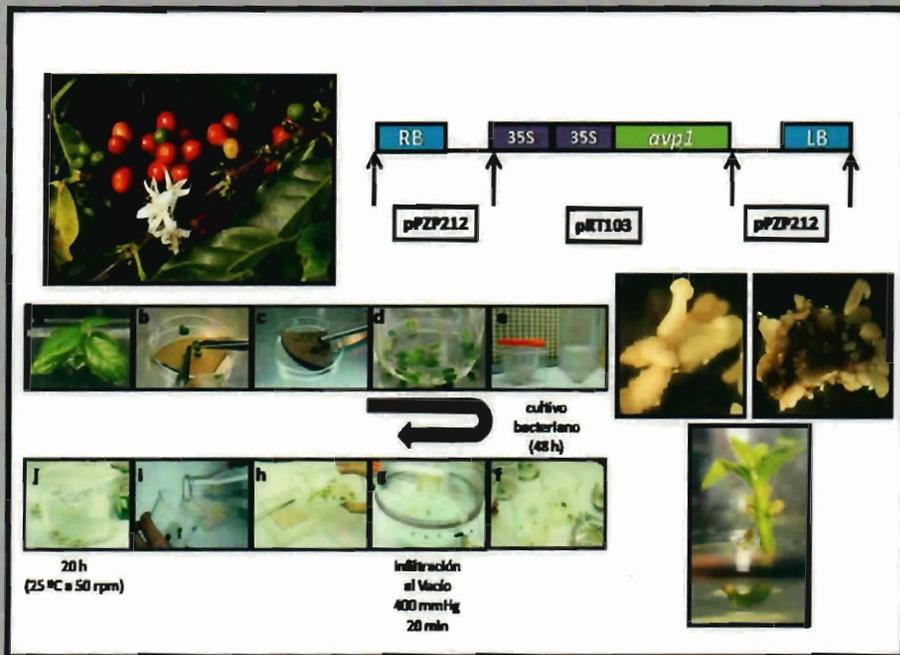


MAESTRÍA EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

Transformación de plántulas de caféto (*Coffea arabica*) cultivadas *in vitro* con el gen *AVP1* de *Arabidopsis thaliana*



Naivy Faride Gamboa Tec



POSGRADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Transformación de plántulas de cafeto
(*Coffea arabica*) cultivadas *in vitro* con
el gen *AVP1* de *Arabidopsis thaliana***

**Tesis que presenta para obtener el grado
de Maestra en Ciencias presenta:**

Lic. Biol. Naivy Faride Gamboa Tec

**Centro de Investigación Científica de Yucatán,
A. C.**

Mérida, Yucatán, México

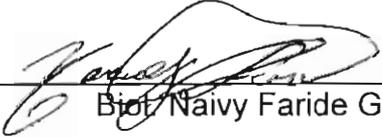
2009



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento provienen de las actividades de experimentación realizadas durante el periodo que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán y que dicha información le pertenece en términos de la ley de propiedad industrial, por lo que no me reservo ningún derecho sobre ello.

Mérida, Yucatán, 4 de Septiembre de 2009


Biot/Naivy Faride Gamboa Tec

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán bajo la dirección de los Doctores César de los Santos Briones y Oscar Alberto Moreno Valenzuela, la cual forma parte del proyecto (No. 50626) titulado “Análisis de la Tolerancia a Aluminio en plántulas transgénicas de cafeto cultivadas *in vitro* obtenidas con la integración del gen AVP1”

Brindo un reconocimiento especial:

Al Dr. César de los Santos Briones por la formación profesional, la confianza que deposito en mí, sobre todo por permitirme ser parte de su equipo.

Al Dr. Oscar Alberto Moreno Valenzuela por su aportación en mi formación profesional, la confianza y la amistad que me ha brindado durante este tiempo.

Al Dr. Manuel Martínez Estévez por el apoyo para la realización de esta tesis, su confianza, por permitirme ser y sentirme parte de su equipo.

A la M.C. Lucila Sánchez Cach por todo su apoyo durante la realización de esta tesis, pero sobre todo por sus consejos y amistad brindada durante todo este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán y a su Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por el uso de sus instalaciones para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para los estudios de maestría (Beca No.211996)

A los Dr. César de los Santos Briones y Oscar Alberto Moreno Valenzuela, de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por ser los asesores de tesis y por el apoyo brindado al realizar este trabajo.

Al Comité de Tutoral integrado por el Dr. Roberto Gaxiola Ariza de la Universidad de Arizona, el Dr. Enrique Castaño de la Serna de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por las críticas y comentarios objetivos que permitieron el enriquecimiento éste trabajo y por su tiempo para la revisión del mismo.

De manera especial al Dr. Manuel Martínez Estévez de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por ser parte de mi comité de tesis y por la ayuda proporcionada para la realización de este trabajo en su laboratorio.

Al Dr. Roberto Gaxiola Ariza por su asesoría y disponibilidad durante el proceso de la realización de la tesis y por su valiosa donación de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* utilizadas en este trabajo.

A la Dra. Luisa López Ochoa por su ayuda y sus ideas que aportaron mucho en la mejora de esta trabajo.

A la Dra. Ileana Echavarría Machado por su disponibilidad y sus aportaciones en mi formación profesional.

A la Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano por su amistad, consejos y aportaciones a lo largo de mi estancia en esta institución.

A la M.C. Lucila Sánchez Cach de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por su ayuda, sugerencias, consejos y por la enseñanza ofrecida desde mis inicios en este centro de investigación.

A la M.C. Rosa María Galaz Ávalos de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, por compartir sus conocimientos conmigo y por su ayuda brindada durante la realización de esta tesis.

A todos los integrantes del laboratorio No. 7, 22 y 23 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán por su amistad, confianza y por haberme hecho sentir parte importante de cada uno de ellos.

A mis amigos:

De la UBBMP de distintos laboratorios que me brindaron su amistad y ayuda durante la realización de este trabajo, en especial a Inés, Wendy, Emmy, Cristina, Emanuel, Ramón, Nancy, Rocío, Fátima, Gorety, Susana.

Del antiguo ITA: Miros, Norka, Glendy, Lucy, Ariane, Eliab (Los nuevos integrantes: Angel, Roberto, Alex y Zac).

De toda la vida: Janet, Flor, David, Diego, Carlos, Lidia, Silvia, Jhony y Cinthia.

DEDICATORIAS

Doy gracias a Dios, por guiarme hacia este camino permitiéndome sobreponerme a los obstáculos durante toda mi vida y por brindarme muchas alegrías.

A mis padres

Alonso y Marbella por la confianza que han depositado en mí, por enseñarme las responsabilidades de la vida y por todo el cariño y los consejos que me han brindado durante toda mi vida.

A mi hermano

Moisés por su cariño y el apoyo que me han brindando siempre.

A mi familia

A todos aquellos que ya sea directa o indirectamente han estado conmigo y comparten mis triunfos y fracasos.

A mis Amigos

A los que forman parte importante de mi vida que me ayudan a superar las penas y disfrutan las alegrías.

Aquellos que se me adelantaron en el camino que siempre me impulsaron a salir adelante y a hacer frente a cualquier situación.

CONTENIDO

	PÁGINA
RECONOCIMIENTOS	i
AGRADECIMIENTO	iii
DEDICATORIAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	xv
ÍNDICE DE CUADROS	xix
ABREVIATURAS	xxi
RESUMEN	xxiii
ABSTRACT	xxv
INTRODUCCIÓN	1
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	3
CAPÍTULO I ANTECEDENTES	5
1.1 EL CAFETO	5
1.1.1 EL CULTIVO DEL CAFETO	5
1.1.2 PRODUCCIÓN DEL CAFETO	6
1.1.3 EL CAFETO EN MÉXICO	6
1.1.4 TAXONOMÍA Y BOTÁNICA DEL CAFETO	8
1.2 MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DEL CAFETO	11
1.2.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	12
1.3 INGENIERÍA GENÉTICA DE PLANTAS	13
1.3.1 MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFETO	14
1.3.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CAFETO	14
1.3.3 BOMBARDEO POR MICROPARTÍCULAS	15
1.3.4 TRANSFERENCIA DE GENES MEDIADA POR <i>Agrobacterium</i>	16
1.3.5 VECTORES	17

1.3.5.1	VECTORES CO-INTEGRATIVOS	18
1.3.5.2	VECTORES BINARIOS O AUTÓNOMOS	18
1.3.6	PROMOTORES	19
1.3.7	MARCADORES DE SELECCIÓN	19
1.3.8	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
1.3.8.1	BORDE IZQUIERDO Y DERECHO DEL T-ADN	23
1.4	TRANSPORTE EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS	23
1.4.1	TIPOS DE TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS	24
1.4.2	CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA EN PLANTAS	25
1.4.3	LAS PIROFOSFATASAS	26
1.4.3.1	LAS PIROFOSFATASAS SOLUBLES	26
1.4.3.2	PIROFOSFATASAS DE MEMBRANA TRASLOCADORAS DE PROTONES	27
1.4.3.3	FUNCIÓN FISIOLÓGICA, REGULACIÓN DE LA V-PPASA E IMPLICACIONES EN LA RESPUESTA A ESTRÉS	29
1.5	OBJETIVOS	32
1.5.1	OBJETIVO GENERAL	32
1.5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
1.6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO II	MATERIALES Y MÉTODOS	47
2.1	MATERIAL VEGETAL	47
2.2	DESINFECCIÓN DE LAS SEMILLAS DE <i>C. arabica</i>	47
2.3	EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE SEMILLAS DE <i>C. ARABICA</i>	47
2.4	PROTOCOLO PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE EXPLANTES FOLIARES DE PLÁNTULAS DE <i>C. ARABICA</i>	48

2.5	UTILIZACIÓN DE KANAMICINA COMO ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN	52
2.6	ANÁLISIS DE LA INTEGRACIÓN DEL GEN <i>AVP1</i> DE <i>Arabidopsis thaliana</i> EN PLÁNTULAS DE CAFETO CULTIVADAS <i>in vitro</i>	53
2.6.1	EXTRACCIÓN DE ADN	53
2.6.2	AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ADN DEL PROMOTOR 35S Y LA FUSIÓN 35S CON EL GEN <i>AVP1</i>	53
2.6.3	AMPLIFICACIÓN DEL GEN <i>VIR E2</i> DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	54
2.7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
CAPITULO III	RESULTADOS	57
3.1	MATERIAL VEGETAL	57
3.2	OBTENCIÓN DE LA CEPA DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> QUE INCLUYE EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>AVP1</i> DE <i>Arabidopsis thaliana</i>	57
3.3	TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTES FOLIARES A TRAVES DE <i>Agrobacterium tumefaciens</i> CON EL GEN <i>AVP1</i> E INDUCCIÓN A EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA	60
3.4	RESPUESTA EMBRIOGÉNICA DE EXPLANTES TRANSFORMADOS DE <i>C. arabica</i>	60
3.5	UTILIZACIÓN DE KANAMICINA COMO ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN DE TRANSGENES	65
3.6	ANÁLISIS DE LA INTEGRACIÓN DEL GEN <i>AVP1</i> MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES	68
CAPITULO IV	DISCUSIONES	71
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS		75
CAPITULO V	CONCLUSIONES	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.1	Posición que ocupa México como productor y exportador en el mercado mundial cafetalero	7
1.2	Estados productores de cafeto en la República Mexicana	8
1.3	Anatomía de la semilla y el embrión del Cafeto	10
1.4	Modelo del proceso de transformación vía <i>Agrobacterium</i>	21
2.1	Estructura del T-ADN del plásmido pRG	49
2.2	Mapa del Vector pPzp212	50
3.1	Amplificación en tándem del promotor 35S y el gen <i>AVP1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i> en los plásmidos pRG integrados en <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	58
3.2	Amplificación por PCR del gen <i>VIR E2</i> de la cepa GV3101 de <i>A. tumefaciens</i>	59
3.3	Respuesta embriogénica de explantes foliares de <i>C. arabica</i> sometidas a transformación genética con el plásmido pRG233	62
3.4	Respuesta embriogénica de explantes foliares de <i>C. arabica</i> sometidas a transformación genética con el plásmido pRG395	63
3.5	Respuesta embriogénica de explantes foliares de <i>C. arabica</i> sometidas a transformación genética con el plásmido pRG394	64
3.6	Respuesta embriogénica de explantes foliares de <i>C. arabica</i> inducidas a embriogénesis somática	65
3.7	Número de embriones sobrevivientes a distintas concentraciones de Kanamicina	66

3.8	Respuesta de las plántulas transformadas con el plásmido pRG394 expuestas a kanamicina como antibiótico de selección	67
3.9	Amplificación del fragmento del promotor 35S en plántulas transformadas de <i>C. arabica</i> con el plásmido pRG394 cultivadas <i>in vitro</i>	68
3.10	Amplificación de un fragmento del gen <i>VIR E2</i> de <i>A. tumefaciens</i> en plántulas transformadas con el plásmido pRG394 de <i>C.arabica</i>	69
3.11	Amplificación del fragmento del promotor 35S y el gen <i>AVP1</i> en plántulas transformadas con el plásmido pRG394 de <i>C. arabica</i> cultivadas <i>in vitro</i>	70

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.1	Clasificación Taxonómica del Cafeto	11
2.1	Componentes del Medio MS	48
2.2	Características de plásmidos pRG	49
2.3	Componentes del Medio de cultivo Yasuda	52
3.1	Respuesta embriogénica en explantes de <i>C. arabica</i>	61

ABREVIATURAS

ES	Embriogénesis Somática
ESD	Embriogénesis Somática Directa
ESI	Embriogénesis Somática Indirecta
BA	Bencilaminoadenina
BAP	6-Bencilaminopurina
IGP	Ingeniería Genética de Plantas
Plásmido Ti	Plásmido de Inductor de Tumores
ADN-T	Acido de Transferencia
AS	Acetosiringona
NLS	Señal de Localización Nuclear
Pi	Pirofosfato Inorgánico
sPPasa	Pirofosfatasa soluble
V-PPasa	Pirofosfatasa Vacuolar
H⁺-PPasas	Pirofosfatasa Traslocadora de protones
V-H⁺-ATPasa	ATPasa vacuolar traslocadora de protones
ATP	Adenosín Trifosfato
AVP1	Gen de la Pirofosfatasa Vacuolar
MS	Medio de cultivo Murashigue & Skoog
2-4D	Ácido 2,4- Dicloro-Fenoxiacético
LB	Luria-Bertani
Mg	Miligramos
ml	Mililitros
TAE	Tris-acetato 0,8 mM, EDTA 0,02 mM.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
dNTPs	2' -deoxinucleósido-5' -trifosfato
Pb	Pares de bases
ADN	Ácido desoxirribonucleico
S	Segundos
Min	Minutos
Rpm	Revoluciones por minuto
KDa	Kilodaltons
CaMV	Virus del mosaico de la coliflor
µg	Microgramo
µl	Microlitro

RESUMEN

El Cafeto (*Coffea* ssp) es la planta de la cual se obtiene el café, que en la actualidad se cultiva en más de 50 países, los cuales en su mayoría han basado su economía en la exportación de este producto. Existen diversos factores que provocan una disminución en el rendimiento del cultivo, entre los que se encuentran la disponibilidad de agua, la disponibilidad de elementos nutrientes y la tolerancia a iones que provocan toxicidad al cultivo, entre otros. En relación a la toxicidad, es de importancia fundamental mantener la homeostasis de la concentración de iones en las células vivas, debido a la necesidad de mantener un bajo número de iones tanto esenciales como tóxicos. Para llevar a cabo dicho mecanismo, se requiere de la intervención de varios canales y transportadores iónicos localizados en las membranas biológicas de diferentes organelos celulares, uno de estos es la enzima denominada Pirofosfatasa localizada en la Vacuola y expresada por un gen único denominado *AVP1* en *Arabidopsis thaliana*, la cual incrementa en la membrana vacuolar el número de protones de hidrógeno lo que permite la activación de transportadores tanto de iones tóxicos como no tóxicos llevando a cabo lo que se conoce como Transporte activo. Se han realizado diversos trabajos de transformación genética utilizando cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para sobreexpresar el gen *AVP1* en *Arabidopsis thaliana* y en tomate, en donde se observó que un aumento en la actividad de la PPasa en *Arabidopsis thaliana* generó una tolerancia a la toxicidad de iones de sodio y en tomate indujo tolerancia a sequía. Esta tesis tuvo como objetivo el transformar plántulas de cafeto cultivadas *in vitro* con el gen *AVP1* de *Arabidopsis thaliana* mediante el uso de la cepas GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens* que contenían 3 plásmidos denominados pRG233 con el gen *AVP1* fusionado con el promotor 35S en tandem de CaMV, el pRG395 con una mutación del gen *avp1* y el pRG394 que es un plásmido utilizado como control que contiene el vector sin la inserción del gen *AVP1*. Partiendo de explantes foliares y mediante el proceso de infiltración al vacío se llevó a cabo la transformación genética obteniendo así embriones transformados con los plásmidos control y con la inserción de *AVP1*, de los cuales solo los embriones del plásmido control lograron estar en la fase de selección utilizando como antibiótico la kanamicina llegando a la etapa de plántulas, las cuales se analizaron mediante la técnica de PCR obteniéndose 3 plántulas nombradas pRG394T6, pRG394T8, pRG394T10 y pRG394T48 como positivas a la integración del plásmido control y negativas a la presencia del gen *VIR E2* exclusivo de *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRACT

Coffee (*Coffea* spp) is the plant which gives the coffee, which is now grown in over 50 countries, most of whom have based their economies on the export of this product. There are several factors that cause a decrease in crop yield, including the availability of water, availability of nutrients and tolerance to ion toxicity caused to the crop, among others. In relation to the toxicity, is critical to maintain homeostasis in the concentration of ions in living cells because of the need to maintain a low number of both essential and toxic ions. To implement this mechanism requires the involvement of ion channels and transporters located in biological membranes, of these, the proton translocating pyrophosphatase, located in the vacuole and expressed in *Arabidopsis thaliana* by a single gene, *AVP1* participate in increasing concentration of hydrogen ions, which in turn leads to activation of specific transporters for ions and for the toxic non-toxic conducting what is known as Active Transportation. There have been studies of genetic transformation using *Agrobacterium tumefaciens* strains to overexpress the *AVP1* gene in *Arabidopsis thaliana* and tomato, where it was observed that an increase in the activity of the PPAs in *Arabidopsis thaliana* resulted in a tolerance to ion toxicity sodium and in tomato induced tolerance to drought. This thesis aimed to transform the tree seedlings grown *in vitro* with *AVP1* gene from *Arabidopsis thaliana* using the *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 containing 3 plasmids called pRG233 with *AVP1* gene fused with the 35S promoter of CaMV in tandem, the pRG395 with a gene mutation *avp1* and pRG394 which is used as a control plasmid containing the vector without the insertion of the gene *AVP1*. Based on leaf explants and by vacuum infiltration process was carried out genetic transformation thereby embryos with control plasmids and the insertion of *AVP1*, of which only embryos of the control plasmid were able to be in the selection phase using kanamycin as an antibiotic to reach the stage of seedlings, which were analyzed using the PCR technique produces seedling 3 appointed pRG394T6, pRG394T8, pRG394T10 and pRG394T48 as a positive control plasmid integration and negative for the presence of *VIR E2* gene that is exclusively of *Agrobacterium*.

