAP Ultrafiltrado	0	0	0	0	0	0	0
Sales de Yasuda (1985), Sacarosa, BAP	0	0	0	0	0	0	0
Sales ½ MS, 2,4 D, IBA, 2iP + TRIA, BAP (0,7% Gelrite)	27	0	0	5	0	0	0
Sales ½ MS, BAP, TRIA (0,7% Gelrite)	4.2	0	0	0	0	0	0
Sales ½ MS, 2,4 D, IBA, 2iP + BAP, TRIA (0,25% Gelrite)	32	0	0	13	0	0	0
Sales ½ MS, 2,4 D, IBA, 2iP (0,7% Gelrite)	36	0	0	0	0	0	0

Sales ½ MS, BAP, TRIA (0,25% Gelrite)	31	2	0	14	0	0
Sales ½ MS, 2,4 D, IBA, 2iP (0,25% Gelrite)	93	23	0	12	0	5
½ MS, Extracto de malta, caseína, 2- 4D, IBA, 2iP	82	27	0	32	0	0

En resumen, el protocolo descrito se puede adaptar a la variedad Arábigo o Típica de la siguiente manera:

- 1) Uso de explantes a partir de la segunda o tercera hoja en sentido descendente desde la parte apical del brote
- 2) Desinfección en hipoclorito de sodio (NaOCl) I y ácido clorhídrico (HCl).
- 3) Cultivo de lo explantes al medio de inducción que contiene (½ MS, vitaminas de Yasuda, Extracto de malta (400mg/L), caseína (100mg/l), 2-4D (0,5mg/l), IBA (1mg/l), 2iP (2mg/l), Sacarosa 3%, Gelrite 0,2%) durante dos meses.
- 4) Subcultivo a medio de producción de embriones (½ MS, Tiamina (20mg/l), Extracto de malta (800mg/L), caseína (200mg/l), Adenina (60mg/l), 2-4D (1mg/l), BAP (4mg/l), Sacarosa 3%, Gelrite 0,32%).
- 5) Disección de las estructuras embriogénicas cada 15 días y subcultivo a una nueva placa con medio de producción de embriones.

### 6.3 Protocolo de transformación genética estable

La obtención de clonas transgénicas se llevó a cabo después de dos meses en selección en el medio de producción de embriones suplementado con 50 mg/l de higromicina (Fig. 16).

El sistema de transformación genética estable que mayor cantidad de clonas transgénicas fue en el medio normal, seguido del pretratamiento osmótico con manitol 2M-sorbitol 2M y finalmente sacarosa al 12%.

Tabla 8. Eficiencia de transformación genética estable de café mediante diferentes pretratamientos osmóticos

Tratamiento osmótico	Clonas	Porcentaje (%)
MPE (Medio normal)	15/1075	1.39
Medio con Manitol 2M y Sorbitol 2M	5/400	1.25
Medio con Sacarosa al 12%	3/400	0.75

La eficiencia de transformación genética que se ha obtenido hasta el momento es de 1.5 clonas transgénicas por gramo de peso fresco de estructura embriogénica. (Tabla 8).

#### 6.3.1 Selección del material transformado

Las plantas se seleccionaron con higromicina a 50 mg/L. A esta concentración se observó la mortalidad total del control entre los 15 y 20 días (Fig. 16 b) y la regeneración de clonas a los 45 días después del bombardeo (Fig. 16 a), las características de este ensayo (003-3) fueron una presión de disparo de 900 PSI, y micropartículas de oro; sin previo tratamiento osmótico.



Se confirmó que el material vegetal óptimo para la transformación son aquellos que presentas estructuras de 12 a 25 embriones. En el ensayo 004 el cual tuvo 45 días en selección en higromicina, se observó expresión de transitoria a estable a los 15 días (Fig. 18 a-d) y control negativo (Fig. 18 a-d) y una clona a la cual se le realizó seguimiento a los 15 y 30 días (Fig.19 a-b-c) en el último ensayo se observó la expresión transitoria 5 días después del bombardeo (Fig. 17 a-b) y control negativo (Fig. 17 c-d). La expresión de GFP se observó con el filtro 3 debido a que la construcción presentaba una longitud de excitación 470-540 nm y longitud de emisión a 525-550 nm. La autofluorescencia por clorofila fue bloqueada usando un filtro de interferencia rojo.

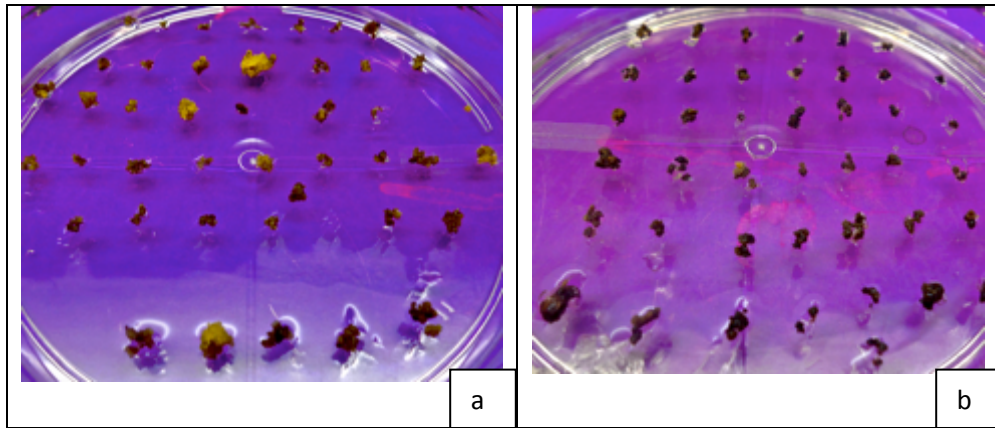


Fig. 16. Selección del material transformado a) Placa transformada con la construcción pMDC85-cry10a; con resistencia a higromicina (50mg/L) a 900 PSI. b) Placa control; estructuras embriogénicas sin transformar, en higromicina (50mg/L).