INTRODUCCIÓN

En el mundo, el café es el producto más sobresaliente a nivel económico, después del petróleo, ya que representa un importante recurso para millones de personas que se dedican a esta actividad; igualmente, varios países dependen de la exportación del café como producto para aumentar su tecnología (Carneiro, 1997).

El cafeto, planta de la que se obtiene la bebida denominada café, aparece aproximadamente en el año 675 en las montañas de Etiopía, en África Oriental. En 1714, los franceses llevaron un esqueje vivo de cafeto a la isla antillana de la Martinica y así se establecieron las primeras plantaciones en la Guayana Francesa y en la Guayana Holandesa, siendo esta única planta el origen de los extensos cafetales de América Latina (Castillo-Ponce, 1997).

En México, el cafeto fue introducido por tres regiones diferentes: 1) De la isla de Cuba a la región de Córdoba, Veracruz; 2) De Moka, en Arabia, se introdujo a Uruapan, Michoacán; y, 3) De Guatemala fue introducida a Tuxtla Chico, Chiapas (Santoyo-Cortés *et al.*, 1996).

Debido a la gran popularidad de la bebida, el cultivo del cafeto se ha extendido a través del mundo, siendo introducido en Surinam, Haití, República Dominicana, Martinica, Brasil, Jamaica, Puerto Rico, Costa Rica, Cuba, Venezuela, México, El Salvador, Colombia y gradualmente a otros países del continente americano (Santana-Buzzy, 1993).

De entre las especies comprendidas en el género *Coffea* sobresalen la *C. arabica* y *C. canephora*, debido a que son las de mayor interés económico; la primera es de mayor importancia por su calidad, valor en el mercado nacional e internacional, y por su extensión territorial en las regiones cafetaleras de México.

Se estima que *C. arabica* ocupa el 90% de la superficie destinada a la producción de café cultivado alrededor del mundo y que *C. canephora* ocupa solamente el 2% de dicho espacio (De los Santos-Briones & Hernández -Sotomayor, 2006); el resto de la superficie es ocupado por algunas otras especies como *C. liberica*, *C. dewevrei* y *C. racemosa* que solo son cultivadas para uso local (Carneiro, 1997).

Como cultivo de importancia económica, el cafeto es afectado por factores que intervienen en su producción, como es el caso de enfermedades causadas por patógenos como hongos, virus, bacterias y

nemátodos, la deficiencia de nutrientes, la falta de disponibilidad de agua, la tolerancia a suelos ácidos y la toxicidad por metales como el aluminio, el hierro, el plomo, el cobre, el níquel y el sodio (De los Santos-Briones & Hernández -Sotomayor, 2006). Centrándose en la tolerancia a la toxicidad por metales, existen diversos modelos que hipotetizan la entrada de estos en la célula en donde el transporte que se lleva a cabo a través de las membranas biológicas juega un papel importante debido a que estas son las que permiten o restringen el paso de ciertos iones protegiendo así la naturaleza interna y externa de la célula (Gaxiola *et al.*, 2002), dicho transporte se lleva a cabo mediante ciertas estructuras que se encuentran en las membranas que pueden ser de naturaleza protéica o simples estructuras que forman poros clasificándose en canales, transportadores y bombas.

En la membrana vacuolar de plantas, algunas bacterias y arqueobacterias, un gen, el *VP1* codifica para una pirofosfatasa, una enzima conocida como la bomba translocadora de protones, cuya función es generar un gradiente de potencial en la membrana para facilitar el flujo de iones hacia el tonoplasto en un proceso denominado internalización o compartamentalización vacuolar, la cuál se ha hipotetizado es llevada a cabo para evitar la toxicidad de la célula a ciertos iones que pudieran afectarla.

Gaxiola *et al.*, (2001), mediante ingeniería genética obtuvieron plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *AVP1*, consiguiendo un incremento en la actividad de la pirofosfatasa, lo que llevó a la tolerancia de las plántulas de *Arabidopsis* a la salinidad.

La transformación genética de plantas puede ser definida como la transferencia de genes aislados de plantas, virus, bacterias o animales dentro de nuevo material genético. La mayoría de las plantas transgénicas han sido obtenidas usando dos métodos generales: la transferencia mediada por *Agrobacterium* y la transferencia directa de ADN (Fisk & Dandekar, 1993).

Debido a la capacidad que presenta un género de bacterias para insertar material genético de diferentes organismos a especies de plantas obteniendo así transgenes con características que le confieran tolerancia a distintos factores que afectan su producción, en este trabajo se propone llevar a cabo la transformación genética de café utilizando una cepa de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, para obtener a largo plazo líneas de plántulas de café tolerantes a la toxicidad provocada por la salinidad, siendo este el primer trabajo realizado con este gen en plantas leñosas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Carneiro M. (1997). *Coffe* biotechnology and its applications in genetic transformation. *Euphytica* 96:167-172.
- Castillo-Ponce G; A. Contreras-Jiménez, C. A. Zamarripa, I. Méndez-López, M. Vásquez-Ramírez, F. Holguín-Meléndez y A. Fernández-Rodríguez. (1997). Tecnología para la producción de café en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, México D. F. Folleto técnico número 8.
- De los Santos-Briones C. and Hernández-Sotomayor T. (2006). *Coffee* Biotechnology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1):217-227.
- Fisk, H.J. and Dandekar, A.M. (1993). The introduction and expression of transgenes in plants. *Scientia Horticulturae* 55:5-36.
- Gaxiola R; G. Fink and K. Hirschi. (2002). Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology*. 129:967-973.
- Gaxiola R; J. Li, S. Undurraga, L. Dang, G. Allen, S. Alper and G. Fink. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *PNAS*. 98(20):11444-11449.
- Santana-Buzzy N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.). Tesis de Doctorado. Instituto superior de ciencias agropecuarias de la habana "Fructuoso Rodríguez Pérez". Pp. 12.
- Santoyo-Cortés V. H; S. Díaz-Cárdenas y B. Rodríguez-Padrón. (1996). Sistema agroindustrial del café en México: diagnóstico, problemáticas y alternativas. Universidad Autónoma de Chapingo, México. Pp. 138-139.

Capítulo I

ANTECEDENTES

1.1 EL CAFETO

1.1.1 EL CULTIVO DEL CAFETO

El café es el producto agronómico más sobresaliente a nivel económico, ya que representa un importante recurso para millones de personas que se dedican a esta actividad, por lo que varios países han basado su economía en la exportación de dicho producto (Carneiro, 1997).

El café aparece aproximadamente en el año 675 en las montañas de Etiopía, en África Oriental; el género *Coffea* originalmente tuvo una amplia distribución en la parte tropical y subtropical de África y Asia. El efecto estimulante del grano tostado y molido fue bien conocido por los nativos de África cuando los árabes llevaron semillas de *Coffea arabica* desde Etiopía a Yemen en el siglo XIII; en esta misma época fue reconocido en el Cairo y la Mecca, y por el siglo XIV en Persia y Turquía seguido de Ceilán, India, Indonesia y otras regiones con condiciones favorables para el cultivo (Santana-Buzzy, 1993; Eira *et al.*, 2006).

A lo largo de la historia, el café como cultivo se ha extendido a través del mundo, siendo introducido en Surinam, Haití, República Dominicana, Martinica, Brasil, Jamaica, Puerto Rico, Costa Rica, Cuba, Venezuela, México, El Salvador, Colombia, y gradualmente a otros países del Continente Americano (Santana-Buzzy, 1993); tal es el caso de México en donde este se introdujo por tres regiones diferentes: 1) Desde la isla de Cuba a la región de Córdoba, Veracruz; 2) De Moka, Arabia, se introdujo a Uruapan, Michoacán; y, 3) Desde Guatemala fue introducida en Tuxtla Chico, Chiapas (Santoyo-Cortés *et al.*, 1996).

De entre las especies comprendidas en el género *Coffea* sobresalen la *C. arabica* y *C. canephora*, debido a que son las de mayor interés económico; la primera es de mayor importancia por su calidad, valor en el mercado nacional e internacional, y por su extensión territorial en las regiones cafetaleras de México. Se estima que *C. arabica* ocupa el 97% de la superficie de café cultivado en el mundo y que *C. canephora* ocupa

solamente un porcentaje no mayor al 2% (De los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006). Algunas otras especies como *C. liberica*, *C. dewevrei* y *C. racemosa* son solo cultivadas para uso local (Carneiro, 1997).

1.1.2 PRODUCCIÓN DEL CAFETO

El cafeto se cultiva en aproximadamente 50 países distribuidos en la región tropical del mundo. La producción de café al año supera los 60 millones de sacos de 60 kg, teniendo a Brasil como el principal productor, seguido de Colombia, Indonesia, Vietnam y México (Pacheco & Pohlan, 2005).

La especie económicamente más importante de cafeto es *arabica* la cual produce aproximadamente 79 % de la producción mundial, *C. canephora* Pierre ex Froehner cerca del 20 % y *C. liberica* un 1 %. La producción mundial de cafeto se consume prácticamente en todas las naciones, especialmente en las zonas templadas, en donde se hallan los países industrializados.

El cafeto es un producto cuyo consumo doméstico es reducido, ya que la mayor parte de los volúmenes que se obtienen son destinados al mercado internacional, como el caso de Brasil que ocupa el primer lugar en producción de dicho producto, destinando el 75 % de su producción para comercialización en el mercado internacional y el 25 % para consumo propio (Santoyo- Cortés *et al.*, 1996).

1.1.3 EL CAFETO EN MÉXICO

En la agricultura mexicana, la cafeticultura es de importancia económica, social y ecológica, ya que es producido por cerca de 300 mil productores, agrupados en 16 organizaciones, generando empleos para aproximadamente 3.5 millones de personas que se dedican directa o indirectamente a este cultivo (Regalado, 1995). En 2008, México ocupó el quinto lugar a nivel mundial como productor de cafeto (Figura 1.1), después de Brasil, Vietnam, Colombia, Indonesia, quienes ocupan los primeros cuatro lugares en producción.

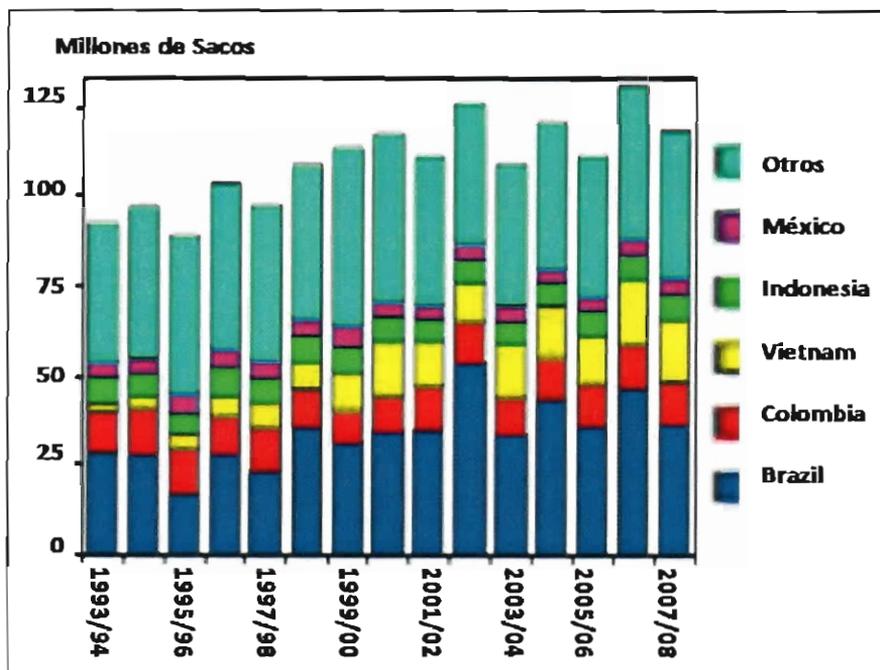


Figura 1.1. Posición que ocupa México como productor y exportador en el mercado mundial cafetalero

Tomado de <http://www.fas.usda.gov/htp/tropical.asp>

México produce cafetos de excelente calidad ya que su topografía, altura, climas y suelos le permiten cultivar y producir variedades clasificadas entre las mejores en el mundo. Ejemplo de esto son las variedades Coatepec, Pluma Hidalgo, Jaltenengo, Marago y Natural de Atoyac, solo por citar algunos; además ocupa el primer lugar como productor mundial de café orgánico y uno de los primeros en cafetos "gourmets". La producción total de la cosecha 2007-2008 se muestra en la Figura 1.1, la cual fue de aproximadamente 115 millones de sacos.

El café se produce sobre una superficie de 690 mil Ha en 12 estados de la República Mexicana, en 56 regiones, 440 municipios en alrededor de 4000 comunidades de mayor pobreza y marginación, las cuales se encuentran situadas en la parte centro-sur del país como se observa en la Figura 1.2. Entre los estados productores se encuentran Colima, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Tabasco y Veracruz.

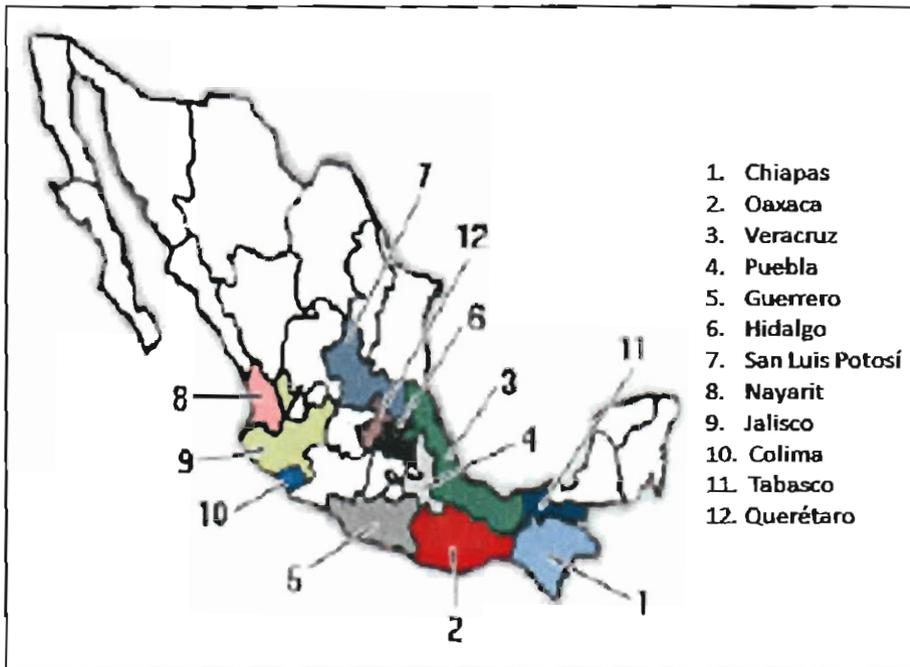


Figura 1.2. Estados productores de cafeto en la República Mexicana Tomado de Consejo Mexicano del Café, 2001

1.1.4 TAXONOMÍA Y BOTÁNICA DEL CAFETO

Las raíces que tiene el café son: pivotante, axiales, laterales y raicillas. La pivotante puede considerarse como la raíz central; la longitud máxima en una planta adulta es de 50 a 60 cm (Eira *et al.*, 2006).

El tallo es leñoso, erecto y de longitud variable de acuerdo con el clima y tipo de suelo; en las variedades comerciales varía entre 2 y 5 m de altura. En una planta adulta, la parte inferior es cilíndrica, mientras que la parte superior (ápice) es cuadrangular y verde, con esquinas redondas y salidas (Eira *et al.*, 2006).

Las ramas pueden ser laterales ó primarias; son opuestas, alternas y tienen un punto apical de crecimiento que va formando nuevas hojas y entrenudos. El número de éstos puede variar de un año a otro y, consecuentemente, las axilas que forman dan origen al número de flores y, por ende de frutos (Eira *et al.*, 2006).

Las hojas miden de 12 a 24 cm. de largo por 5 a 12 cm de ancho, variando su forma elíptica a lanceolada, en cuya parte inferior se encuentran unos agujeros de forma irregular que se abren en cámaras diminutas llamadas domocios, cuya función no se conoce con precisión (Eira *et al.*, 2006).

El fruto es de superficie lisa y brillante y de pulpa delgada; está constituido de tres partes diferentes: el epicarpio o epidermis, el mesocarpio o pulpa y el endospermo o semilla. Cuando madura puede ser de color rojo o amarillo, dependiendo del cultivar (Eira *et al.*, 2006).

La semilla del café (Figura 1.3), es de forma elíptica ó planoconvexa; presenta una cubierta externa formada por una capa endocárpica que se denomina pergamino, y otra delgada de color gris llamada espermodermo o piel plateada. En semillas de *C. canephora*, el espermodermo está adherido y es de color café (Dedeca, 1957).

El endospermo, que se considera un tejido vivo, contiene dos regiones: una externa-dura y otra interna-suave. Ambas se encuentran rodeando al embrión (Eira *et al.*, 2006).

El embrión (Figura 1.3), es de tamaño pequeño (aprox. 3 a 4 mm de longitud) y está compuesto de un axis y dos cotiledones en forma de cordones adheridos, los cuales se localizan cerrados en la superficie convexa de la semilla (Da Silva *et al.*, 2004; Eira *et al.*, 2006).

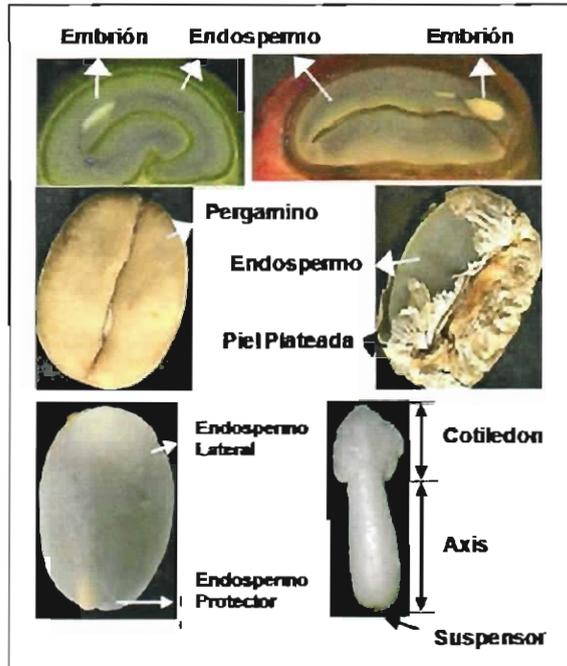


Figura 1.3. Anatomía de la semilla y el embrión del Cafeto
Tomado de Eira et al., 2006

La taxonomía de los géneros de *Coffea* es complicada. Diferentes autores incluyen de 60 a 100 especies que se agrupan en cuatro secciones: *Eucoffea*, *Mascarocoffea*, *Paracoffea* y *Argocoffea*. Las especies cultivadas en la actualidad pertenecen a la sección *Eucoffea* y particularmente a las subsecciones *Erythrocoffea* (que comprende las especies *C. arabica*, *C. congeneresis*, *C. canephora*, y *C. eugenioides*) y *Pachycoffea* (que incluye las especies *C. liberica*, *C. hainii*, *C. cymensis*, *C. abeokutae* y *C. dewevrei*). La variedad café excelsa (*C. excelsa*) y afines son consideradas como formas de *C. liberica*; el Cuadro 1.1 muestra la clasificación taxonómica del cafeto reportada por Judd et al., (2002).

Cuadro 1.1. Clasificación Taxonómica del Cafeto según Judd *et al.*, 2002

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Eudicotiledoneas(Tricopaltes)</i>
Clase	<i>Asterides</i>
Subclase	<i>Euasterides I</i>
Orden	<i>Gentianales</i>
Familia	<i>Rubiaceae</i>
Género	<i>Coffea</i>
Especie	<i>Coffea arabica</i> <i>Coffea canephora</i>

1.2 MÉTODOS DE PROPAGACIÓN DEL CAFETO

Las plantas de cafeto se propagan por métodos de cultivo convencionales; Estas pueden reproducirse, ya sea de forma sexual, es decir, por medio de semilla o de forma asexual, vía estacas e injertos. La especie autógena *C. arabica* se multiplica normalmente por semillas mientras que la *C. canephora*, especie alógama, autoestéril, debe propagarse por medios asexuales para evitar problemas de autoincompatibilidad y producción (Castillo-Ponce *et al.*, 1996).

Los métodos convencionales de mejoramiento genético son un largo proceso que involucra diversas y diferentes técnicas de selección de poblaciones silvestres mediante evaluaciones de hibridación, de progenie y de cruces interespecíficos. Desafortunadamente, estos métodos tradicionales de cultivo son lentos, ya que usándolos toma más de 30 años obtener un nuevo cultivar, por lo que se genera un costo elevado; además la producción y obtención de semillas para su distribución resulta insuficiente para satisfacer las necesidades de los cultivadores.

La introducción de técnicas de propagación *in vitro* con potenciales para multiplicar genotipos de valores superiores a un menor tiempo, proporcionan un mayor avance, por lo que diversos métodos de regeneración y propagación *in vitro* han sido optimizados exitosamente, incluyendo la embriogénesis somática y la organogénesis, en donde para ambas técnicas se parte de cultivo de brotes axilares y adventicios, meristemos apicales, embriones cigóticos, anteras, polen, células en suspensión y protoplastos (Carneiro, 1999).

1.2.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

La embriogénesis somática (ES), es el proceso por medio del cual las células somáticas son inducidas para generar células embriogénicas, las cuales pasan por una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que resultan en la formación de un embrión. La habilidad para producir embriones morfológicamente bien formados y desarrollarse en una planta a partir de células somáticas en cultivo sin organización es exclusivo, hasta este momento únicamente del reino vegetal. A diferencia de los embriones cigóticos, los somáticos pueden ser observados fácilmente, sus condiciones del cultivo pueden ser controladas y se pueden producir en grandes cantidades (Kawahara & Komamine, 1995).

La ES es la alternativa más eficiente para la propagación masiva de plantas. Las ventajas del proceso, como son el control de las condiciones de cultivo, la facilidad de seguir visualmente el proceso, la disponibilidad del tejido y los altos rendimientos en la producción de embriones hacen de la embriogénesis somática un sistema ideal para realizar estudios a nivel morfohistológico, fisiológico, bioquímico y molecular. Reportes de la literatura mencionan que existen diferencias significativas entre especies y en muchos casos, los resultados que se obtienen no pueden ser aplicados a otras especies e inclusive entre variedades (Quiroz-Figueroa, 2003).

Existen dos tipos básicos de inducción de la embriogénesis: la somática directa (ESD) y la indirecta (ESI). El término ESD se aplica al explante que presenta una proliferación celular desorganizada mínima (inducida por heridas) antes de formar los embriones somáticos, mientras que la ESI se refiere a explantes en los que hay abundante proliferación celular sin organización (callo) (Sharp *et al.*, 1980). Se ha sugerido que en la ESD, las células pre-embriogénicas ya están presentes y solo requieren condiciones favorables para la expresión del programa embriogénico, mientras que en ESI, se precisa de la predeterminación de las células desdiferenciadas y la adquisición del estadio embriogénico antes de iniciar el desarrollo del embrión (Williams & Maheswaran, 1986).

Los principales factores involucrados para un determinado tipo de respuesta dependerán de la naturaleza del regulador de crecimiento utilizado, el origen del explante, el estadio fisiológico y la especie utilizada. Sin embargo, el término directa o indirecta es útil para describir aquellos casos en los que hay poca o abundante proliferación celular sin organización, previa a la formación de embriones somáticos, pero no necesariamente podría indicar diferencias fundamentales en las células involucradas (Halperin, 1995).

Se han reportado para el género *Coffea* varios protocolos de ES. El primero fue realizado para *C. canephora* por Starisky (1970), usando internudos como fuente de los explantes. Herman & Haas (1975) reportaron la ES para *C. arabica* a partir de explantes foliares, Söndhal *et al.*, (1977; 1979) desarrollaron un sistema de dos fases para la inducción de embriones a partir de hojas de *C. arabica*. A principios de los ochentas, Dublin (1981), reportó embriones somáticos utilizando explantes foliares en un medio suplementado con citocininas.; Yasuda *et al.*, (1985) indujeron la formación de embriones en explantes foliares de *C. arabica* usando BA (benciladenina); desde entonces, se han reportado otros sistemas basándose en las formulaciones de los medio de cultivo de los autores anteriormente mencionados.

1.3 INGENIERÍA GENÉTICA DE PLANTAS

El progreso de la tecnología del ADN recombinante hace necesario el mejoramiento de las técnicas útiles en la ingeniería genética de plantas (IGP) (Jenes *et al.*, 1993; Carneiro, 1999). La IGP es una aplicación de la biotecnología, que involucra la manipulación de ADN y la transferencia de genes entre especies. Actualmente hay muchas aplicaciones de la IGP en la agricultura para generar cultivos transgénicos como los resistentes a herbicidas, plagas y enfermedades (Altieri, 2000).

Más allá del mejoramiento de los cultivos, la habilidad para crear plantas transgénicas es importante para el estudio de las funciones del gen y la regulación de procesos fisiológicos y de desarrollo. Los avances en el cultivo de tejidos, combinado con el mejoramiento en la tecnología de transformación, han resultado en el incremento de la eficiencia de la transformación genética de plantas (Hansen & Wright, 1999).

En la naturaleza, a menudo las células vegetales se asocian con ciertas bacterias, siendo estas un vehículo conveniente para la introducción en la planta de ADN clonado o recombinante (Lodish *et al.*, 1995). La tecnología de clonación involucra la construcción de moléculas de ADN por unión de secuencias de diferentes fuentes. El producto es llamado ADN recombinante y la técnica, Ingeniería genética, que es aplicable tanto en organismos procariotes como eucariotes. La clonación del ADN es posible por la capacidad de plásmidos bacteriales para reproducir después, secuencias adicionales de ADN que han sido incorporadas dentro de sus genomas (Lewin, 2001).

1.3.1 MEJORAMIENTO GENÉTICO DEL CAFETO

El mejoramiento y la selección del café han proseguido en dos vías principales: uno ha sido utilizando en la selección de razas locales sobresalientes en los diversos países donde se cultiva café y el otro ha intervenido en el mejoramiento de *C. arabica* y otra especie de importancia económica (Solís, 2002).

Las investigaciones sobre el mejoramiento y la selección de café en los trópicos americanos y en África Oriental se han concentrado principalmente en la obtención de variedades que presenten mayor capacidad de producción, lo que los ha llevado a reconocer que dichas selecciones por sí solas alcanzan los límites fijados por las cualidades propias del material de siembra, obteniéndose así resultados favorables al cruzar diferentes variedades del *C. arabica*, e incluso en los cruces que incluyen otras especies (Solís, 2002).

Un aspecto necesario en los programas de mejoramiento y selección llevados a cabo en diversas áreas cafetaleras, ha sido el desarrollo de técnicas biotecnológicas y métodos de propagación vegetativa, por medio de los cuales se puede preservar la identidad del material de siembra de calidad superior. Entre estos métodos destacan el empleo de las técnicas biotecnológicas entre las que se encuentra la transformación genética.

1.3.2 TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL CAFETO

La transformación genética de plantas puede ser definida como la transferencia de genes aislados de plantas, virus, bacterias o animales dentro de un nuevo material genético. En plantas, la transformación exitosa requiere la producción de plantas normales y fértiles que expresen los genes insertados; el proceso de transformación involucra distintas etapas como la inserción, integración, expresión y heredabilidad del nuevo ADN (Lewin, 2001).

La mayoría de las plantas transgénicas han sido obtenidas usando dos métodos generales: la transferencia mediada por *Agrobacterium* y la transferencia directa de ADN, esta última involucra métodos como bombardeo por partículas y la electroporación (Fisk & Dandekar, 1993).

Los resultados de diversas líneas de estudio han demostrado que el café puede ser transformado usando varias técnicas de transferencia de genes, entre estos se incluyen la electroporación de protoplastos de callos embriogénicos de *C. arabica* (Fernández-Da Silva & Menéndez, 2003), el co-cultivo de embriones somáticos de *C. arabica*, *C. canephora* y *Arabusta* con *Agrobacterium rhizogenes* (Spiral *et al.*, 1993, Perthuis *et al.*, 2005) y el bombardeo de explantes de hoja de *C. arabica*, *C. canephora* y *Arabusta* (Nagai *et al.*, 1992, Van Boxtel *et al.*, 1995, Ribas *et al.*, 2005).

El primer reporte de transformación genética realizada en café fue por electroporación de protoplastos (Acuna & De Pena, 1991), lo que permitió un aumento en el número de plantas transformadas y una reducción en el tiempo de desarrollo.

Para *C. arabica* se ha reportado la transformación utilizando cepas silvestres de *Agrobacterium tumefaciens* (Carneiro, 1997, Hatanaka *et al.*, 1999, Perthuis *et al.*, 2005). Sin embargo, existen diversos problemas asociados a su transformación, como son la baja eficiencia de transformación, el mantenimiento restringido de las plantas transgénicas y su regeneración con tratamientos agrónomicamente no importantes como son la kanamicina, el clorsulfuron, el glifosinato, glifosato e higromicina, los cuales son utilizados como agentes de selección de plantas transgénicas (Santana *et al.*, 2007).

Quiroz-Figueroa *et al.*, (2002), aportó un avance en la generación de embriones somáticos, partiendo de explantes de hoja para la transformación del café, misma que se ha realizado mediante la técnica de infiltración al vacío de dichos explantes con *Agrobacterium*, seguido de la inducción de la ES. Dicho método ha proporcionado una rápida producción de plantas transgénicas de *C. canephora* (Canché-Moo *et al.*, 2006).

1.3.3 BOMBARDEO POR MICROPARTÍCULAS

Este método involucra el involucramiento de pequeñas partículas de tungsteno u oro (1-5 μm) con ADN biológicamente activo y la aceleración de esas partículas hacia el tejido vegetal a alta velocidad; las partículas penetran la pared celular alojándose en las células donde se libera el ADN resultando la transformación individual de células en un explante (Fisk & Dandekar, 1993). Para el bombardeo se puede emplear cualquier tipo de explante vegetal, desde células y protoplastos hasta plántulas completas; sin embargo la principal desventaja del método continúa siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de

células que logran incorporar de manera permanente la información genética transmitida (Nieto-Jacobo *et al.*, 1999).

1.3.4 TRANSFERENCIA DE GENES MEDIADA POR *Agrobacterium*

La transferencia y expresión de genes ajenos a las células vegetales es ahora una práctica rutinaria en muchos laboratorios del mundo convirtiéndose en una herramienta de gran importancia para estudios en la expresión de genes y la obtención de variedades de plantas mejoradas de interés comercial. Aunque muchos sistemas de transformación han sido investigados, el sistema que ha dado mayor éxito es el basado en el plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens* (Herrera-Estrella & Simpson, 1988).

Estudios moleculares demostraron que las células pertenecientes a *Agrobacterium* son únicas, por su habilidad de llevar a cabo una transferencia de material genético entre especies de diferentes reinos, en este caso entre procariotas y plantas. Esta característica de transferir segmentos de ADN a especies vegetales es utilizada como herramienta para estudios biotecnológicos de transformación (Kunik *et al.*, 2001; Zupan *et al.*, 2000). Existen antecedentes de métodos de transformación mediados por *Agrobacterium tumefaciens* por infiltración al vacío. Tjokrokusumo *et al.*, (2000) reportaron la infiltración al vacío de polen de petunia con *Agrobacterium tumefaciens*, aunque en él se reportan frecuencias similares de transformación genética tanto al polinizar flores con polen infiltrado al vacío con *Agrobacterium tumefaciens* como al aplicar una gota de la suspensión bacteriana al estigma previo a la polinización; Ronde *et al.*, (2001), reportan la transformación de semillas de soya mediadas por *A. tumefaciens* por infiltración al vacío, este protocolo se presenta como un método simple y rápido que no requiere del cultivo de tejidos y permite la obtención de plantas transformadas en forma directa con un incremento en el porcentaje de transformantes del 6 al 30 %. Charity *et al.*, (2001) reportan la transformación de tejidos organogénicos de *Pinus radiata*.

1.3.5 VECTORES

Un vector es cualquier genoma extracromosomal pequeño. Los genomas vectores son encontrados en la naturaleza dentro de una especie en particular y replicado dentro de la célula u hospedero natural de especies estrechamente relacionadas (Singer & Berg, 1991).

Un vector debe poseer: a) un gen de resistencia a antibióticos manejado por un promotor funcional de la planta, b) un gen de resistencia a antibióticos para la selección de la bacteria, y c) un sitio en la porción transferida conteniendo uno o más sitios de restricción para la clonación molecular (Zyprian & Kado, 1990).