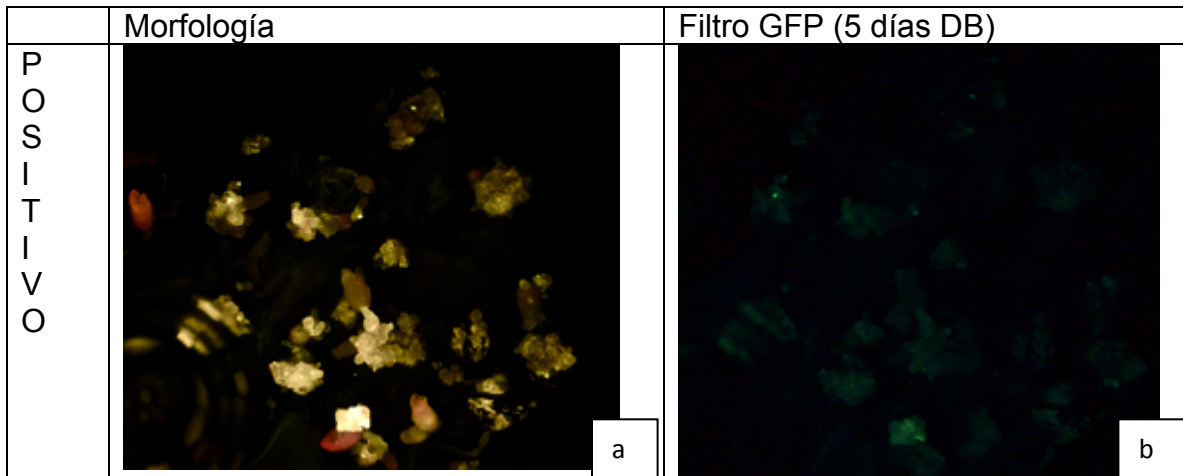
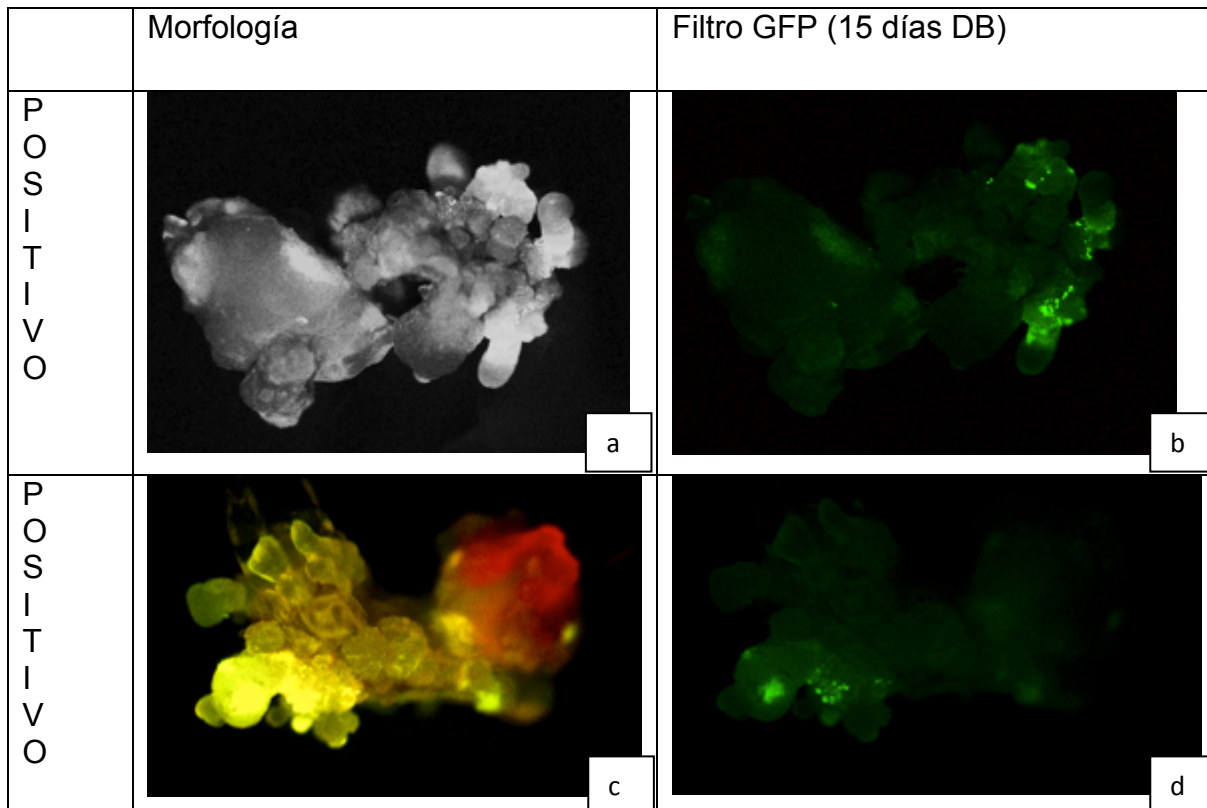


Fig. 17. Expresión de la proteína verde fluorescente en embriones 5 días después del bombardeo. a) Vista de la morfología de los embriones bombardeados (Filtro amarillo); b) embriones bombardeados observados con filtro de GFP, c) vista de la morfología de los embriones control (campo claro) en color rojo los puntos de crecimiento embriogénico; d) embriones control observados con filtro de GFP.



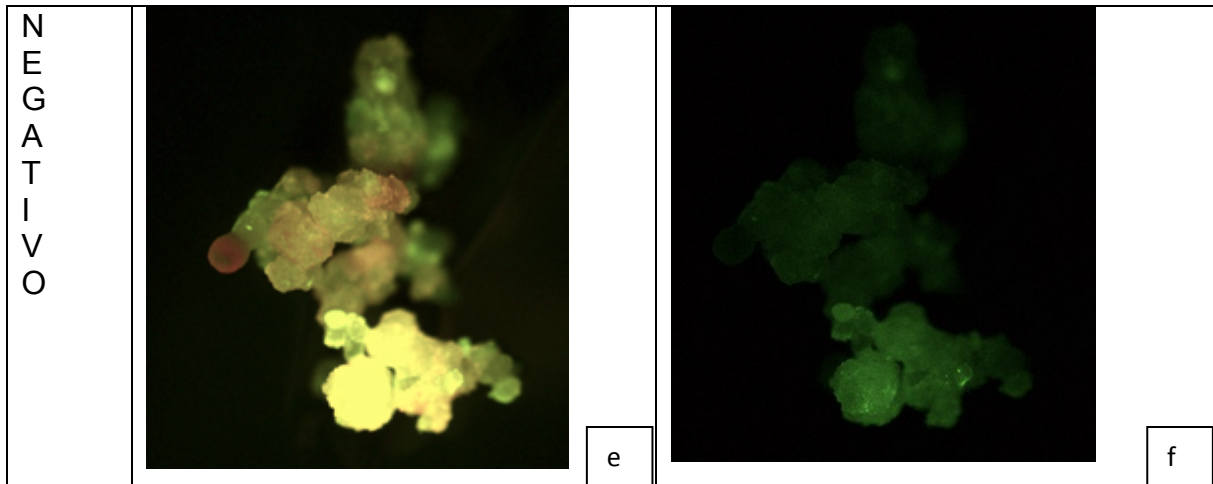


Fig. 18. Expresión de la proteína verde fluorescente en embriones 15 días después del bombardeo. a-c) vista de la morfología de los embriones bombardeados (filtro amarillo); b-d) embriones bombardeados observados con filtro de GFP, e) vista de la morfología de los embriones control (campo claro) en color rojo los puntos de crecimiento embriogénico; f) embriones control observados con filtro de GFP.