Los plásmidos son moléculas circulares de ADN que se replican separadamente del cromosoma hospedero y tiene un tamaño de 5,000 a 40,000 pares de bases (Singer & Berg, 1991). Los plásmidos bacterianos no contienen genes esenciales, pero pueden tener genes que le confieren a la bacteria resistencia a antibióticos. En algunos casos los plásmidos extienden enormemente los nichos ecológicos en que la bacteria puede crecer. Un ejemplo notable es el vector inductor de tumores (Ti) de una especie de *Agrobacterium* que causa una enfermedad conocida como agalla de la corona (Hooykas & Beijersbergen, 1994).

El plásmido Ti posee genes involucrados en actividades bacterianas y de la célula vegetal, incluyendo aquellas que se requieren para llevar a cabo la transformación y una serie de genes involucrados con la síntesis o utilización de opinas (Lewin, 2001), que son usadas como sustancias específicas de crecimiento bacteriano (Holsters *et al.*, 1982).

En *Agrobacterium* se usan básicamente dos tipos de vectores, los que se recombinan por ADN homólogo en un plásmido Ti residente a menudo llamados vectores co-integrativos o intermediarios y los que no necesitan recombinarse en un plásmido Ti residente, llamados vectores binarios o autónomos. Sin embargo ambos vectores tienen tres características esenciales: sitios únicos de restricción para la clonación de genes, genes marcadores expresados en plantas para la selección de plantas transgénicas que reemplazan a los genes oncogénicos y un gen marcador expresado en bacterias para la selección del vector en *Agrobacterium* y *E. coli* (White, 1993; Zyprian & Kado, 1990).

1.3.5.1 VECTORES CO-INTEGRATIVOS

Debido al tamaño de los plásmidos Ti y al gran número de genes que están involucrados en el mecanismo de transformación, no era factible desarrollar un "minivector" con sitios únicos de clonación en localizaciones adecuadas dentro de la región T y con todas las funciones esenciales para la transferencia y estabilidad del ADN-T. Por lo que como método alternativo se introdujeron genes en sitios específicos en la región-T de un plásmido Ti funcional, desarrollándose así los llamados vectores intermediarios o co-integrativos, en los cuales el ADN-T es subclonado en vectores plásmidos pequeños convencionales de *E. coli*. Los vectores co-integrativos poseen una región de homología entre el plásmido Ti (dentro de los bordes de ADN-T) y el plásmido vector permitiendo la manipulación de ADN foráneo en vectores de *E. coli* (Gelvin & Lee; 2008).

1.3.5.2 VECTORES BINARIOS O AUTÓNOMOS

Los vectores binarios se construyeron debido a su fácil manipulación, ya que son pequeños y simples (An, 1995). Los dos componentes principales para la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*: el ADN-T y la región *vir*, residen en plásmidos separados. Estos forman la base de los vectores binarios. Los plásmidos binarios poseen las siguientes características: 1) Un marcador de selección para células bacterianas unido a un promotor como el de la nopalina sintasa (*nos*), 2) Un marcador de selección para células vegetales, unido a un promotor como el CaMV 35S; 3) Un sitio múltiple de clonación y/o expresión y 4) Los bordes izquierdo y derecho del ADN-T del plásmido Ti, para colocar el marcador de selección y el sitio múltiple de clonación (Shaw, 1995).

En los vectores binarios la manipulación de la región de ADN se realiza en un plásmido de replicación autónomo distinto de los que llevan los genes *vir* necesarios para la transformación. La transferencia de genes en esos sistemas involucra dos plásmidos, ambos capaces de replicarse en *Agrobacterium*, uno de ellos es un plásmido Ti modificado (o intacto) que provee las funciones de *vir* en trans. El segundo es un plásmido de amplio rango de hospederos que puede replicarse en *E. coli* y *Agrobacterium* y contiene los bordes del ADN-T flanqueando el constructo del gen para la inserción y un marcador de selección de la planta (Gelvin & Lee; 2008).

Los vectores binarios son pequeños (10-15 kb) y no requieren cointegración, después de la inserción de un gen dentro de un sitio único en

la región ADN-T. Usando *E. coli* como hospedante, el vector es transferido en *Agrobacterium* por conjugación (An, 1995) o transferencia directa de ADN (técnicas de electroporación o congelamiento-descongelamiento) (Hellens & Mullineaux, 2000).

1.3.6 PROMOTORES

La expresión de genes foráneos en plantas transformadas requiere que sean puestos bajo el control de un promotor activo en células vegetales, el cual determina donde, cuándo, cuánto y bajo qué condiciones se expresa el gen (Heldt, 2005). La elección de un promotor depende del efecto deseado, por lo tanto para lograr una transformación estable el promotor debe ser constitutivo y tener un alto nivel de expresión, permitiendo la fácil selección de los transformantes (Shillito & Saul, 1988).

Un promotor ampliamente usado es el 35S aislado del virus del mosaico de la coliflor, siendo uno de los mejores promotores funcionales en plantas, ya que tiene un alto nivel de expresión en todas las partes de la planta, por lo que se le ha dado el nombre de promotor constitutivo (An, 1995).

Otro promotor usado en muchos laboratorios es el de la nopalina sintasa (NOS), el cual proporciona una alta producción de ARNm en tumores inducidos por plásmidos Ti de tipo nopalina, sin embargo se ha encontrado que este promotor no es expresado constitutivamente en las células vegetales ya que es altamente activo en raíces pero débilmente expresado en hojas (An, 1995).

El uso de fusiones entre promotores y genes reporteros ha permitido un monitoreo detallado de la actividad de numerosos promotores de plantas, ya que han demostrado su habilidad para dirigir la expresión de genes foráneos en las plantas de una manera específica en los tejidos (Guerineau, 1995).

1.3.7 MARCADORES DE SELECCIÓN

En los sistemas de transformación de plantas, la eficiencia de transferencia de genes estable es baja, únicamente una fracción de las células expuestas al ADN foráneo integran el ADN dentro del genoma, por

lo que son requeridos sistemas que permitan la selección de los clones transformados.

Un sistema selectivo consiste de un agente selectivo y un gen marcador de selección. Los marcadores de selección usualmente confieren resistencia a agentes químicos, tales como antibióticos o herbicidas que inhiben funciones celulares, esto es debido a que codifican una proteína que confiere la capacidad a células transformadas para crecer en un medio conteniendo un compuesto tóxico para las células no transformadas pero no para las transformadas. El producto del gen marcador de selección puede ser una enzima detoxificante capaz de degradar al agente selectivo (Hansen & Wright, 1999).

Entre los genes marcadores de selección más usados destacan el de la neomicina fosfotransferasa II (*NPTII*), estreptomina fosfotransferasa (*STP*) y el gen de la gentamicina-3-N-acetiltransferasa (*AACC3*) (Hellens & Mullineaux, 2000).

1.3.8 *Agrobacterium tumefaciens*

Es una bacteria del suelo que causa una enfermedad en plantas conocida como agalla de la corona, la cuál es un cáncer que provoca la multiplicación de células de la planta que han adquirido la propiedad para dividirse *in vitro* sin un suplemento exógeno de hormonas y en ausencia de la bacteria (Dessaux *et al.*, 1993). Estos tumores han sido considerados como agregados caóticos de células, sin embargo se ha encontrado que consisten de un sistema sofisticado de haces vasculares con floema y xilema funcional conectados al sistema vascular del hospedero (Rezmer *et al.*, 1999).

La interacción *Agrobacterium* - célula vegetal consta de una serie de 8 pasos (Gelvin, 2000) (Figura 1.4): 1.- Reconocimiento célula-célula; 2.- Señales de la planta; 3.- Activación transcripcional; 4.- Transducción de señales; 5.- Metabolismo del ADN-T; 6.- Transporte intracelular; 7.- Importe nuclear; y 8.- Integración del ADN-T.

La colonización bacteriana es el primer paso en la inducción de tumores y se produce cuando *A. tumefaciens* se une a la superficie celular de la planta (De la Riva *et al.*, 1998). El ciclo de infección de dicha bacteria es complejo, involucra un número de señales químicas emitidas por el patógeno y su hospedero (Gelvin, 2000). El reconocimiento *Agrobacterium* - célula hospedera se lleva a cabo cuando la bacteria se une libremente por

medio de receptores (ChvA, ChvB, PscA y Att) a las proteínas receptoras de la célula hospedera que se encuentran en la superficie celular y luego sintetiza filamentos de celulosa que estabilizan la unión inicial (Sheng & Citovsky, 1996).

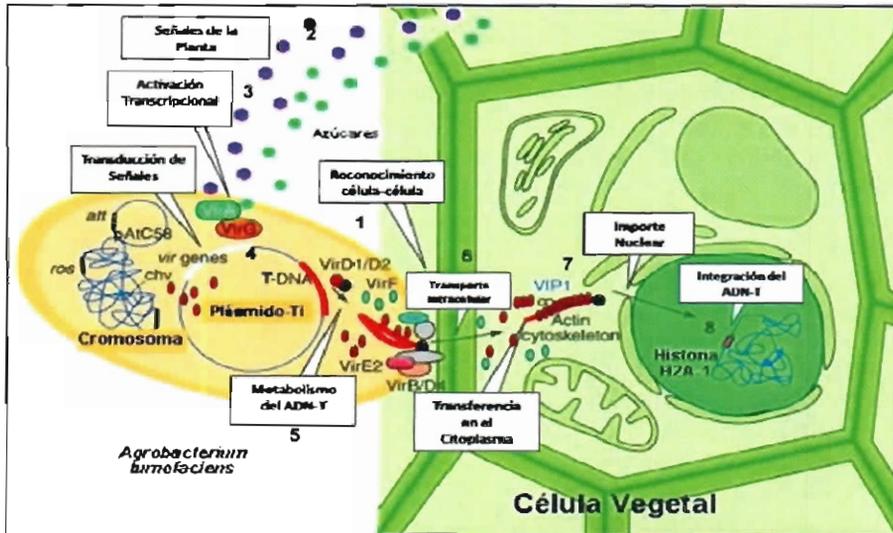


Figura 1.4. Modelo del proceso de transformación via *Agrobacterium tumefaciens*
Tomado y modificado de Gelvin, 2000.

La transferencia del ADN-T está mediada por los productos codificados por la región *vir* del plásmido Ti. Esta región está compuesta por al menos seis operones esenciales (*VIR A*, *VIR B*, *VIR C*, *VIR D*, *VIR E*, *VIR G*) y dos no esenciales (*VIR F*, *VIR H*) (De la Riva *et al.*, 1998). Por medio de la proteína *VIR A* se captan las señales moleculares secretadas por las células de la planta herida y ésta fosforila a *VIR G* estabilizándola para activar la expresión de otros genes virulentos y así iniciar el proceso de transporte del ADN-T. Esta activación se lleva a cabo por compuestos fenólicos como la acetosiringona (AS), 3,5-metoxi-4-hidroxiacetofenona o hidroxiacetorisiringona (OH-AS) (Sheng & Citovsky, 1996) y glucosa o galactosa en caso que la concentración de AS se encuentre baja o ausente.

La activación de los genes *VIR* también depende de factores externos como temperatura y pH, ya que a temperaturas mayores a 32 °C los genes *VIR* no se expresan debido a un cambio conformacional en *VIR A* lo que induce la inactivación de sus propiedades (Zupan *et al.*, 2000; De la Riva *et al.*, 1998).

La activación de los genes *vir* produce la generación de una cadena, copia de la cadena de ADN-T. Las proteínas VIR D1 y VIR D2 funcionan como una endonucleasa cortando en los sitios específicos, generando una cadena linear, copia de la región ADN-T de *Agrobacterium* designada cadena-T, la cadena cortada es removida y el espacio dejado en el plásmido (Ti) es reparado por la maquinaria de reparación del ADN del organismo (Sheng & Citovsky, 1996; De la Riva *et al.*, 1998).

El vehículo de transferencia al núcleo vegetal es un complejo ADN-T-Proteína, este debe ser traslocado al núcleo vegetal pasando a través de tres membranas, la pared celular y espacios celulares. De acuerdo al modelo más aceptado, el complejo ADN-T-VIR D2 es cubierto por la proteína VIR E2. Esta asociación previene el ataque de nucleasas y extiende el ADN-T reduciendo el diámetro del complejo haciendo la traslocación a través de los canales membranales más fácil; un modelo alternativo propone que la transferencia del complejo es una sola cadena de ADN unida covalentemente a su extremo 5' con VIR D2, pero no cubierta por VIR E2; El exporte independiente de VIR E2 a la célula vegetal está presente como un proceso natural y una vez que el complejo ADN-T-VIR D2 está dentro de la célula vegetal es cubierto por VIR E2 (Zupan *et al.*, 2000.).

El transporte intercelular de ADN requiere una vía directa entre el donador (bacteria) y la célula (planta), dicho transporte depende de energía la cual la proveen las proteínas VIR B4 y VIR B11, localizadas en la membrana interna bacteriana. El mecanismo molecular por el cual esta vía es formada y funciona es aún desconocido. Sin embargo es probable que el canal *Agrobacterium*-célula vegetal sea codificado por el locus *VIR B*. La síntesis de proteínas, estabiliza polipéptidos VIR B, que permiten formar un canal estructural multiprotéico. La proteína VIR D4, forma un canal entre el complejo-T transportado y el canal VIR B en la bacteria (Sheng & Citovsky, 1996; Zupan *et al.*, 2000).

Para transportar el complejo-T dentro del núcleo de la célula, *Agrobacterium* emplea una vía celular endógena la cual dirige la proteína VIR D2 y protege la VIR E2 que son las más importantes y probablemente VIR F que tiene una menor contribución en este proceso. El importe nuclear de proteínas requiere una señal de localización nuclear (NLS) por lo que el importe de VIR D2 a la célula es mediada por la NLS VIR D2.

La inserción dentro del genoma de la planta, debe ser mediada por proteínas transportadas desde la bacteria infectante y/o por la propia planta (De la Riva *et al.*, 1998; Sheng & Citovsky, 1996).

Las proteínas VIR D2 y VIR E2 asociadas a la cadena-T están implicadas en el proceso de integración, se ha sugerido que la integración antecede a la síntesis de una cadena secundaria, que sería formada por la maquinaria de reparación del DNA de la célula, siguiendo a la integración de la cadena-T; sin embargo, también se sugiere que la cadena-T es convertida dentro en una forma de doble cadena antes de la integración (Zupan *et al.*, 2000).

Ambos modelos proponen que la integración inicia en el borde izquierdo y que VIR D2 liga el extremo derecho del ADN-T al ADN genómico de la planta, completándose de esta manera el proceso de integración (Sheng & Citovsky, 1996)

1.3.8.1 BORDE IZQUIERDO Y DERECHO DEL T-ADN

Durante la infección, las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que contienen el plásmido Ti, transfieren dos fragmentos de ADN al núcleo de la planta. Esos fragmentos son designados T-ADN izquierdo y T-ADN derecho. Los segmentos correspondientes al plásmido Ti son llamados regiones T y son flanqueados por repeticiones de 25 pb conocidas como secuencias bordes; esos bordes son los únicos elementos cis necesarios para el procesamiento del T-ADN y cualquier segmento de ADN que se encuentre entre esos bordes será transferido a la planta. El borde izquierdo del T-ADN puede ser prescindible para la transferencia del T-ADN, pero el borde derecho es esencial y actúa de manera polar, sugiriendo que la transferencia puede iniciar en el borde derecho continuando hacia el borde izquierdo (Zhu *et al.*, 2000).

1.4 TRANSPORTE EN MEMBRANAS BIOLÓGICAS

En la biología celular se denomina transporte de membrana al conjunto de mecanismos que regulan el paso de solutos, como iones y pequeñas moléculas a través de membranas biológicas, esto es, bicapas lipídicas que poseen proteínas embebidas en ellas. Dicha propiedad se debe a la selectividad de membrana, una característica de las membranas biológicas que las faculta como agentes de separación específica de sustancias de distinta índole química; es decir, la posibilidad de permitir la permeabilidad de ciertas sustancias pero no de otras (Angeli *et al.*, 2007).

Los movimientos de casi todos los solutos a través de la membrana están mediados por proteínas transportadoras de membrana, selectivas y no selectivas en el transporte de moléculas concretas. Puesto que la diversidad y fisiología de las distintas células de un organismo está relacionada en buena medida con su capacidad de captar unos u otros elementos externos, se postula que debe existir un acervo de proteínas transportadoras específicas para cada tipo celular y para cada momento fisiológico determinado; dicha expresión diferencial se encuentra regulada mediante la transcripción diferencial de los genes codificantes para esas proteínas y su traducción, es decir, mediante los mecanismos genético-moleculares, pero también a nivel de la biología celular dichas proteínas pueden requerir de activación mediada por rutas de señalización celular, activación a nivel bioquímico o incluso, de localización en vesículas del citoplasma (Serrano & Rodríguez, 2002).

Termodinámicamente, el flujo de sustancias de un compartimento a otro puede realizarse a favor o en contra de un gradiente, ya sea de concentración o electroquímico. Si el intercambio de sustancias se realiza a favor del gradiente, esto es, en el sentido de los potenciales decrecientes, el requerimiento de energía externa al sistema es nulo; si en cambio el transporte se hace en contra del gradiente, se requiere el aporte de energía.