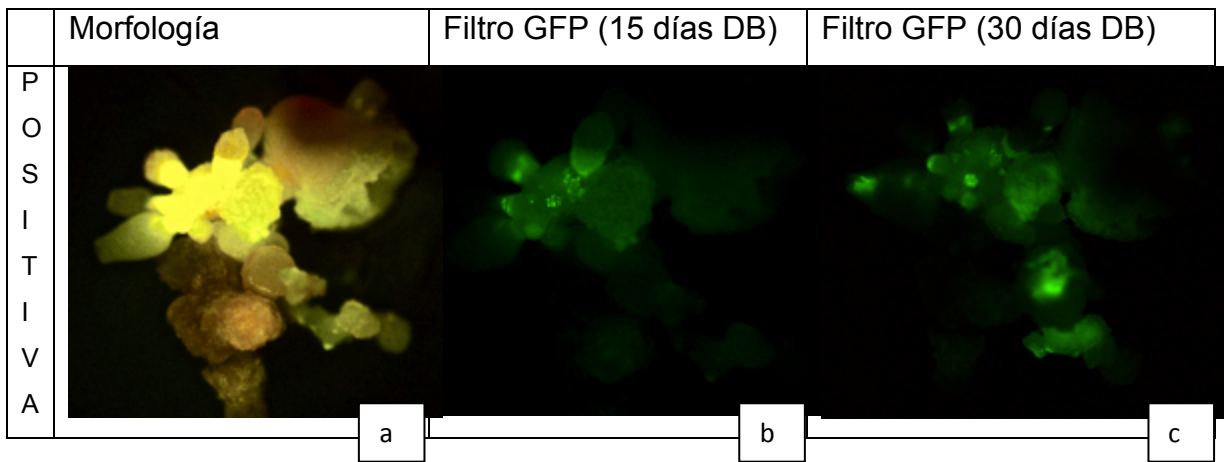
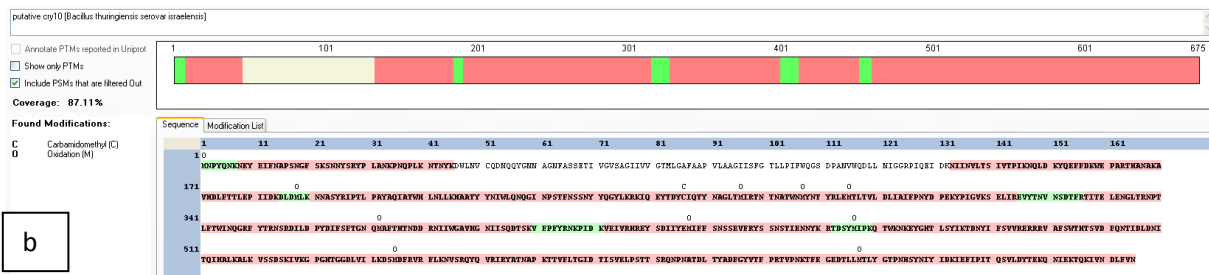
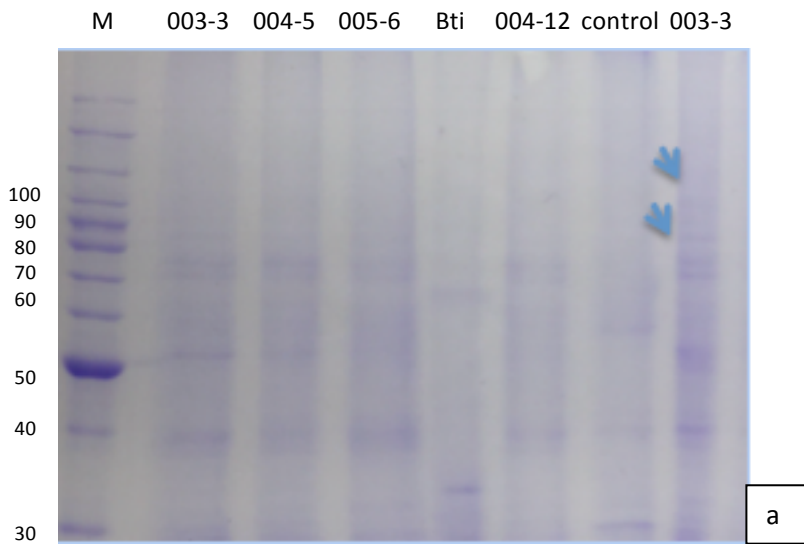


Fig. 19. Expresión de la proteína verde fluorescente en embriones bombardeados 15 y 30 días después del bombardeo. a) vista de la morfología de los embriones bombardeados (filtro amarillo); b) embriones después de 15 días de ser bombardeados observados con filtro de GFP, c) embriones después de 30 días de ser bombardeados observados con filtro de GFP.

### 6.3.2 Análisis de expresión de la proteína *Cry 10Aa* en embriones

Se realizó la extracción de proteínas de las clonas que presentaron resistencia a higromocina (ensayo 003 clona 3, 003-3) y de las clonas que presentaron expresión de GFP (004-5, 004-12, 005-6) y un control. Las bandas obtenidas a partir de geles SDS-PAGE se analizaron por MS/MS; en la fig. 20 se observa el patrón de bandas esperado en las clonas transformadas con la proteína *Cry10Aa* diferenciales al patrón de bandas del control.



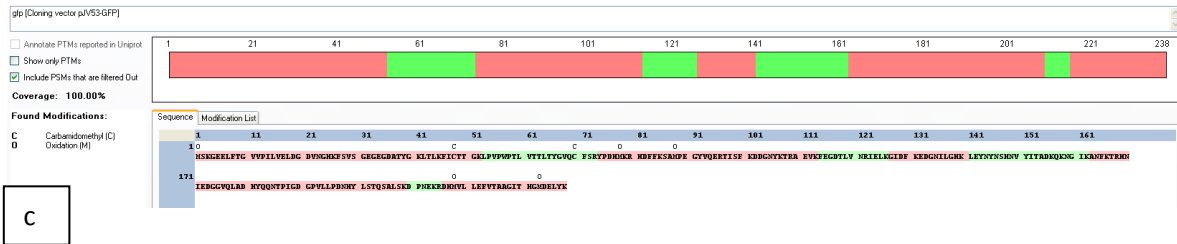


Fig. 20 SDS-PAGE de proteínas extraídas de embriones; carril 1, marcador de peso, carril 2-3-4 clona 003-3, 004-5, 005-6, carril 5 extracto de proteínas de Bti, carril 6 y 8 clonas 004-12, 003-3 y carril 7 control negativo. b) secuencia de la proteína *Cry10Aa*; donde se indica con verde los péptidos con alta identidad y en rosa los de baja identidad; con una cobertura de 87.11%. b) secuencia de la proteína verde fluorescente donde se indica con verde los péptidos con alta identidad y en rosa los de baja identidad; con una cobertura del 100%; identificado en la banda de 100 Kda. Confirmando la expresión en quimera de la endotoxina *Cry10Aa*.

Además de esta confirmación por electroforesis de proteínas; se realizó la extracción de DNA de los embriones y se amplificó con un par de oligos internos que amplificaran desde la base 491 hasta la 1366;(generando una banda de 875 pares de bases) más el uso de oligos externos que amplifican el gen completo de *cry10Aa* sintético (2000 pares de bases). (Fig. 21 y 22).

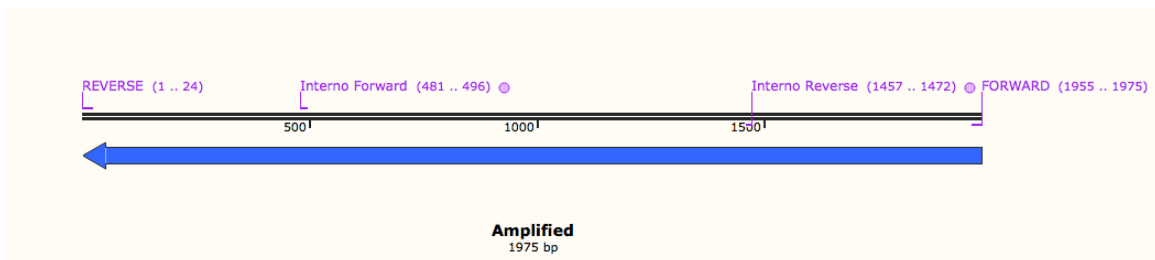


Fig. 21 Descripción de la amplificación realizada por cada par de oligos. (Externos 1975 pb; Internos 875 pb).

M 3-3 3-3e Ctrl Ctrl.e P85 P85e

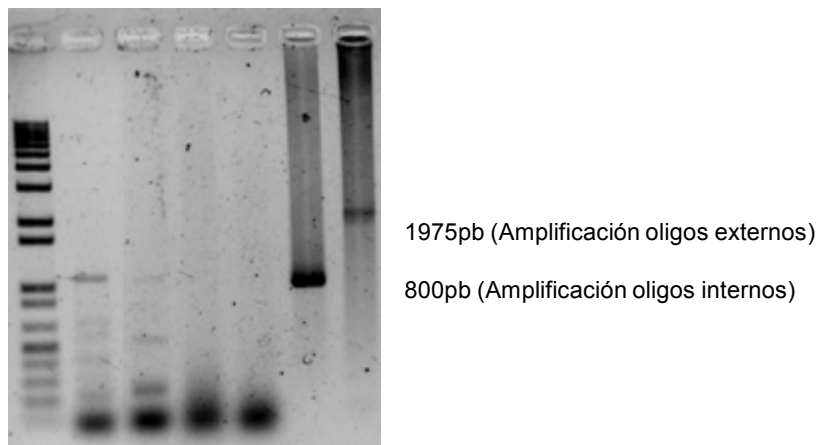


Fig. 22. Amplificación por PCR del gen *cry10Aa* en clonas transformadas de café. Carril M Kb plus, 3-3: clona 003-3 amplificada con oligos internos, 3-3e: clona 003-3 amplificada con oligos externos, Ctrl control amplificado con oligos internos, Ctrl.e control amplificado con oligos externos; P85 plásmido pMDC85, amplificado con oligos internos; P85e plásmido pMDC85, amplificado con oligos externos.

## 6.4 Establecimiento de Protocolo de transformación genética transitoria

### 6.4.1 Expresión transitoria en hojas agroinfiltradas con pMDC85 y de hojas asperjadas PVX-mini y PVX-GFP

Se observó la expresión progresiva de la proteína verde fluorescente de las plantas transformadas por agroinfiltración y agrospray (Control positivo) al exponerlas a luz ultravioleta.

La expresión se observó después del cuarto día (Fig. 23a) y con mayor intensidad el día octavo (Fig. 23b-c). Al igual que las hojas asperjadas, la expresión fue evidente al octavo día en las hojas, con una expresión muy localizada (Fig. 23 d-e). La baja distribución de la proteína podría explicarse por el metabolismo del café el cual se comporta de forma diferencial por tener un ciclo de vida más largo, en comparación al de plantas como *Nicotiana* que al octavo día tienen

expresión en la totalidad de la hoja.

En nuestro caso se observa muy localizada la expresión, pero la viabilidad de la técnica se comprueba con el análisis de expresión de la proteína de interés *Cry10Aa*.

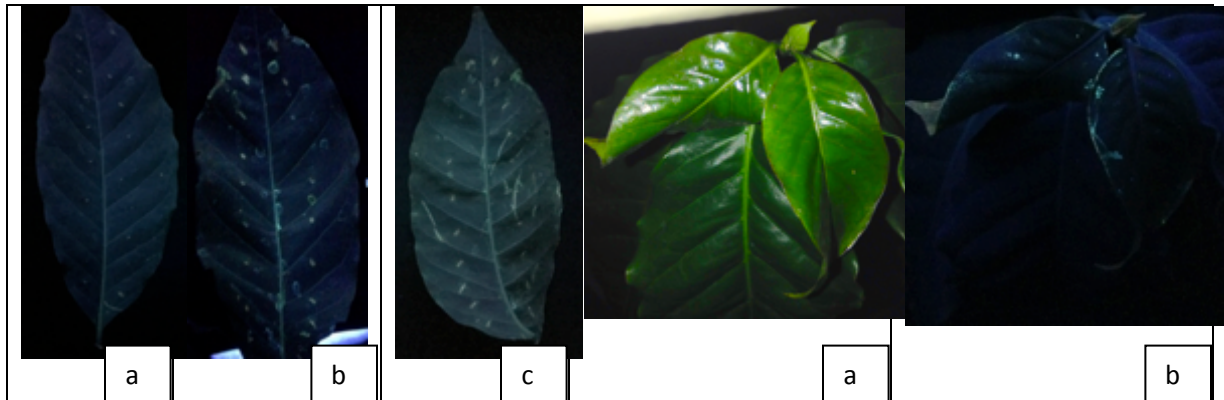
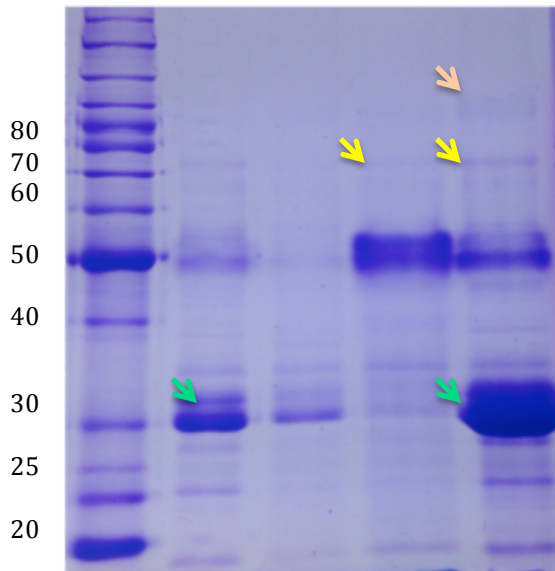


Fig. 23. Expresión de la proteína GFP en hojas agroinfiltradas con pMDC85 a) 4 día, b) haz 8 día, c) envés 8 día y asperjadas con PVX-GFP a) campo claro 8 día b) luz UV 8 día.