Puesto que son pocas las moléculas que son capaces de difundir a través de una membrana lipídica, la mayoría de los procesos de transporte involucran a proteínas de transporte. Se trata de proteínas transmembranales que poseen multitud de hélices alfa inmersas en la matriz lipídica o bien, al menos en bacterias, beta láminas. Dicha estructura probablemente implique una vía de entrada a través de ambientes hidrofílicos proteicos que causarían una disrupción en el medio altamente hidrofóbico constituido por los lípidos. Las proteínas intervienen de diversas formas en el transporte: actúan tanto como bombas impulsadas por ATP, esto es, por energía metabólica, o como canales de difusión facilitada (Angeli *et al.*, 2007).

1.4.1 TIPOS DE TRANSPORTE A TRAVÉS DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

En el transporte a través de las membranas, se distinguen los siguientes tipos de transporte:

1) **Transporte pasivo**. Se trata de un transporte a favor del gradiente de concentración, por lo que no requiere un aporte de energía; entre ellos se encuentran: A) **Transporte pasivo simple** o difusión de

moléculas a favor del gradiente. A1) **Difusión a través de la bicapa lipídica**. Pasan así sustancias lipídicas como las hormonas esteroideas, los fármacos liposolubles y los anestésicos, como el éter. También sustancias apolares como el oxígeno y el nitrógeno atmosférico y algunas moléculas polares muy pequeñas como el CO₂, el etanol y la glicerina. A2) **Difusión a través de canales protéicos**. Se realiza a través de proteínas canal, proteínas que forman poros acuosos en la doble capa lipídica. Pasan así ciertos iones, como el Na⁺, el K⁺ y el Ca⁺⁺. B) **Transporte pasivo facilitado (difusión facilitada)**. Las moléculas hidrófilas (glúcidos, aminoácidos) no pueden atravesar la doble capa lipídica por difusión a favor del gradiente de concentración, por lo que determinadas proteínas de la membrana, llamadas permeasas, actúan como "barcas" para que estas sustancias puedan salvar el obstáculo que supone la doble capa lipídica. Este tipo de transporte no requiere un consumo de energía, pues se realiza a favor del gradiente de concentración (Serrano & Rodríguez, 2002).

II) **Transporte activo**: En él se efectúa un transporte en contra del gradiente de concentración o del electroquímico y para ello las proteínas transportadoras implicadas consumen energía metabólica (adenosín trifosfato, ATP ó pirofosfato, PPI). La hidrólisis del compuesto que actúa como moneda energética puede ser muy evidente, como en el caso de los transportadores que son ATPasas o PPasa, o puede tener un origen indirecto: por ejemplo, los cotransportadores emplean gradientes de determinados solutos para impulsar el transporte de un determinado compuesto en contra de su gradiente, a costa de la disipación del primer gradiente mencionado; pudiera parecer que en este caso no interviene un gasto energético, pero no es así, ya que el establecimiento del gradiente de la sustancia transportada adyacente al compuesto objetivo ha requerido de la hidrólisis de ATP o PPI en su generación mediante unos determinados tipos de proteínas denominados bombas. Por ello, se define transporte activo primario como aquél que hidroliza ATP o PPI de forma directa para transportar el compuesto en cuestión, y transporte activo secundario como aquél que utiliza la energía almacenada en un gradiente electroquímico (Neuhaus, 2007; Serrano & Rodríguez, 2002).

1.4.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS TRANSPORTADORES DE MEMBRANA EN PLANTAS

El soluto y el transporte de iones a través de las membranas celulares son dependientes metabólicamente de las bombas de protones que generan un gradiente de potencial electroquímico a través de las membranas celulares (Angeli *et al.*, 2007).

Existen bombas electrogénicas de protones, la ATPasa (presente en membrana plasmática, cloroplastos, mitocondrias y tonoplasto) y PPI-asa (tonoplasto únicamente), que mediante la hidrólisis de sustratos transportan protones fuera del citosol, lo que establece un gradiente significativo eléctrico a través de la membrana, así como un gradiente de pH (Neuhaus, 2007). Estos dos gradientes constituyen el potencial electroquímico o fuerza motriz de protones a través de la membrana, dicha fuerza motriz de protones se utiliza en procesos de transporte secundario para manejar el transporte de muchos otros iones y solutos en contra de su gradiente electroquímico (Serrano & Rodriguez, 2002).

1.4.3 LAS PIROFOSFATASAS

Las enzimas encargadas de hidrolizar el pirofosfato celular, generando así Pi, se denominan pirofosfatasa inorgánicas y pueden dividirse en dos grandes grupos en función de su estructura y actividad catalítica: pirofosfatasa solubles y pirofosfatasa de membranas traslocadoras de protones. Ambas se clasifican como EC3.6.1.1, a pesar de no ser enzimas homólogas, aunque poseen motivos similares en las secuencias de aminoácidos correspondientes al sitio catalítico (Rea & Poole, 1993). Se ha discutido la necesidad de que sean identificadas como proteínas con actividades catalíticas distintas (Maeshima, 2000, Serrano, 2001).

1.4.3.1 PIROFOSFATASAS SOLUBLES

Las Pirofosfatasa (sPPasas) solubles catalizan eficientemente la hidrólisis de PPI liberando calor. Debido a la necesidad de hidrolizar el PPI producido en las reacciones anabólicas, con el fin de desplazar dichas reacciones y reciclar la reserva de Pi intracelular, las sPPasas son enzimas obicuas, presentes en todos los organismos vivos conocidos (Kukko-Kalse & Heinonen, 1985; Chen *et al.*, 1990). Así, estas enzimas se han identificado en organismos procarióticos, en orgánulos celulares de diversos eucariotes y en el citosol de las células de hongos. Algunas de estas sPPasas poseen un dominio que les permite anclarse a la membrana interna de los orgánulos en que se encuentran (Baykov *et al.*, 1999; Lundin *et al.*, 1992). Existen dos grandes familias de sPPasas (Cooperman *et al.*, 1992; Shintani *et al.*, 1998). La familia I abarca la mayoría de las sPPasas conocidas y poseen el motivo que las define (DXDPXD); estas enzimas tienen un sitio activo estructuralmente muy conservado (Cooperman *et al.*,

1992) y se encuentran en organismos procariotas como bacterias y arqueas, tejidos fotosintéticos y no fotosintéticos de plantas y en el citosol de animales y hongos. Curiosamente, las de tejidos no fotosintéticos de plantas presentan más similitud con las bacterias que con las de otros organismos eucarióticos. Las enzimas de la familia I presentan un pH óptimo alcalino, entre 8 y 9, son dependientes de un complejo MgPPi como cofactor y presentan una especificidad absoluta por PPi (Salminen *et al.*, 1995). Una excepción son las enzimas del protozoo parásito *Leishmania major*, recientemente descritas como unas sPPasas primitivas de la familia I y las únicas Ca²⁺-dependientes (Gómez-García *et al.*, 2004). Una segunda familia II de sPPasas han sido recientemente reportadas en *Bacillus subtilis* así como las sPPasas de algunas bacterias gram positivas y arqueas. Las sPPasas de *B. subtilis* se activa con Mn²⁺ y Co²⁺, pero no con Mg²⁺, Ca²⁺, Sr²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ o Ni²⁺. Las dos familias no presentan una relación evidente, ni en su estructura ni en su secuencia de aminoácidos, pero la disposición espacial de los 13 residuos catalíticos esenciales para la sPPasa de la familia I se encuentra conservada en las enzimas de la familia II (Gómez-García *et al.*, 2001).

1.4.3.2 PIROFOSFATASAS DE MEMBRANA TRASLOCADORAS DE PROTONES

Diversas investigaciones han demostrado que en plantas, bacterias y protistas muy diversos, el PPi puede usarse en muchas reacciones en lugar del ATP. En estos organismos se ha encontrado una PPasa traslocadora de protones (H⁺-PPasas o V-PPasas cuando se localizan en el tonoplasto), una proteína integral de membrana no relacionada directamente con la sPPasa, capaz de aprovechar la energía del enlace PPi para la bioenergética celular acoplando la hidrólisis de este metabolito a la generación de un gradiente electroquímico de protones a través de la membrana en la que se encuentran (Drozdowicz & Rea, 2001; Baltscheffsky *et al.*, 1999; García-Donas *et al.*, 1998; Rea & Poole, 1993). Estas proteínas se describieron por primera vez en los cromatóforos de la bacteria fotosintética *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky, 1967) y posteriormente fueron identificadas actividades de hidrólisis de PPi en el tonoplasto de diversas células vegetales. Hasta el momento, se han descrito H⁺-PPasas en diferentes grupos de eubacterias y arqueas, plantas y diversos protistas fotosintéticos y no fotosintéticos, pero no se han encontrado en membranas de células animales o de hongos, aunque sí en protistas parásitos (Rea & Poole, 1993; Maeshima *et al.*, 1996; Baltscheffsky *et al.*, 1999; Maeshima 2000; Pérez *et al.*, 2002; McIntosh & Vaidya, 2002). Todas la H⁺-PPasas conocidas presentan actividad de hidrólisis de PPi *in vitro*; consisten en un

polipéptido 63 a 80 kDa, su perfil hidrofóbico demuestra que poseen entre 14 y 16 segmentos transmembranales, utilizando como sustrato un complejo de MgPPI (Baykov *et al.*, 1993). Todas ellas contienen entre 761 y 771 aminoácidos y sus masas moleculares calculadas están en torno a 79841 y 80800 Da (Maeshima, 2000). Según requieran o no potasio para desarrollar su actividad máxima, pueden dividirse en dos grupos: independientes de K⁺ y dependientes de K⁺ (Drozdowicz *et al.*, 2000).

Las H⁺-PPasas de organismos fotosintéticos más estudiadas han sido, por su posible interés agrobiológico, las de plantas. La actividad PPasa asociada a membrana se describió por primera vez en plantas en los años 70 y en la década de los 80 se describió su asociación con la membrana vacuolar o tonoplasto (Rea & Poole, 1985; Chanson *et al.*, 1985). Aunque la mayor parte de las H⁺-PPasas de plantas descritas se han hallado asociadas al tonoplasto (Maeshima, 2000), se han descubierto también asociadas a membranas del Aparato de Golgi (Chanson & Pilet, 1987; Mitsuda *et al.*, 2001) y la membrana plasmática (Petel & Gendraud 1989; Williams *et al.*, 1990; Robinson *et al.*, 1996; Langhans *et al.*, 2001).

Diversos autores han demostrado que las V-PPasas comparten el espacio en el tonoplasto con la otra bomba de protones de la vacuola, la V-H⁺-ATPasa (EC 3.6.1.3), que utiliza la hidrólisis del ATP como fuente de energía para la acidificación vacuolar. Ambas contribuyen a generar la acidificación del compartimento vacuolar y en la mayor parte de los casos, el gradiente de pH producido por ellas no es aditivo (Rea & Poole, 1993). En frutos de *Vitis vinifera*, sin embargo, la acidificación de la vacuola por acción simultánea de ambas bombas de protones es mayor que la producida por cada una de ellas por separado (Terrier *et al.*, 1998). En general, no parecer existir ningún tipo de interacción directa entre las dos bombas de protones vacuolares; sin embargo, en *Kalanchoe blossfeldiana*, Fischer *et al.*, (1997) observaron que el transporte de protones por parte de la V-H⁺-ATPasa en membranas vacuolares aisladas de esta planta era estimulado cuando dichas vesículas eran pre-energizadas mediante la actividad de una V-PPasa. Este efecto no era recíproco: la pre-energización de las vesículas mediante el bombeo de protón de la V-H⁺-ATPasa no ejercía ningún efecto sobre la actividad V-PPasa. De este modo, los autores propusieron que la V-PPasa modula la acción de la V-H⁺-ATPasa, posiblemente mediante la interacción de la primera con la subunidad A de la ATPasa. También se ha demostrado en membranas de *Hacer pseudoplatanus* que la inhibición específica de la V-H⁺-ATPasa produce un efecto negativo sobre la actividad de la V-PPasa, lo que parece indicar la existencia de algún tipo de interacción entre ambas (Fraichard *et al.*, 1994).

La localización celular y expresión diferencial en distintos tejidos de las diferentes isoformas de la H⁺-PPasa, ha sido estudiada en distintas plantas. El caso mejor investigado es el de las dos isoformas clonadas hasta el momento en *Arabidopsis thaliana* (*AVP1*, dependiente de potasio, y *AVP2*, independiente de potasio), aunque se ha sugerido la posibilidad de la existencia de una tercera isoforma potasio-independiente (*AVP3*) (Zancani *et al.*, 2006, Drozdowicz *et al.*, 2000). Ambas isoformas parecen expresarse de igual modo en raíces, tallos y hojas, pero mientras que para *AVP1* se ha sugerido un papel específico en polen, *AVP2* no parece estar presente en este tejido (Mitsuda *et al.*, 2001). Además, *AVP1* se ha descrito asociada al tonoplasto celular (Rea *et al.*, 1992), mientras que *AVP2* se encuentra localizada en el Golgi, según experimentos de inmunolocalización con partículas de oro (Mitsuda *et al.*, 2001). Para tabaco, Lerchl *et al.*, (1995) encontraron patrones de expresión diferenciados para cada una de las tres isoformas distintas identificadas, todas ellas dependientes de potasio, en tejidos y órganos como el parénquima fotosintético, nervios foliares, tallos, raíces, sépalos y pétalos. Para *Beta vulgaris*, se han identificado dos isoformas distintas, *BVP1* y *BVP2* (Kim *et al.*, 1994). El análisis de northern blot en hojas y raíces indicó que *BVP2* está presente casi exclusivamente en la raíz, mientras que *bvp1* se expresa en ambos órganos. También se ha demostrado que las dos isoformas identificadas hasta el momento en arroz (*OVP1* y *OVP2*) presentan diferentes patrones de expresión en callos y plántulas, de modo que el transcrito de *OVP2* parece acumularse en mayor proporción en callos, mientras que *OVP1* se expresa con igual intensidad en callos, tallos y raíces de plántulas (Sakakibara *et al.*, 1996).

Hasta el momento no existe ninguna información clara sobre los factores que regulan la expresión de las distintas isoformas, pero la idea generalizada es que dicha expresión estaría regulada de acuerdo a las demandas de la célula con respecto al transporte de iones y metabolitos y la acidificación de la vacuola y también por las necesidades de hidrólisis del PPI citosólico (Maeshima, 2000).

1.4.3.3 FUNCIÓN FISIOLÓGICA, REGULACIÓN DE LA V-PPASA E IMPLICACIONES EN LA RESPUESTA A ESTRÉS

La mayor parte de la actividad de sPPasa en las células fotosintéticas se encuentran localizada en los plástidos y no parece existir ninguna actividad sPPasa citosólica en este tipo de tejido. De este modo, una función fisiológica clave propuesta para la V-PPasa ha sido la hidrólisis del PPI citosólico con el fin de desplazar el equilibrio de las reacciones

anabólicas celulares (Rea *et al.*, 1992; Rea & Poole, 1993; Maeshima, 2000). La implicación de esta bomba de protones en el desarrollo de la planta parece clara, ya que diversos autores han demostrado la existencia de una mayor actividad V-PPasa en tejidos jóvenes en crecimiento que en tejidos maduros (Chanson & Pilet, 1987; Maeshima, 1990; Shirakate *et al.*, 1997). Los niveles de actividad disminuyen a lo largo del desarrollo, mientras que la actividad y la cantidad de proteína permanecen prácticamente constantes para la V-H⁺-ATPasa. De este modo, se propuso que la V-PPasa sería la enzima responsable de la hidrólisis de las grandes cantidades de PPI producidas durante el metabolismo celular en los tejidos jóvenes, siendo por tanto la enzima más importante para la acidificación vacuolar en las primeras etapas del desarrollo de la planta (Chanson & Pilet, 1987; Matsumoto & Chung, 1988; Maeshima 2000; Gaxiola *et al.*, 2002). De este modo, la energía contenida en el enlace pirofosfato puede reciclarse mediante el intenso bombeo de protones a la vacuola, necesario en tejidos en crecimiento para la expansión vacuolar. Aunque ambas enzimas permanecen activas en los tejidos maduros, la V-H⁺-ATPasa pasa a ser en estos tejidos la principal bomba de protones de la vacuola (Chanson *et al.*, 1985). Algunos autores han sugerido también la posibilidad de que en los tejidos maduros, en que el ritmo metabólico y en consecuencia los niveles de PPI son bajos, la V-PPasa podría estar sintetizando PPI a expensas del gradiente de protones generando a través del tonoplasto por la V-H⁺-ATPasa, manteniendo, de este modo, la concentración de PPI citosólico en los niveles óptimos para el funcionamiento de enzimas dependientes de dicho sustrato. El bajo nivel metabólico celular y la baja producción de PPI asociado se ha usado también como argumento para justificar la disminución en actividad V-PPasa en la planta *Mesembryanthemum crystallinum* tras la inducción del metabolismo CAM, tanto por envejecimiento como por NaCl (Bremberger & Lüttge, 1992).

Sin embargo, Smart *et al.*, (1998) encontraron un comportamiento diferente para la enzima durante el desarrollo de las fibras de algodón. La síntesis de estas fibras comienza con una etapa de rápida expansión celular, seguida de la deposición de una pared celular secundaria y por último, de una etapa de maduración. Tanto la V-PPasa como la V-H⁺-ATPasa parecen participar en la acidificación vacuolar en la primera etapa; el transcrito de la V-PPasa parece estar expresado de forma constitutiva, de modo que los autores proponen que ésta última proteína estaría implicada en la formación de la pared celular secundaria. Marsh *et al.*, (2001) propusieron que la V-H⁺-ATPasa y no la V-PPasa es la enzima responsable de la acidificación vacuolar en frutos cítricos en proceso de maduración. En este caso, se propone que el papel de la V-PPasa es conservar energía mediante la síntesis de PPI durante la acidificación de dichos frutos. Además, al contrario de lo observado para *M. crystallinum*, en *Kalanchoë*

diagremontiana, la V-PPasa parece estar involucrada en la energetización de la vacuola para el transporte de malato al interior de la misma en el estado CAM (Smith *et al.*, 1984).