### 6.3.3 Análisis de expresión de la proteína Cry 10Aa

El análisis MS/MS de las proteínas aisladas del SDS-PAGE (Fig. 24), permite observar una diferencia entre los controles positivos (PVX-GFP) y negativo (CTRL) y las muestras transformadas para expresar la proteína Cry10Aa. Las plantas transformadas con los plásmidos PVX -GFP y Pmdc85 presentan una banda de 28 kDa correspondiente a GFP (indicada con flechas verdes) y una banda sobre los 77 kDa que correspondería a la proteína Cry10Aa (6 péptidos) (indicada con flechas amarillas)). El plásmido pMDC85 presenta una banda de aproximadamente 100 kDa (indicada con flecha naranja) la cual correspondería a la construcción quimérica del plásmido donde se fusiona la proteína Cry a una cola de 6HisGFP, esta banda coincidió con 10 péptidos de las dos proteínas.

M PVX-GFP CTRL PVX-BTI pMDC85



Cry10Aa (77KDa)	EVYTNVNSDTFRK
	TISVELPSRONPNATDLK
	VFPFYR NKPIDK
	TDSYmIPK
	DLDmLK
	MNPYQNK
Cry10Aa +GFP(100KDa)	LEYNYNSHNVIImETADK
	NGIKANFK
	GIDFKEDGNILGHK
	QKNGIKANFK

Fig. 24. Análisis de integridad de proteínas en extractos de plantas mediante SDS-PAGE; de las cuatro construcciones evaluadas; control positivo; control negativo; plásmido asperjado con Bti y plásmido agroinfiltrado con Bti-GFP. (Tabla con péptidos identificados en bandas de 77 KDa y 100 kDa). Las flechas verdes indica la proteína GFP, las flechas amarillas a la proteína Cry10Aa y la flecha naranja la quimera de la proteína Cry10Aa-GFP.



#### IV. DISCUSIÓN

Diferentes autores describen que la optimización de codones puede afectar la conformación y estabilidad de la proteína al igual que la función. En las bacterias, los codones se traducen a un ritmo diferente que en plantas, las bacterias pueden ser hasta 25 veces más eficientes. Cuando se optimizan los codones se puede aumentar la velocidad de traducción en las plantas y lograr una mejor expresión, pero la sobreexpresión de algunas proteínas recombinantes puede agotar uno o más tRNAs y limitar la expresión (Mauro, y Chappell, 2014).

En el caso de los genes *cry*, cuando se ha logrado una eficiente expresión en plantas, ha sido por el aumento del contenido de pares de bases G+C, de 37% a 47,7%, con lo que se incrementó la homología entre el gen y el genoma vegetal, sin alterar las características de la endotoxina producida por el gen (Sardana *et al.* 1996). Bajo este principio de optimización de codones que se realizó en el presente trabajo, se logró expresar la proteína *Cry10Aa* en hojas y en embriones de café. Se esperaba que la función tóxica típica de la proteína se conserve, estableciendo con ello un control eficiente de la broca.

La generación de líneas embriogénicas de café ha sido un proceso que se reporta en ciclos de tiempo muy largos desde uno a dos años, para regeneración de plantas completas (Albuquerque, 2009) o hasta cuatro años para el establecimiento de bioensayos (Leroy, 2000, Perthuis; 2005). Otro factor importante en la transformación de café es lograr la expresión de genes específicos en el cultivo.

A la fecha, los trabajos reportados por Leroy (2000) y Perthuis (2005) sobre transformación estable con genes *cry* en los cuales se reporta una expresión eficiente de proteínas y regeneración completas de campo, son los únicos que han llegado a la realización de bioensayos en campo.

Dentro de los estudios para generar líneas embriogénicas se han evaluado concentraciones diferenciales de reguladores de crecimiento, diferentes fuentes de carbono, tipos de explante, análisis citogenéticos, potencial morfogénico, histología de la evolución, etc. (Söndahl y Sharp, 1977; Dublin, 1981; Berthouly y Michaux-Ferrière, 1996; Van Boxtel y Berthouly, 1996; Yasuda et al., 1985, Quiroz-Figueroa, 2002).

Al replicar todas estas variables en los diferentes medios de cultivos, (concentraciones de reguladores de crecimiento; fuentes de carbono, concentraciones de agente gelificante), y simultáneamente evaluar el efecto genotipo con 6 variedades diferentes, se logró determinar factores claves para la obtención de líneas embriogénicas eficientes para transformación.

Dentro de los factores claves que permitieron obtener una línea embriogénica sincrónica y estable, en un tiempo de seis meses; se encuentran la presencia de diferentes fuentes de carbono disponibles, la presencia de citocininas (cuatro veces más en relación a auxinas), el aumento de tiempo del explante (dos meses) en el medio de cultivo de inducción y el genotipo.

El medio que cumplió con todos los requerimientos necesarios fue el establecido por Van Boxtel *et al.* en 1996 y usado por Leroy en 2000. Con resultados replicables en este trabajo en la variedad arábigo, observando cambios importantes en la cronológica, dejando el explante 30 días más que lo establecido en el medio de inducción y conservando la integridad del callo hasta que se inicia la observación estable de embriones a los 210 días después del cultivo.

Otro factor de interés para obtención de una línea embriogénica sincrónica fue la separación de estructuras embriogénicas ya formadas (siete meses). Con lo anterior se logró tener la fase globular de forma simultánea en las estructuras con 12 a 25 embriones, óptimas para la transformación por biobalística, logrando con

ello la transformación estable de la línea embriogénica.

Aunque la técnica de transformación por biobalística; permitió la obtención de clonas transgénicas. Las técnicas de agroinfiltración y agrospray, también evaluadas en este trabajo, se reporta por primera vez aplicada al café, como una alternativa para obtener expresión de las proteínas *Cry10Aa*, en sólo ocho días después de la aplicación de la aplicación de la técnica. Con esto se logró reprogramar las células de las plantas y posiblemente la planta completa (aplicada en plantas de 18 meses en invernadero) de forma transitoria (sin la integración estable del nuevo material genético en un cromosoma de la planta). Este proceso, al igual que las infecciones virales es rápido.

Estas técnicas han sido evaluadas en diferentes investigaciones donde se reportó el uso de vectores basados en virus de plantas con gran éxito, ya que permiten una modificación muy rápida del metabolismo de las plantas a favor de ciertos rasgos o productos que son de interés para el usuario y que se pueden producir en altas cantidades en la planta (Giritch, *et al.* 2011). Debido a que estas técnicas están mediadas por *Agrobacterium*, una de las limitaciones es el hecho de que la entrega de ADN requiere ciertos parámetros constantes, que son difíciles o imposible de aplicar en campo abierto o en gran escala.

Pero considerando que existe un considerable número de investigaciones sobre la transferencia de ADN mediada por *Agrobacterium* a células vegetales, se desarrollan cada día más intentos para lograr aplicaciones industriales a gran escala que involucran *Agrobacterium* como vector de ADN (Giritch, *et al.* 2011).

Cabe resaltar que haber logrado expresar al gen *cry10Aa* de *B. thuringiensis* serovar *israelensis* en *Coffea arabica*, a través vectores con proteínas de movimiento víricas (en nuestro caso la proteína del virus X de la papa, PVX) ha sido un logro interesante, que se reporta por primera vez como estrategia para un futuro control eficiente de una plaga de importancia económica como

*Hypothenemus hampei.*

Se requieren a su vez de otros estudios, para validar la eficacia de la transfección sin alterar procesos biológicos de la planta, con lo que se esperaría validar que la técnica carezca de efectos secundarios no deseados y que se pueda aplicar en campo, para uso agrícola.

## VIII. CONCLUSIONES

- Se estableció un protocolo para la transformación de *Coffea arabica* var. Arábica o típica; que permite la expresión estable o transitoria del gen *cry10Aa* de *Bacillus thuringiensis*; lo anterior se evaluó y validó en clonas transgénicas y hojas de café transformadas.
- Se logró generar una línea embriogénica con alto potencial genético para ser transformada mediante bombardeo de micropartículas.
- El uso de vectores con tecnología Gateway pMDC85 y vectores con sistema MagnICON, son una estrategia eficiente para la transformación y expresión de proteínas heterólogas en plantas de café.
- Las clonas transformadas presentaron una alta expresión del gen reportero GFP y regeneración en higromicina.
- Los controles negativos presentaron una mortalidad del 100% a concentraciones de 50 mg/L del antibiótico.

## IX. PERSPECTIVAS

Obtener plantas regeneradas a partir de las clonas transformadas, que permitan la realización de bioensayos con *H. hampei* con el fin de validar la funcionalidad de la proteína.

Realizar bioensayos que permitan evaluar la técnica de agrospray y agroinfiltración en frutos de café y lograr establecer la cantidad de proteína necesaria para controlar a la plaga.

Diseñar plásmidos con la expresión de diferentes genes que permitan un control tanto de hongos, para controlar enfermedades como la roya del café (*Hemileia vastatrix*) y a plagas como el barrenador del fruto (*Hypotenemus hampei*), desarrollando plantas competentes y resistentes a las principales limitantes de producción en la actualidad, logrando con ello un aumento en el rendimiento del cultivo.

## X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, E. V., Cunha, W. G., Barbosa, A. E., Costa, P. M., Teixeira, J. B., Vianna, G. R., & Grossi-de-Sa, M. F. 2009. Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(5), 532-539.

Alvarado, M y Rojas, G. 1998. El Cultivo y Beneficiado del Café. San José, C.R. EUNED. 184 p.

APS. 2016. The American Phytopathological Society. Coffee rust (*Hemileia vastatrix*). Consultado en línea julio 2016 en: <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/Basidiomycetes/Pages/CoffeeRust.asp>

Arcila P., J.; 2007, *Sistemas de producción de café en Colombia*. Chinchiná: CENICAFÉ,. 309 p.

Arrieta, G., Hernández, A., & Espinoza, A. M. 2004. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Revista de biología tropical*, 52(3), 757-764.

Barton, K. A., Whiteley, H. R., & Yang, N. S. 1987. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$  - Endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. *Plant Physiology*, 85(4), 1103-1109.

Barry- Etienne D, Bertrand B, Vasquez N, Etienne H. 2002. Comparison of somatic embryogenesis- derived coffee (*Coffea arabica* L.) plantlets regenerated *in vitro* or *ex vitro*: morphological, mineral and water characteristics. *Annals of Botany* 90: 77-85.

Berry, C., O'Neil, S., Ben-Dov, E., Jones, A. F., Murphy, L., Quail, M. A., & Parkhill, J. 2002. Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied and environmental microbiology*, 68(10), 5082-5095.

Berthouly, M. 1997. Biotecnologías y técnicas de reproducción de materiales promisorios en *Coffea arabica*. EN: Memorias del XVII Simposio Latinoamericano de Caficultura. Heredia, Costa Rica. pp 25-49.

Berthouly, M y Michaux - Ferriere, N. 1996. High frequency somatic embryogenesis in *Coffea canephora*: Induction conditions and histological evolution. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Netherlands) 44: 169-176.

Bravo, A., I. Gomez, J. Conde, C. Munoz-Garay, J. Sanchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. Gill and M. Soberon, 2004. "Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains." *Biochimica et Biophysica Acta* (BBA)-Biomembranes 1667: 38-46.

Birch, R. G., & Bower, R. 1994. Principles of gene transfer using particle bombardment. *Particle Bombardment Technology for Gene Transfer*, 3-37.

Bridson, D. M., & Verdcourt, B. 1988. *Coffea*. Flora of tropical east Africa, Rubiaceae, 2, 703-723.

Bobadilla Landey R, Cenci A, Georget F, Bertrand B, Camayo G, Dechamp E, *et al.* 2013 High Genetic and Epigenetic Stability in *Coffea arabica* Plants Derived from Embryogenic Suspensions and Secondary Embryogenesis as Revealed by



AFLP, MSAP and the Phenotypic Variation Rate. PLoS ONE 8(2): e56372. doi:10.1371/journal.pone.0056372

Cabrera-Ponce, J. L., Vegas-Garcia, A., & Herrera-Estrella, L. 1995. Herbicide resistant transgenic papaya plants produced by an efficient particle bombardment transformation method. *Plant Cell Reports*, 15(1-2), 1-

Cabrera-Ponce, J. L., Vegas-Garcia, A., & Herrera-Estrella, L. 1996. Regeneration of transgenic papaya plants via somatic embryogenesis induced by *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro-Plant*, 32(2), 86-90.

Cabrera-Ponce, J. L., López, L., Assad-Garcia, N., Medina-Arevalo, C., Bailey, A. M., & Herrera-Estrella, L. 1997. An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.). *Plant Cell Reports*, 16(5), 255-260.

Cabrera-Ponce, J. L., López, L., León-Ramírez, C. G., Jofre-Garfias, A. E., & Verver-y-Vargas, A. 2015. Stress induced acquisition of somatic embryogenesis in common bean *Phaseolus vulgaris* L. *Protoplasma*, 252(2), 559-570.

Chakrabarti, S. K., Mandaokar, A. D., Shukla, A., Pattanayak, D., Naik, P. S., Sharma, R. P., & Kumar, P. A. 2000. *Bacillus thuringiensis* cry1Ab gene confers resistance to potato against *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Potato research*, 43(2), 143-152.

Schnepf, E., Crickmore, N. V., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., ... & Dean, D. H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(3), 775-806.

Curtis, M. D., & Grossniklaus, U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant physiology*, 133(2), 462-469.

Ibarra, J. E. and B. A. Federici. 1986. "Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*." *Journal of bacteriology* 165: 527-533.

Dublin, P. 1981. Embryogenese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier *arabust*. *Café Cacao The* 25: 237-242.

Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 578- 619.