Los estreses salino y osmótico han sido ampliamente estudiados debido a su interés desde el punto de vista agrobiológico. Se ha observado una activación de la V-PPasa por NaCl en cultivos celulares de *Daucus carota* (Colombo & Cerana, 1993), en células adaptadas de *Hacer pseudoplatanus* (Zingarelli *et al.*, 1994) y en raíces de *Tithonia rotundifolia* (Ballesteros *et al.*, 1996). En plantas halofíticas, se ha medido una mayor actividad de bombeo de protones asociada a hidrólisis de PPI en hojas de *Saueda salsa* (Wang *et al.*, 2001) y en raíces de *Salicornia bigelovii* (Parks *et al.*, 2002) cultivadas con altas concentraciones de sal, con respecto a las cultivadas en baja sal. Sin embargo, también existen datos que demuestran una inhibición de la V-PPasa bajo condiciones de estrés salino en raíces de *Vigna radiata* (Nakamura *et al.*, 1992), *Secale cereale* (Matsumoto & Chung, 1988) y *Triticum aestivum* (Wang *et al.*, 2000), hipocótilos de *Vigna unguiculata* (Otoch *et al.*, 2001) y en hojas de *M. crystallinum* (Rockel *et al.*, 1994). También se ha descrito la ausencia de efectos de este tipo de estrés en la planta halofítica de *S. maritima* (Leach *et al.*, 1990) y en cultivos de *Nicotiana tabacum* (Reuveni *et al.*, 1990). Algunos autores han sugerido la posibilidad de que estas diferencias en la respuesta de la V-PPasa pueden deberse a diferencias en las condiciones experimentales (Colombo & Cerana, 1993), aunque no es descartable que las respuestas sean específicas del tipo de planta y no puedan, por tanto, generalizarse (Wang *et al.*, 2001). En la mayor parte de los casos no parece existir ningún efecto del Polietilenglicol o el sorbitol en la actividad V-PPasa, por lo que la regulación por sal no parece deberse a un efecto osmótico, sino a un efecto iónico *per se*. La sobreexpresión de *AVP1* en el mutante *ena* de *Saccharomyces cerevisiae*, que carece del antiportador Na^+/H^+ de la membrana plasmática, ha permitido obtener mutantes que presentan tolerancia a la salinidad en los que se demostró una acumulación de Na^+ en la vacuola (Gaxiola *et al.*, 1999). La sobreexpresión de la misma proteína en *Arabidopsis thaliana* permitió obtener plantas tolerantes a la salinidad. Al poseer un mayor contenido iónico vacuolar, estas plantas eran capaces de acumular una mayor cantidad de agua para compensar el efecto osmótico, lo que les confirió además una mayor tolerancia a la sequía (Gaxiola *et al.*, 2001).

También se ha estudiado la regulación de la V-PPasa en presencia de otros iones como el K^+ , NO_3^- , Ca^{2+} y el Cl^- en raíces de centeno (Kasai *et al.*, 1998, 1993). En este tejido, se encontró para el caso de K^+ , NO_3^- y Ca^{2+} que tanto la actividad de PPI, como la actividad de bomba de protones en plantas bajo condiciones deficientes de minerales fue tres veces mayor que

la actividad en plantas crecidas bajo condiciones normales; para el caso de K^+ y Cl^- se produjo un importante descenso en la actividad de hidrólisis de PPI por tratamiento con K^+ , mientras que el tratamiento con Cl^- produjo un aumento de dicha actividad. En los pelos radicales de *Limnobium stoloniferum*, se había demostrado que el tratamiento con potasio provoca alcalinización citoplásmica, mientras que el Cl^- produce una acidificación (Ullrich & Novacky, 1990). Basándose en estas pruebas, los autores propusieron que las variaciones de la actividad de V-PPasa en las raíces de *Secale cereale* están asociadas a cambios en el pH citoplásmico y no directamente a la presencia de los iones. Este tipo de regulación debida al pH citoplásmico se había propuesto anteriormente para explicar la activación de la V-PPasa en plántulas de *Secale cereale* sometidas a estrés por aluminio, en las que la presencia de este ion en el citoplasma produciría una acidificación del mismo (Kasai *et al.*, 1992).

1.5 OBJETIVOS

1.5.1 OBJETIVO GENERAL

- Obtener plántulas transgénicas de caféto cultivadas *in vitro* con la integración del gen *avp1* de *Arabidopsis thaliana*.

1.5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Transformar e inducir la embriogénesis somática en explantes foliares con una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* por infiltración al vacío que integre el gen *avp1*.
- Germinar y obtener plántulas transformadas con el gen *avp1*.
- Analizar mediante técnicas moleculares la integración del gen *avp1*

1.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuna J. and M. de Pena. (1991). Plant regeneration from protoplasts of embryogenic cell suspensions of *Coffea arabica* L. cv. Caturra. Plant Cell Rep. 10:345-348.
- Altieri M. (2000).
http://www.cnr.berkeley.edu/~agroeco3/the_ecological_impacts.html
- An, G. (1995). Binary Ti Plasmid Vectors. In: Gartland, K.M.A. and M.R. Davey (Eds.). *Agrobacterium Protocols: Methods in Molecular Biology*. Vol. 44. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Pp. 47-58.
- Angeli A; T. Sebastien, J. Frachisse, G. Ephritikhine, F. Gambale, H. Barbier-Brygoo. (2007). Anion channels and transporters in plant cell membranes. FEBS Letters 581:2367-2374.
- Ballesteros E; J.P. Donaire and A. Belver. (1996). Effects of salt stress on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activities of tonoplast-enriched vesicles isolated from sunflower roots. *Physiol Plant* 97:259-268.
- Baltscheffsky M. (1967). Inorganic pyrophosphate and ATP as energy donors in chromatophores from *Rhodospirillum rubrum*. *Nature* 216:241-243.
- Baltscheffsky M; A. Schultz and H. Baltscheffsky. (1999). H⁺-proton-pumping inorganic pyrophosphatase: a tightly membrane-bound family. *FEBS Letters* 452:121-127.
- Baykov A.A; E. Dubnova, N. Bakuleva, O. Evtushenko, R. Zhen and P. Rea. (1993). Differential sensitivity of membrane-associated pyrophosphatases to inhibition by diphosphonates and fluoride delineates two classes of enzyme. *FEBS Lett* 327:199-202.
- Bremberger C. y U. Lüttge. (1992). Dynamics of tonoplast proton pumps and other tonoplast proteins of *Mesembryanthemum crystallinum* L. during the induction of Crassulacean Acid Metabolism. *Planta* 188:575-580.

- Canché-Moo R; A. Kú-González, C. Burgeff, V. Loyola-Vargas, L. Rodríguez-Zapata and E. Castaño. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84(3):373-377.
- Carneiro M. (1997). *Coffee* biotechnology and its applications in genetic transformation. *Euphytica* 96: 167-172.
- Carneiro M. (1999). Advances in *Coffe* Biotechnology. *AgBiotechnet* 1:1-7.
- Castillo-Ponce G; A. Contreras-Jiménez, C. A. Zamarripa, I. Méndez-López, M. Vásquez-Ramírez, F. Holguín-Meléndez y A. Fernández-Rodríguez. (1997). Tecnología para la producción de café en México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias INIFAP, México D. F. Folleto técnico número 8.
- Chanson A; J. Fichmann, D. Spear and L. Taiz. (1985). Pyrophosphate-driven proton transport by microsomal membranes of corn coleoptiles. *Plant physiol* 79:159-164.
- Chanson A and P. Pilet. (1987) Localization in sucrose gradients of the pyrophosphate-dependent proton transport of maize root membranes. *Plant physiol* 84:1431-1436.
- Charity J. A; L. Holland, S. Donaldson, L. Grace and C. Walter. (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Pinus radiata* organogenic tissue using vacuum infiltration. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 70:51-60.
- Chen J; A. Brevet, M. Fromant, F. Lévêque, J. Schmiter, S. Blanquet and P. Plateau. (1990). Pyrophosphatase is essential for growth of *Escherichia coli*. *Journal of bacterial* 172:5686-5689.
- Colombo R and R; Cerana. (1993) Enhanced activity of tonoplast pyrophosphatases in NaCl-grown cell of *Daucus carota*. *J Plant Physiol* 142:226-229.
- Cooperman B; A. Baykov and R. Lahti. (1992). Evolutionary conservation of the active site of soluble inorganic pyrophosphatase. *Trends Biochem Sci* 17:262-266.
- Eira M. T; E.A. Amaral da Silva, R. Castro, S. Dussert, C. Walters, J. D. Bewley and H. W. Hilhorst. (2006). Coffee seed physiology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1)149-163.

- De los Santos-Briones C. and Hernández-Sotomayor T. (2006). Coffee biotechnology. *Braz. J. Plant Physiol.* 18(1):217-227.
- Da Silva E; P. Toorop, A. Van Aelst, H. Hilhorst. (2004) Abscisic acid controls embryo growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea Arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta* 220:251-261.
- De la Riva, G.A., J. González-Cabrera, R. Vazquez-Padrón, and C. Ayra-Pardo. (1998). *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. *Electronic Journal of Biotechnology* 1(3):1-16.
- Dedecca D. (1957). Anatomia e desenvolvimento ontogenético de *Coffea arabica* L. var. *Typica* Cramer. *Bragantia* 16:315-355.
- Dessaux Y; A. Petit and J. Tempe. (1993). Chemistry and biochemistry of opines, chemical mediators of parasitism. *Phytochemistry*: 34(1)31-38.
- Drozdowicz Y. J. Kissinger and P. Rea. (2000). AVP2, a sequence-divergent, K⁺-insensitive H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from *Arabidopsis*. *Plant physiol* 123:353-362.
- Drozdowicz Y. and P.A. Rea. (2001). Vacuolar H⁺-pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *TRENDS in Plant Science* 6(5):206-211.
- Dublin P. (1981). Embryogénese somatique directe sur fragments de feuilles de caféier *Arabucta*. *Café Cacao Thé.* 25:237-242.
- Fernández-Da Silva R. and A. Menéndez. (2003). Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes gus and bar. *Elect J Biotechnology* 6:29-38.
- Fisher E; J. Mariaux and U. Lüttge. (1997). Stimulation of H⁺-transport activity of vacuolar H⁺-ATPase by activation of H⁺-PPase of *Kalachoë blossfeldiana*. *Bio Plant* 39:169-177.
- Fisk, H.J. and Dandekar, A.M. (1993). The introduction and expression of transgenes in plants. *Scientia Horticulturae* 55:5-36.

- Fraichard A; C. Trossat, T. Magnin and A. Pugin. (1994). Influence of ATPase activity on PPI dependent H⁺-transport in tonoplast vesicles of *Acer pseudoplatanus*. *Plant Sci* 100:129-138.
- García-Donas I; J. Pérez, P. Rea, Y. Drozdowicz, M. Baltscheffsky, M. Losada and A. Serrano. (1998). Evidence for the widespread distribution of membrane-bound inorganic pyrophosphatases among photosynthetic prokaryotes. *In: G. Garab (Ed), Photosynthesis: Mechanisms and effects*. Kluwer Academic publishers, Dordrecht, 5th Edition. Pp. 3679-3682.
- Gaxiola R; R. Rao, A. Sherman, P. Grisafi, S. Alper and G. Fink. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and AVP1, can function in cation detoxification in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1480-1485.
- Gaxiola R; J. Li, S. Undurraga, L. Dang, G. Allen, S. Alper and G. Fink. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *PNAS*. 98(20):11444-11449.
- Gaxiola R; G. Fink and K. Hirschi. (2002). Genetic manipulation of vacuolar proton pumps and transporters. *Plant Physiology*. 129:967-973.
- Gómez-García M; M. Losada and A. Serrano. (2001). On the chimeric nature of the soluble pyrophosphatases set from photosynthetic eukaryotes. *In: A. Serrano (Ed), New Trends in Inorganic Pyrophosphatases Research*. Proceedings of the second International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases. Pp 63-66.
- Gómez-García M; L. Ruiz, D. González and A. Serrano. (2004). A novel calcium-dependent soluble inorganic pyrophosphatase from the trypanosomatid *Leishmania major*. *FEBS Lett* 560:158-166.
- Gelvin Stanton. (2000). Agrobacterium and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51:223–56.
- Gelvin S. and Y. Lee. (2008). T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiology* 146:325-332.
- Guerineau, F. (1995). Tools for Expressing Foreign Genes in Plants. *In: H. Jones (Ed.). Plant Gene Transfer and Expression Protocols*. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Vol. 49. Pp. 1-32.

- Halperin W. (1995). *In vitro* embryogenesis: some historical issues and unresolved problems, *In: Thorpe T. (Ed.). In vitro Embryogenesis in plants*. Kluwer, Dordrecht. Pp. 1-16.
- Hansen, G. and Wright, M.S. (1999). Recent advances in the transformation of plants. *Trends in plant science*. 4(6):226- 23.
- Hatanaka T; Y. Choi, T. Kusano and H. Sano. (1999). Transgenic plants of Coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*. 19:106-110.
- Heldt, H. W. (2005). Gene technology makes it possible to alter plants to meet. *In: Plant Biochemistry and Molecular Biology*. Oxford University Press. New York. Pp. 277-288.
- Hellens, R. and P. Mullineaux. (2000). A guide to *Agrobacterium* Binary Ti Vectors. *Trends in Plant Science*. 5(10):446-451.
- Herman E. B. and G. J. Haas. (1975). Clonal propagation of *Coffea Arabica* L. from callus culture. *Hort Science*. 10:588-589.
- Herrera-Estrella, L. and J Simpson. (1988). Foreign Gene Expresión Plants. *In: Shaw, C.H. (Ed.). Plant molecular biology: a practical approach*. IRL Press Limited Oxford, England. Pp. 131-160.
- Holsters M.; J. P Hernalsteens; M Van Montagu and J Schell. (1982). Ti Plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*: The Nature of the TIP. *In: G. Kahl and J. S. Schell (Eds.). Molecular Biology of Plant Tumors*. Academic Press, Inc. New York. Pp.269-292.
- Hooykaas P. and A. Beijersbergen. (1994). The virulence system of *Agrobacterium tumefaciens*. *Annual Rev. Phytopatology* 32:157-79.
- Jenes B; H Moore; J Cao; W Zhang, and R Wu. (1993). Techniques for Gene Transfer. *In: Shain-dow Kung and Ray Wu (Eds.). Transgenic Plants*. Academic Press, Inc. San Diego, California. Pp.125-146.
- Judd, W; C. Camphell, E. Kellogg, P. Stevens and M. Donghue. (2002). *Plant Systematics a phylogenetic approach*. 2ª Edición. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Massachussets, USA. Pp.297-468.

- Kasai M; M. Sasaki, Y. Yamamoto and H. Matsumoto. (1992). Aluminum stress increases K^+ efflux and activities of ATP- and P_i dependent H^+ pumps of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant cell physiol* 33:1035-1039.
- Kasai M; M. Sasaki, Y. Yamamoto and H. Matsumoto. (1993). In vivo treatments that modulate P_i-dependent H^+ transport activity of tonoplast-enriched membrane vesicles from barley roots. *Plant cell physiol* 34:549-555.
- Kasai M; N. Nakamura; N. Kudo, H. Soto, M. Maeshima and S. Sawada. (1998). The activity of root vacuolar H^+ -pyrophosphatase *In: Rye* (Ed.). Plants grown under conditions deficient in mineral nutrients. *Plant Cell Physiology*. 39:890-894.
- Kawahara R. and A. Komamine. (1995). Molecular aspects of somatic embryogenesis. *In: Bajaj Y. P. S. (Ed.). Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*. Springer-Verlag, Berlin. Vol. 30. Pp.30-40.
- Kim E; R. Zhen and P. Rea. (1994). Heterologous expression of plant vacuolar pyrophosphatase in yeast demonstrates sufficiency of the substrate-binding unit for proton transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:6128-6132.
- Kukko E. and J. Heinonen. (1985). Inorganic pyrophosphate and inorganic pyrophosphatase in *Escherichia coli*. *Int J Biochem* 17:575-580.
- Kunik T; T. TZfira, Y. Kapulnik, Y. Gafni, C. Dingwall and V. Citovsky. (2001). Genetic transformation of HeLa cell by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 Pp.1871-1876.
- Langhans M; R. Ratajczak, M. Lützelshwab, W. Michalke, R. Wächter, E. Fischer and C. Ullrich. (2001). Immunolocalization of plasma membrane H^+ -ATPase and tonoplast-type pyrophosphatase in the plasma membrane of the sieve element-companion cell complex in the stem of *Ricinus communis* L. *Planta* 213:11-19.
- Leach R; W. Rogers, K. Wheeler, T. Flowers and A. Yeo. (1990). Molecular markers for ion compartmentation in cell of higher plants. *J. Exp* 41:1079-1087.