De Maagd, R.A., et al., 1999. Domain III of the *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ac is involved in binding to *Manduca sexta* brush border membranes and to its purified aminopeptidase. *N. Mol Microbiol.*, 31(2): p. 463-71.

De Maagd, R.A., et al., 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu Rev Genet.*, 37: p. 409-33.

De Maagd, R.A., A. Bravo, and N. Crickmore, 2001 How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet*, 17(4): p. 193-9.

De Maagd, R.A., et al., 2000. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl Environ Microbiol.*, 66(4): p. 1559-63.

Dufour, M., Leroy, T., Carasco-Lacombe, C., Philippe, R., & Fenouillet, C. 2000. Coffee (*Coffea* sp.) genetic transformation for insect resistance. In *Coffee Biotechnology and Quality* (pp. 209-217). Springer Netherlands.

EL UNIVERSAL, Compañía Periodística Nacional. 2016. Consultado en línea <http://archivo.eluniversal.com.mx/nacion-mexico/2015/plaga-devora-cafetales-1098612.html>

Etienne, H, Solano W, Pereira A, Barry-Etienne D, Bertrand B, Anthony F, Côte F y Berthouly M. 1997. Utilización de la embriogénesis somática en medio líquido para la propagación masal de los híbridos F1 de *Coffea arabica*. EN: Memorias XVIII Simposio Latinoamericano de Caficultura. Heredia, Costa Rica. pp. 253-261.

Etienne H, Barry- Etienne D, Vasquéz N, Berthouly M. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café. EN: Desafíos de la caficultura en Centroamérica. Bertrand B, Rapidel B, eds. IICA.. San José, Costa Rica. pp 457-495.

Ferré, J., & Van Rie, J. 2002. Biochemistry and Genetics of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual review of entomology*, 47(1), 501-533.

Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura en el Banco de México. Consultado en línea: 2016. <https://www.fira.gob.mx/Nd/index.jsp>.

Fuentes-Cerda C.F.J, Monforte-González M, Méndez-Zeel M, Rojas-Herrera R y Loyola-Vargas V.M. 2001. Modification of the embryogenic response of *Coffea arabica* by the nitrogen source. *Biotechnology Letters* 23:1341-1343

Fuentes S, Calheiros M, Manetti-Filho J y Vieira L. 2000. The effects of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 60 (1): 5-13.

García, E. D., & Menéndez, A. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto "Catimor". *Café Cacao Thé*, 31(1).

Gatica-Arias, A. M., Arrieta-Espinoza, G., & Espinoza Esquivel, A. M. 2008. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimisation of genetic transformation in *Coffea arabica* L. cvs. Caturra and Catuaí. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(1), 101-112.

Gleba, Y. Y., Tusé, D., & Giritch, A. 2013. Plant viral vectors for delivery by *Agrobacterium*. In *Plant Viral Vectors* (pp. 155-192). Springer Berlin Heidelberg.

Giritch, A., Symonenko, Y., Hahn, S., Tiede, D., Shvarts, A., Roemer, P., & Giridhar P, V Kumar, E P Indu, G A Ravishankar, A Chandrasekar. 2004. Thidiazuron induced somatic embryogenesis in *Coffea arabica* L. and *C. canephora* P. ex Fr. *Acta Bot. Croat.* 63:25–33.

Gleba, Y. 2011. *U.S. Patent Application No. 13/814,544*.

Gomez Lim, M. A. 2011. Plants as platform for production of pharmaceutical compounds. *Bioprocess Sciences and Technology. Nova Science Publishers, New York*, 295.

Góngora b., c.e.; Marín, p.; Benavides m., P. Claves para el éxito del hongo *Beauveria bassiana* como controlador biológico de la broca del café. Chinchiná: Cenicafé, 2009. 8 p. (Avance Técnico. N° 381).

Góngora, C.E.; Acuña, R. 2008. Uso de genes para incrementar la resistencia de plantas a insectos herbívoros. p. 242-271.

Goldberg, L. J., & Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News*, 37(3), 355-358.

Goldstein, D. A., & Thomas, J. A. 2004. Biopharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Qjm*, 97(11), 705-716.

Gordon-Kamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., ... & Rice, T. B. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. *The Plant Cell*, 2(7), 603-618.

Haberlandt, G. 1902 Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzung ber. Akad. Wiss. Wien. *Math.-Naturwiss. Kl., Abt. J.* 111, 69-92.

Hatanaka T, Arakawa O, Yasuda T, Uchida N y Yamaguchi T. 1991. Effect of plant growth regulators on somatic embryogenesis in leaf cultures of *Coffea canephora*. *Plant Cell Reports* 10: 179-182.

Hernández-Soto, A., Del Rincón-Castro, M. C., Espinoza, A. M., & Ibarra, J. E. 2009. Parasporal body formation via overexpression of the Cry10Aa toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and Cry10Aa-Cyt1Aa synergism. *Applied and environmental microbiology*, 75(14), 4661-4667.

ICO International Coffee Organization. Global ICO site. [http://www. ico.org/](http://www.ico.org/). consultado en línea en el 2016

Jaramillo R., A., V.H.; Arcila P., J. 2011 Distribución de la lluvia: clave para planificar labores en el cultivo del café en Colombia. Chinchiná: CENICAFE, 8 p. (Avances Técnicos No. 411)

Koziel, M.G., Beland, G.L., Bowman, C., Carozzi, N.B., Crenshaw, R., Crossland, L., Dawson, J., Desai, N., Hill, M., Kadwell, S., Launis, K., Lewis, K., Maddox, D., McPherson, K., Meghji, M.R., Merlin, E., Rhodes, R., Warren, G.W., Wright, M. & Evola, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 11: 194-200.

Kobayashi, K., Otegui, M. S., Krishnakumar, S., Mindrinos, M., & Zambryski, P. 2007. INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT2 encodes a putative DEVH box RNA helicase involved in plasmodesmata function during Arabidopsis embryogenesis. *The Plant Cell*, 19(6), 1885-1897.

Lanaud C. 1981. Production de plantules de *C. canephora* par embryogenèse somatique réalisée à partir de culture *in vitro* d'ovules. *Café Cacao Thé* 25:231-236.

Le Pelley, R. 1968. Pest of coffee. London, Longman. 590 p.

Leroy, T., Henry, A. M., Royer, M., Altosaar, I., Frutos, R., Duris, D., & Philippe, R. 2000. Genetically modified coffee plants expressing the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac gene for resistance to leaf miner. *Plant Cell Reports*, 19(4), 382-385.

Litz, R.E y Jarret, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M y Mroginsky L. A (eds). CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. pp 143-173.

Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., & Chen, Q. 2013. Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (77), e50521-e50521.

Maliga, P. 2004. Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55, 289-313.

Mauro, V. P., & Chappell, S. A. 2014. A critical analysis of codon optimization in human therapeutics. *Trends in molecular medicine*, 20(11), 604-613.

Marillonnet, S., Thoeringer, C., Kandzia, R., Klimyuk, V., & Gleba, Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nature biotechnology*, 23(6), 718-723.