- Lerchl J; S. Köning, R. Zrenner and U. Sonnewald. (1995). Molecular cloning, characterization and expression analysis of isoforms encoding tonoplas-bound proton-translocating inorganic pyrophosphatase in tobacco. *Plant Mol Biol* 29:833-840.
- Lewin B. (2001). Rearrangement of DNA. *In: Genes*. Oxford University Press, Inc. New York. 7th Edition. Pp. 524-530.
- Lodish H; D Baltimore; A Berk; S. L Zipursky; P Matsudaira and J Darnell. (1995). Molecular Genetic Techniques and Genomics. *In: Molecular Cell Biology*. Scientific American Books. New York. 3th Edition. Pp. 363-365.
- Lundin M; S. Deopujari, L. Lichko, L. da Silva and H. Baltscheffky. (1992). Characterization of a mitochondrial inorganic pyrophosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1098:217-223.
- Maeshima M. (1990). Development of vacuolar membranes during elongation of cells in Mung vean hypocotyls. *Plant Cell Physiol* 31:311-317.
- Maeshima M; Y. Nakanishi, Ch. Matsuura-Endo and Y. Tanaka. (1996). Proton Pumps of the Vacuolar Membrane in Growing Plant Cells. *J. Plant Res.* 109: 119-125.
- Maeshima M. (2000). Vacuolar H⁺-Pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1465:37-51.
- Marsh K; P. González and E. Echeverría. (2001). Partial characterization of H⁺-translocating inorganic pyrophosphatase from 3 citrus varieties differing in vacular pH. *Physiol Plant* 111:519-526.
- Matsumoto H. and C. Chung. (1988). Increase in proton-transport activity of tonoplast vesicles as an adaptative response of barley roots to NaCl stress. *Plant Cell Physiol.* 29:1133-1140.
- McIntosh M. and A. Vaidya. (2002). Vacuolar type H⁺ pumping pyrophosphatases of parasitic protozoa. *Int J Parasitol.* 31:1343-1353.
- Mitsuda N; K. Takeyasu and M. Sato. (2001). Pollen-specific regulation of vacuolar H⁺-PPase expression by multiple cis-acting elements. *Plant Mol Biol.* 46:185-192.

- Nagai C; Z. Mai and J. Jong. (1992). Development of transformation system for *Coffea Arabica* using particle gun method. HortScience 27(Abtract):661.
- Nakamura Y; K. Kasamo, N. Shimosato, M. Sakata and E. Ohta. (1992). Stimulation of the extrusión of protons and H⁺-ATPase activities with the decline in pyrophosphatase activity of the tonoplast in intact Mung vean roots undes high-NaCl stress and its relation to external levels of Ca²⁺ ions. Plant Cell Physiol. 33:139-149.
- Neuhaus H. (2007). Transport of primary metabolites across the plant vacuolar membrane. FEBS Letters 581:2223–2226.
- Nieto-Jacobo, Ma., Guevara-García, A. y Herrera-Estrella, L. (1999). Plantas Transgénicas. Investigación y Ciencia. Pp. 70-80.
- Otoch M; A. Sobreira, M. de Aragao, E. Orellano, M. Lima and D. de Melo. (2001). Salt modulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. Plant Physiol. 158:545-551.
- Pacheco, A. and J. Pohlan. (2005). Plantas aromáticas como cultivo intercalado, experiencias y efectos alelopáticos sobre el café (*Coffea arabica* L.). Memorias en extenso. Primer Congreso Internacional De Plantas Medicinales en Villahermosa, Tabasco, México, Pp.207-216.
- Parks G; M. Dietrich M. and K. Schumaker. (2002). Increased vacuolar Na⁺/H⁺ Exchange activity in *Salicornia bigelovii* Torr. in response to NaCl. J Exp Bot. 53:1055-1065.
- Pérez J; J. Alvar, L. Ruiz and A. Serrano. (2002). Evidence for a wide occurrence of proton-translocating pyrophosphatase genes in parasitic and free-living protozoa. Biochem Biophys Res Commun. 294:567-573.
- Perthuis B; J. Pradon, C. Montagnon, M. Dufour and T. Leroy. (2005). Stable resistance against the leaf miner *Leucoptera coffeella* expressed by genetically transformed *Coffea canephora* in a pluriannual field experiment in French Guiana. Euphytica 144:321-329.

- Petel G. and M. Gendraud. (1989). Localization in sucrose gradients of pyrophosphatase activities in the microsomal fraction of Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) tubers. *J Plant Physiol.* 134:466-470.
- Quiroz Figueroa F. (2003). Estudio de la embriogénesis somática en *Coffea arabica*. Tesis de Doctorado. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México. Pp. 6-8.
- Quiroz-Figueroa F; C. Fuentes-Cerda, R. Rojas-Herrera, V. Loyola-Vargas. (2002). Histological studies on developmental stages and differentiation on two differens somatic embryogenesis systems of *Coffea arabica*. *Plant Cell Rep* 20:1141-1149.
- Rea P; J. Britten, I. Jennings, C. Calvert, L. Skiera, R. Legh and D. Sanders. (1992). Regulation of vacuolar H⁺-pyrophosphatase by free calcium. *Plant Physiol.* 100:1706-1715.
- Rea P. and R. Poole. (1993). Vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 44:157-180.
- Regalado A. O. (1995). Manual para la cafecultura mexicana, INCA/SAGAR/Consejo mexicano del Café, México. Pp. 52-65.
- Reuveni M; A. Bennet, R. Bressan and P. Hasegawa. (1990). Enhanced H⁺-transport capacity and ATP-hydrolysis activity of the tonoplast H⁺-ATPase after NaCl adaptation. *Plant Physiol.* 94:524-530.
- Rezmer, C., Schlichting, R., Wächter, R. and C.I Ullrich. (1999). Identification and localization of transformed cells in *Agrobacterium tumefaciens*-induced plant tumors. *Planta* 209:399-405.
- Ribas A; A. Kobayashi, L. Pereira and L. Vieira. (2005). Genetic transformation of *Coffea canaphora* by particle bombardment. *Biol Plant.* 49:493-497.
- Robinson D; H. Haschke, G. Hinz, B. Hoh, M. Maeshima and F. Marty. (1996). Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons. *Planta.* 198:95-103.
- Rockel B; R. Ratajczac, A. Becker and U. Lüttge. (1994). Changed densities and diameters of intra-membrane tonoplast particules of *Mesembryanthemum crystallinum* in correlation with NaCl-induced CAM. *J Plant Physiol* 143:318-324.

- Ronde J. A; A. Cress and A. Van Der Mescht. (2001). *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) seed with the β -glucuronidase marker gene. South African Journal of Science 97:421-424.
- Sakakibara Y; H. Kobayashi and K. Kasamo. (1996). Isolation and characterization of cDNAs encoding vacuolar H⁺-pyrophosphatase isoforms from rice (*Oryza sativa* L.). Plant Mol Biol. 31:1029-1038.
- Salminen T; J. Kapula, P. Heikinheimo, J. Kankare, A. Goldman, J. Heinonen, A. Baykov, B. Cooperman and R. Lahti. (1995). Structure and function analysis of *Escherichia coli* inorganic pyrophosphatase: is a hydroxide ion the key to catalysis? Biochemistry. 34:782-791.
- Santana N; R. Rojas, R.M. Galáz, J.R. Ku, J. Mijangos and V.M. Loyola. (2007). Coffe. Biotechnology in Agriculture and Forestry 60:475-495.
- Santana-Buzzy N. (1993). Embriogénesis somática en el cultivo del cafeto (*Coffea* sp.). Tesis de Doctorado. Instituto superior de ciencias agropecuarias de la habana "Fructuoso Rodríguez Pérez". Pp. 12.
- Santoyo-Cortés V. H; S. Díaz-Cárdenas y B. Rodríguez-Padrón. (1996). Sistema agroindustrial del café en México: diagnóstico, problemáticas y alternativas. Universidad Autónoma de Chapingo, México. Pp. 138-139.
- Serrano A. (2001). Trends in Inorganic Pyrophosphatases Research. In: Proceedings of the Second International Meeting on Inorganic Pyrophosphatases, Universidad de Sevilla-CSIC, ISBN. Pp. 144-146.
- Serrano R. and Rodríguez P. (2002). Plant, genes and ions: workshop on the molecular basis of ionic homeostasis and salt tolerance in plants. EMBO 3(2):116-119.
- Sharp W. R; M. Söndahl, L.S. Caldas and S.B. Marrafa. (1980). The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. Hort. Rev. 2:268-310.
- Shaw, C.H. (1995). Introduction of Cloning Plasmids into *Agrobacterium tumefaciens*. In: H. Jones (Ed.). Plant Gene Transfer and Expression Protocols. Humana Press Inc. Totowa, New Jersey. Vol.49. Pp. 33-37.

- Sheng J. and V Citovsky. (1996). *Agrobacterium* – plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell*: 8(10)1699-1710.
- Shillito, R.D. and M.W Saul. (1988). Protoplast isolation and transformation. *In: Shaw, C.H. (Ed.). Plant molecular biology: a practical approach.* IRL Press Limited Oxford, England. Pp. 161-186.
- Shintani T; T. Uchiumi, T. Yonezawa, A. Salminen, A. Baykov, R. Lahti and A. Hachimori. (1998). Cloning and expression of a unique inorganic pyrophosphatase from *Bacillus subtilis*: evidence of a new family of enzymes. *FEBS Lett.* 439:263-266.
- Shirakate K; Y. Kanayama, M. Maeshima and S. Yamaki. (1997). Changes in H⁺-pumps and tonoplast intrinsic protein of vacuolar membranes during the development of pear fruit. *Plant Cell Physiol.* 38:1039-1045.
- Singer M. and P Berg. (1991). Genes and ADN: a changing perspective. *In: Genes and Genomes.* University Science Books. Mill Valley, CA. Pp.23, 883.
- Smart L; F. Vojdani, M. Maeshima and T. Wilkins. (1998). Genes involved in osmoregulation during turgor-driven cell expansion of developing cotton fibers are differentially regulated. *Plant Physiol.* 116:1539-1549.
- Smith A; E. Uribe, E. Ball, S. Heuer and U. Lüttge. (1984). Characterization of the vacuolar ATPase activity of the crassulacean-acid-metabolism plant *Kalanchoë daigremontiana* receptor modulating. *Eur J Biochem* 141:415-420.
- Solís A. (2002). Caracterización de la Embriogénesis somática de café (*Coffea spp.*), inducida en diferentes medios de cultivo. Tesis profesional. Instituto Tecnológico de Mérida, México. Pp. 5-15.
- Söndahl M. R. and W. R. Sharp. (1977). High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea Arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol*, 81:395-408.
- Söndahl M. R. D. Spahlinger, W. R. Sharp. (1979). A histological study of high frequency and low frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 94:101-108.

- Spiral J; C. Thierry, M. Paillard and V. Petiard. (1993). Regeneration of plantlets of *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformed by *Agrobacterium rhizogenes*. C R Acad Sci (Paris) Sér III 316:1-6.
- Staritsky G. (1970). Embryoid formation in callus tissues of coffee. Acta Bot. Need; 19:509-514.
- Terrier N; C. Deguilloux, F. Sauvage, E. Martinoia and C. Romieu. (1998). Proton pumps and ion transport in *Vitis vinifera*: The inorganic pyrophosphatase plays a predominant role in the energization of the tonoplast. Plant Pysiol Biochem. 36:367-377.
- Tjokrokusumo D; T. Heinrich T. S. Wylie, R. Potter and J. McComb. (2000). Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. Plant Cell Reports 19:792-797.
- Ullrich C. and A. Novacky. (1990). Extra- and intracellular pH and membrane potential changes induced by K^+ , Cl^- , $H_2PO_4^-$ and NO_3^- uptake and fusicoccin in roots hairs of *Limnobium stoloniferum*. Plant Physiol. 94:1561-1567.
- Van Boxtel J; M. Berthouly, C. Carasco, M. Dufour and A. Eskes. (1995). Transient expression of β -glucoronidase following biobalistic delivery of forgein DNA into coffe tissues. Plant Cell Rep. 14:748-752.
- Wang B; R. Rataiczak anf J. Zhang. (2000). Activity, Amount and subunit composition of vacuolar-type H^+ -ATPase and H^+ -PPase in wheat roots undes severe NaCl stress. J. Plant Physiology 157:109-116.
- Wang B; U. Lüttge and R. Ratajczak. (2001). Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Sauceda salsa*. J Exp Bot. 52:2355-2365.
- White F. (1993). Vectors for Gene Transfer in Higher Plants. In: Shain-dow Kung and Ray Wu (Eds.). Transgenic Plants. Academic press, Inc. San Diego, California. Pp. 15-48.
- Williams L. and G. Maheswaran. (1986). Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behavior of cell as an embryogenic group. Ann. Bot. 57: 443-462.

- Williams L; S. Nelson and J. Hall. (1990). Characterization of solute transport in plasma membrane vesicles isolated from cotyledons of *Ricinus communis* L. *Planta*. 182:532-539.
- Yasuda T; Y. Fujii and T. Yamaguchi. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benziladenine. *Plant and Cell Physiology*. 26(3):593-597.
- Zancani M; L. A. Skiera and D. Sanders. (2006). Roles basic and salt-bridge interaction in a vacuolar H⁺-pumping prophosphatase (AVP1) from *Arabidopsis thaliana*. 1768(2):311-316.
- Zhu J; P. M. Oger, B. Schrammeijer, P.J. Hooykaas, S.K. Farrand and S.C. Winans. (2000). The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Journal of Bacteriology*. 182(14):3885-3895.
- Zingarelli L; P. Anzani and P. Lado. (1994). Enhanced K⁺-stimulated pyrophosphatase activity in NaCl-adapted cell of *Acer pseudoplatanus*. *Physiol Plant*. 91:510-516.
- Zyprian E. and C.I. Kado. (1990). *Agrobacterium* - Mediated Plant Transformation by Novel mini-T Vectors in Conjunction with a High-Copy vir Region Helper Plasmid. *Plant Molecular Biology*: 15(2):245-256
- Zupan J; Muth T; Draper O. and P. Zambryski. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The plant journal* 23(1):11-28



Capítulo II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

El material vegetal utilizado en este proyecto fueron plántulas de café cultivadas *in vitro* obtenidas mediante la germinación de embriones cigóticos de semillas de frutos de plantas regeneradas de la especie *C. arabica* que se encuentran en el Jardín Botánico ubicado en el Centro de Investigación Científica de Yucatán en Mérida Yucatán.

2.2 DESINFECCIÓN DE SEMILLAS DE *C. ARABICA*

Las semillas utilizadas en este trabajo fueron desinfectadas siguiendo el protocolo reportado por Santana-Buzzy *et al.*, 2005 modificado, en donde las semillas se remojaron en hipoclorito de sodio comercial (Cloralex) al 30% durante 2 h. El agua clorada se decantó y las semillas se enjuagaron 2 veces con agua estéril; se añadió etanol al 70% y se incubaron durante 5 min. Se realizaron 2 lavados con agua estéril y nuevamente se agregó hipoclorito de sodio comercial al 30% incubando durante 10 min. Finalmente las semillas se lavaron 4-5 veces con abundante agua estéril y se dejaron sumergidas en agua estéril durante toda una noche.

2.3 EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE EMBRIONES CIGÓTICOS DE SEMILLAS DE *C. ARABICA*

La extracción de embriones cigóticos de *C. arabica* se realizó en una campana de flujo laminar. La extracción se llevó a cabo mediante el método de cortes de endospermo de la semilla hasta encontrar el embrión y extraerlo. El embrión extraído se cultivó *in vitro* en un medio de cultivo semisólido MS (Murashige & Skoog, 1965) en las concentraciones que se muestran en el Cuadro 2.1. El pH se ajustó a 5.8 previo a la adición del

agente solidificante. Posteriormente los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave a 121 °C (1.5 atm. de presión) durante 20 min.

Cuadro 2.1. Componentes del Medio MS
(Murashige &Skoog, 1965)

Componentes	Proveedor	Cantidad
Sales de MS	Sigma	4.314 g
Mio-inositol	Sigma	100 mg/L
Tiamina	Sigma	4 mg/L
Cisteina	Sigma	25 mg/L
Sacarosa	Sigma	30 g/L
Gelrite (agente solidificante)	Sigma	2.2 g

Los explantes cultivados *in vitro* se incubaron a 25 °C en un cuarto con fotoperíodo (16/8 h luz/oscuridad), transfiriéndolo cada 60 días a un medio nuevo (fresco) de MS para su mantenimiento.

2.4 PROTOCOLO PARA LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE EXPLANTES FOLIARES DE PLÁNTULAS DE *C. ARABICA*

El método de transformación genética utilizado fue el protocolo reportado por Canché-Moo *et al.*, (2006). Para la transformación se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 donada por el Dr. Roberto Gaxiola, la cuál se cultiva en medio líquido LB (Extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l, Triptona 10 g/L y 1 mL de NaOH 1N) y con espectinomicina 100 µg/ml como antibiótico de selección.

El plásmido pRG (Figura 2.1) se obtuvo a través de la clonación del gen *AVP1* dentro del sitio *Xba I* de un plásmido modificado denominado pRT103; el vector pRG contiene al promotor 35S del CaMV en tandem, el gen *AVP1* y la secuencia señal de poliadenilación que fue subclonado dentro del sitio de corte *Hind III* del vector binario pZP212 (Gaxiola *et al.*, 2001) (Figura 2.2).