McCown, B. H., McCabe, D. E., Russell, D. R., Robison, D. J., Barton, K. A., & Raffa, K. F. 1991. Stable transformation of *Populus* and incorporation of pest resistance by electric discharge particle acceleration. *Plant Cell Reports*, 9(10), 590-594.

Menéndez- Yuffá, A y García E. 1996. *Coffea* species (Coffee). EN: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 35. Trees 4. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 95- 119.

Méndez-López, I., Basurto-Ríos, R., & Ibarra, J. E. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr.(Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiology Letters*, 226(1), 73-77.

Molina, D.; Blanco I., A.; Zamora, H. 2011. Inhibidores de proteasas de plantas efectivos contra las aspártico proteasas de la broca del café (*Hypothenemus hampei*). *Revista colombiana de entomología* 37(2):17-24. 2011.

Molina, D.; Zamora, H.; Blanco L., 2010. A. An inhibitor from *Lupinus bogotensis* seeds effective against aspartic proteases from *Hypothenemus hampei*. *Phytochemistry* 71(2):923-929. 2010.

Mukul-López, H. G., De-la-Peña, C., Galaz-Ávalos, R. M., & Loyola-Vargas, V. M. 2012. Evaluation of the Extracellular Proteome Profile During the Somatic Embryogenesis Process of *Coffea* spp. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 56(1), 72-79.

Murashige, T y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473-497. 1962

Murphy, S. T., & Moore, D. 1990. Biological control of the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* (Ferrari)(Coleoptera, Scolytidae): previous programmes and possibilities for the future. *Biocontrol News and information*, 11(2), 107-117.

Nayak, P., Basu, D., Das, S., Basu, A., Ghosh, D., Ramakrishnan, N. A. & Sen, S. K. 1997. Transgenic elite indica rice plants expressing CryI $\text{Ac}\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* are resistant against yellow stem borer (*Scirpophaga incertulas*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(6), 2111-2116.

Neuenschwander, B., & Baumann, T. W. 1992. A novel type of somatic embryogenesis in *Coffea arabica*. *Plant Cell Reports*, 10(12), 608-612.

Pardo-López L., Soberón M. & Bravo A. 2002. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for



crop protection, *FEMS Microbiology Reviews*, 37 (1) 3-22. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2012.00341.x

Perthuis, B., Pradon, J. L., Montagnon, C., Dufour, M., & Leroy, T. 2005. Stable resistance against the leaf miner *Leucoptera coffeella* expressed by genetically transformed *Coffea canephora* in a pluriannual field experiment in French Guiana. *Euphytica*, 144(3), 321-329.

Ribas, A. F., Dechamp, E., Champion, A., Bertrand, B., Combes, M. C., Verdeil, J. L., ... & Etienne, H. 2011. Agrobacterium-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC plant biology*, 11(1), 1.

Sanjana, N. E., Cong, L., Zhou, Y., Cunniff, M. M., Feng, G., & Zhang, F. 2012. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature protocols*, 7(1), 171-192.

SAGARPA, S. 2016. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. *Base de datos en línea*. Consultado en julio 2016

Sardana R.; S. Dukiandjiev, X. Cheng, K. Cowan and I. Altosaar. 1996. Construction and rapid testing of synthetic and modified toxin gene sequences *cry1A b* and *c* by expression in maize endosperm culture. *Plant Cell Rep* 15: 677-681.

Silva, A. T. 2011. Análise da expressão dos genes Baby Boom (BBM) e Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase (SERK) envolvidos na embriogênese somática do cafeeiro (*Coffea arabica* L.).

Sharp, P. A., Pettersson, U., & Sambrook, J. 1974. Viral DNA in transformed cells: I. A study of the sequences of adenovirus 2 DNA in a line of transformed rat cells using specific fragments of the viral genome. *Journal of molecular biology*, 86(4), 709-726.

Strickland SG, Nichol JW, McCall CM, Stuart DA. 1987. *Plant Science* 48: 113-121.

Spiral, J., Leroy, T., Paillard, M., & Petiard, V. 2000. Transgenic coffee (*Coffea* species). In *Transgenic Trees* (pp. 55-76). Springer Berlin Heidelberg.

Sondahl M.R, Spahlinger D y Sharp W.R. 1979. A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in culture leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z Pflanzenphysiol* 94: 185-188.

Staristsky, G. 1970. Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Botánica Neerlandica* 19 (4): 509- 514.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO consultado en línea en julio 2016.

Padgett, K. A., & Sorge, J. A. 1996. Creating seamless junctions independent of restriction sites in PCR cloning. *Gene*, 168(1), 31-35.

Perlak, F. J., Fuchs, R. L., Dean, D. A., McPherson, S. L., & Fischhoff, D. A. 1991. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(8), 3324-3328.

Perlak, F. J., Stone, T. B., Muskopf, Y. M., Petersen, L. J., Parker, G. B., McPherson, S. A., ... & Fischhoff, D. A. 1993. Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant molecular biology*, 22(2), 313-321.

Quiroz-Figueroa F.R., Fuentes-Cerda C.F.J., Rojas-Herrera R y Loyola- Vargas V.M. 2002. Histological studies on the developmental stages and differentiation of two different somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 20:1141–1149.

Shu, Q., Ye, G., Cui, H., Cheng, X., Xiang, Y., Wu, D., ... & Altosaar, I. 2000. Transgenic rice plants with a synthetic cry1Ab gene from *Bacillus thuringiensis* were highly resistant to eight lepidopteran rice pest species. *Molecular Breeding*, 6(4), 433-439.

Thiellement H, Zivy M, Damerval C. *Plant Proteomics*, 2007. *Methods and Protocols* (eds). Primera edición. Humana Press. USA., 9-13p.

Tyrell, D. J., Davidson, L. I., Bulla, L. A., & Ramoska, W. A. 1979. Toxicity of parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* to mosquitoes. *Applied and environmental microbiology*, 38(4), 656-658.

Valencia, A.; Bustillo, A.; Ossa, G.; Chrispeels, M. 2000.  $\alpha$ -Amylases of the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*) and their inhibition by two plant amylase inhibitors. *Insect Biochem Mol Biol*. 30(3):207-213.

Van Boxtel, J y Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from Coffee leaves: Factors influencing embryogenesis, and subsequent proliferation and regeneration in liquid medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 44: 7-17.

Wang, K. (Ed.). (2006). *Agrobacterium protocols* (Vol. 2). Humana Press.

Williams, R. S., Johnston, S. A., Riedy, M., DeVit, M. J., McElligott, S. G., & Sanford, J. C. 1991. Introduction of foreign genes into tissues of living mice by DNA-coated microprojectiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(7), 2726-2730.

White, P.R., 1934. Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.*, 9: 583-600

Yasuda T, Fujii Y y Yamaguchi T. 1985. Embryogenic Callus Induction from *Coffea arabica* Leaf Explant by Benziladenine. *Plant Cell Physiol* 26:595-597.