Para el proceso de transformación se utilizaron 3 plásmidos denominados pRG394, pRG395 y pRG233. Las diferencias entre ellos se puede observar en el Cuadro 2.2

Cuadro 2.2. Características de los plásmidos pRG
(Gaxiola *et al.*, 2001; Park *et al.*, 2005)

	Presencia del gen <i>avp1</i>	Mutación del gen <i>avp1</i>	Presencia del promotor 35S
pRG394	NO	NO	SI
pRG395	SI	SI	SI
pRG233	SI	NO	SI

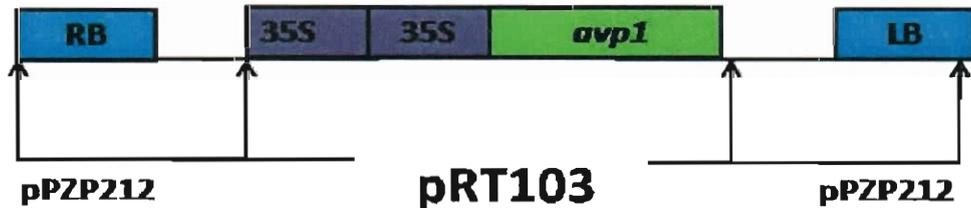


Figura 2.1. Estructura del T-ADN del plásmido pRG

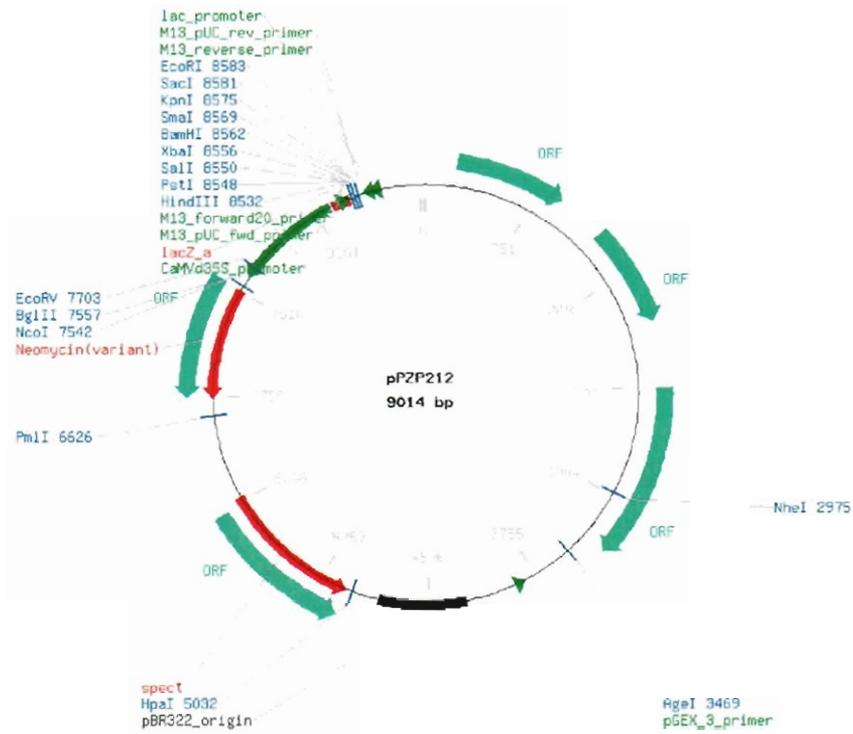


Figura 2.2. Mapa del Vector pZp212
Tomado de www.addgene.org

El cultivo líquido de la cepa GV3101 transformada se mantuvo en crecimiento durante 48 h a 28 °C en oscuridad; posteriormente se tomó una alícuota del cultivo anterior para inocular en un volumen mayor durante el mismo tiempo y a la misma temperatura. Luego se realizó una centrifugación durante 30 min a 4000 rpm; la pastilla resultante se resuspendió en 2 ml de medio de cultivo líquido MS.

Las plántulas cigóticas de café cultivadas en medio MS se seleccionaron para obtener explantes de hojas en forma de círculos de 1 cm de diámetro utilizando una perforadora. Posteriormente se adicionó un cultivo líquido de la cepa de *A. tumefaciens* previamente transformada y seleccionada. Los tejidos inoculados se sometieron a infiltración por vacío (400 mmHg) durante 20 min como reporta Acereto-Escoffié *et al.*, (2005). Una vez finalizado el tiempo de infiltración, el medio se decantó y se agregó

medio MS para dejar en cocultivo a 28 °C durante toda una noche en oscuridad y agitación. Después del tiempo establecido, se realizaron lavados a los discos de hoja en dos ocasiones con 0.9 % de NaCl para eliminar la presencia bacteriana dejando incubar 5 min en cada lavado; luego se realizaron 3 o 4 lavados con agua estéril, en donde se utilizaron toallas absorbentes previamente esterilizadas para evitar el exceso de este líquido en los explantes y finalmente estos se transfirieron en medio de cultivo líquido Yasuda (Yasuda *et al.*, 1985) modificado por Quiróz-Figueroa *et al.* , 2005 cuyos componentes se enlistan en el Cuadro 2.3, adicionando como antibiótico para eliminar *Agrobacterium tumefaciens* la Timentina (Galxo Smith Kline) a una concentración de 200 mg/mL y dejando en agitación a 50 rpm en oscuridad.

Cuando los medios de cultivo presentaron características de contaminación bacteriana, los explantes fueron sometidos a lavados utilizando el medio de cultivo líquido modificado Yasuda adicionado con el antibiótico Timentina a una concentración de 200 mg/mL como sigue: de 2 a 4 lavados con un tiempo de incubación de 5 min decantando dicho medio en cada caso al cumplirse el tiempo establecido; el número de lavados dependió del grado de contaminación que en que se encontraran los explantes en el medio de cultivo, esto es, cuando se observaba turbidez en el medio.

Cuadro 2.3. Componentes del Medio de cultivo Yasuda. Modificado por Quiróz-Figueroa *et al.* 2005

	Componente	Proveedor	Cantidad mg/L	Concentración
STOCK A	CaCl ₂ .2H ₂ O	Sigma	110	0.748 mM
STOCK B	KNO ₃	Sigma	475	4.7 mM
	NH ₄ NO ₃	Sigma	412.5	5.15 mM
STOCK C	KH ₂ PO ₄	Sigma	85	0.624 mM
	H ₃ BO ₃	Sigma	3.1	50 µm
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Sigma	0.125	0.5 µm
STOCK D	MgSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	92.5	0.375 mM
	MnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	6.83	40 µm
	CuSO ₄ .5H ₂ O	Sigma	0.05	0.2 µm
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	4.3	15 µm
STOCK E	FeSO ₄ .7H ₂ O	Sigma	21	75.53 µm
	Na ₂ EDTA.2H ₂ O	Sigma	27.9	74.95 µm
STOCK F	Piridoxina	Sigma	1	4.86 µm
	Ac. Nicotínico	Sigma	1	8.12 µm
	Tiamina HCL	Sigma	10	29.6 µm
	Mio-Inositol	Sigma	100	550 µm
	Sacarosa	Sigma	30 g/ml	
	BAP	Sigma	1.12 mg/L	

2.5 UTILIZACIÓN DE KANAMICINA COMO ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN

Para llevar a cabo la selección de las plántulas transgénicas, previamente se realizó un experimento de dosis-respuesta con un antibiótico en el que se utilizaron embriones cigóticos; estos se transfirieron a medio MS adicionado con Kanamicina (Fluka) a concentraciones de 0, 50, 100, 150, 250, 350, 400 y 450 µg/ml.

La respuesta de los embriones cigóticos a las diferentes concentraciones del antibiótico se realizó en un período de 35 días; tomando como resultado a aquellas concentraciones en las que se presentó un mayor número de embriones muertos.

2.6 ANÁLISIS DE LA INTEGRACIÓN DEL GEN *AVP1* DE *Arabidopsis thaliana* EN PLÁNTULAS DE CAFETO CULTIVADAS *IN VITRO*

2.6.1 EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN total de las plantas fue extraído utilizándose 0.1 g de tejido foliar de acuerdo al método reportado por Dellaporta *et al.*, 1983. El ADN obtenido fue resuspendido en agua estéril y almacenado a -20°C hasta su uso. La electroforesis de ADN se realizó en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE 1X (40 mM Tris-acetato pH 8.0, 1 mM EDTA), adicionado con Sybr safe.

2.6.2 AMPLIFICACIÓN DE LA SECUENCIA DE ADN DEL PROMOTOR 35S Y LA FUSIÓN 35S CON EL GEN *AVP1*

Para llevar a cabo el análisis de las plántulas transformadas, se realizó la amplificación del ADN extraído mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos que permitieran la amplificación del promotor 35S y de la fusión del promotor 35S con el gen *AVP1* en un termociclador (Mastercycle, Eppendorf).

La mezcla de la reacción para la amplificación del promotor 35S consistió de: 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP mix, 20 pmoles de primer 35S Forward (5'GCTCCTACAAATGCCATCA3'), 20 pmoles de primer 35S Reverse (5'GATATGGGATTGTGCGTCA3'), 2.5 µl de amortiguador de PCR 10X, 0.5 U de Taq DNA polimerasa, 10 ng de ADN en 25 µl de volumen total de reacción. Las condiciones de amplificación corresponden a una desnaturalización previa a 95° C por 5 min; 40 ciclos de: desnaturalización a 95° C por 30 s, alineación a 54° C por 30 s y extensión a 72° C por 30 s. Con una extensión final de 72° C por 5 min.

La mezcla de la reacción para la amplificación de la fusión del promotor 35S y el gen *AVP1* consistió de: 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP mix, 20 pmoles de primer 35S Forward (5' GCTCCTACAAATGCCATCA3'), 20 pmoles de primer *avp1* Reverse (5'GACAAGGTCAGCGCCGACAT3'), 2.5 µl de amortiguador de PCR 10X, 0.5 U de Taq DNA polimerasa, 10 ng de ADN en 25 µl de volumen total de reacción. Las condiciones de amplificación corresponden a una

desnaturalización previa a 95° C por 5 min; 35 ciclos de: desnaturalización a 95° C por 30 s, alineación a 63° C por 1 min y extensión a 72° C por 2 min. Con una extensión final de 72° C por 10 min.

2.6.3 AMPLIFICACIÓN DE ADN DEL GEN *VIR E2* DE *Agrobacterium tumefaciens*

Para descartar la contaminación de plántulas transgénicas por la presencia de la bacteria del género *Agrobacterium* que se utilizó para realizar la transformación genética y rechazar individuos falsos positivos para presencia de los plásmidos pRG, se llevó a cabo la amplificación del gen *VIR E2*.

Los componentes de la mezcla de la reacción fueron: 1.5 mM de MgCl₂, 200 mM de dNTP mix, 20 pmoles de primer *virE* Forward (5'TGCCACCA AGGCGAATT3'), 20 pmoles de primer *virE* Reverse (5'CTTTGCCGACCCATCGA3') (Canché-Moo *et al.*, 2006), 2.5 µl de amortiguador de PCR 10X, 0.5 U de Taq DNA polimerasa, 10 ng de ADN, en un volumen total de reacción de 25 µl. Las condiciones de amplificación fueron las reportadas por Canché-Moo *et al.* (2006): desnaturalización previa a 94° C por 4 min; 30 ciclos de: desnaturalización a 94° C por 1 min, alineación a 51° C por 1 min y extensión a 72° C por 1 min. Con una extensión final a 72° C por 10 min.

2.7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acereto-Escoffí P; B. Chi-Manzanero, S. Echeverría- Echeverría, A. James, R. Grijalva and L. Rodríguez-Zapata. (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Musa acuminata* cv "Grand Nain" scalps by vacuum infiltration. *Scientia Horticulturae* 105: 359–371.
- Canché-Moo R; A. Kú-González, C. Burgeff, V. Loyola-Vargas, L. Rodríguez-Zapata and E. Castaño. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 84(3):373-377.
- Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B. (1983). A plant DNA miniprep. version II. *Plant Molecular Biology Reporter*. Cold Spring Harbor Laboratory, NY 11724. 1(4):19-21.

- Gaxiola R; J. Li, S. Undurraga, L. Dang, G. Allen, S. Alper and G. Fink. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. PNAS. 98(20):11444-11449.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Park S; J. Li, J. Pittman, G. Berkowitz, H. Yang, S. Undurraga, J. Morris, K. Hirschi and R. Gaxiola. (2005). Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. PNAS 102(52):18830-18835.
- Quiróz-Figueroa F; M. Monforte-González, R.M. Galáz-Ávalos and V.M. Loyola-Vargas. (2005). Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. Methods in Molecular Biology: Plant Cell Protocols. 2^aEdition. 318:111-117.
- Santana-Buzzy N; A. Canto-Flick, F. Barahona-Pérez, M. Montalvo-Peniche, P. Zapata-Castillo, A. Solís-Ruiz, A. Zaldival.Collf, O. Gutierrez-Alonzo and M. Miranda-Ham. (2005). Regeneration of Habanero Pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) via organogenesis. Hort Science 40(6):1829-1831.
- Yasuda T; Y. Fujii and T. Yamaguchi. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benziladenine. Plant and Cell Physiology. 26(3):593-597.

Capítulo III

RESULTADOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

Las plántulas de café utilizadas en este trabajo, se obtuvieron por la germinación de los embriones cigóticos de semillas obtenidas por recolección de frutos de plantas regeneradas, adaptadas y cultivadas en el CICY.

Se obtuvieron 300 plántulas cultivadas *in vitro* que germinaron a partir de embriones extraídos de semillas de frutos frescos, las cuales se distribuyeron en 6 lotes de 50 plántulas cada uno que se mantuvieron en medio de cultivo MS, transfiriéndolas a un medio de cultivo fresco cada 60 días.

El procedimiento de obtención de plántulas incluyó métodos como la desinfección de las semillas para evitar alguna contaminación, la extracción de embriones y la germinación de los mismos.

3.2 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE *Agrobacterium tumefaciens* QUE INCLUYE EL PLÁSMIDO DE EXPRESIÓN DEL GEN *AVP1* DE *Arabidopsis thaliana*

Los plásmidos denominados pRG donados por el Dr. Roberto Gaxiola, se recibieron en papel filtro, por lo que se les llevó a cabo una extracción para posteriormente clonarse en cepas bacterianas DH5 α de *E. coli*. Finalmente, los plásmidos se integraron en la cepa bacteriana GV3101 de *Agrobacterium tumefaciens*, la cual se utilizó para llevar a cabo la transformación genética mediante infiltración al vacío.

Posterior a la extracción de ADN de las cepas bacterianas, se llevó a cabo una amplificación mediante PCR utilizando el ADN plasmídico con el par de cebadores 35S forward y *avp1* reverse, esto para corroborar la presencia del promotor 35S en tándem fusionado con el gen *AVP1* de

Arabidopsis thaliana que se encuentran integrados a los vectores de transformación pRG.

En la Figura 3.1 se observa la amplificación en un gel de agarosa al 1% teñido con Syber safe en el que se observan 2 fragmentos que representan la presencia del gen *AVP1* y el promotor 35S en tándem en los plásmidos pRG395 y pRG233; para el caso del pRG394, *AVP1* se encontró ausente, por lo que se utilizó como plásmido de control en el proceso de transformación genética.

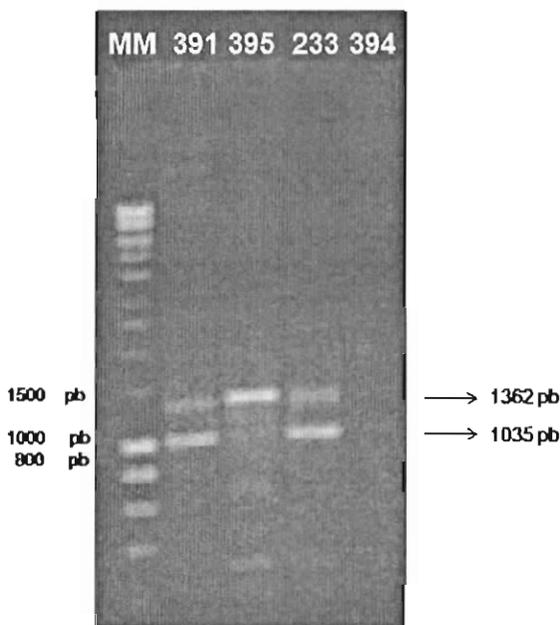


Figura 3.1. Amplificación en tándem del promotor 35S y el gen *AVP1* de *Arabidopsis thaliana* en los plásmidos pRG integrados en *Agrobacterium tumefaciens*. MM: Marcador molecular (1 KB), 391: plásmido pRG clonado en una cepa bacteriana de *E. coli*, 395; plásmido pRG con *avp1* mutado clonado en *A. tumefaciens*, 233; plásmido pRG con *AVP1* silvestre clonado en *A. tumefaciens*, 394; plásmido pRG sin presencia de *AVP1* clonado en *A. tumefaciens*.

Después de corroborar la presencia en pRG395 y pRG233 y la ausencia en pRG394 del gen *AVP1* en los plásmidos, se llevó a cabo la amplificación por PRC del gen *VIR E2* de *A. tumefaciens* en ADN

plasmídico para comprobar la identidad bacteriana de *A. tumefaciens* en las que se integraron los plásmidos pRG.

En la figura 3.2 se observa el producto amplificado de 895 pb que representa la presencia del gen *VIR E2* dentro de la región de virulencia del plásmido natural de *A. tumefaciens* cuya función es permitir la infección o en el caso de la transformación, la transferencia del material genético a transformar, lo que nos corroboró la identidad de la bacteria.

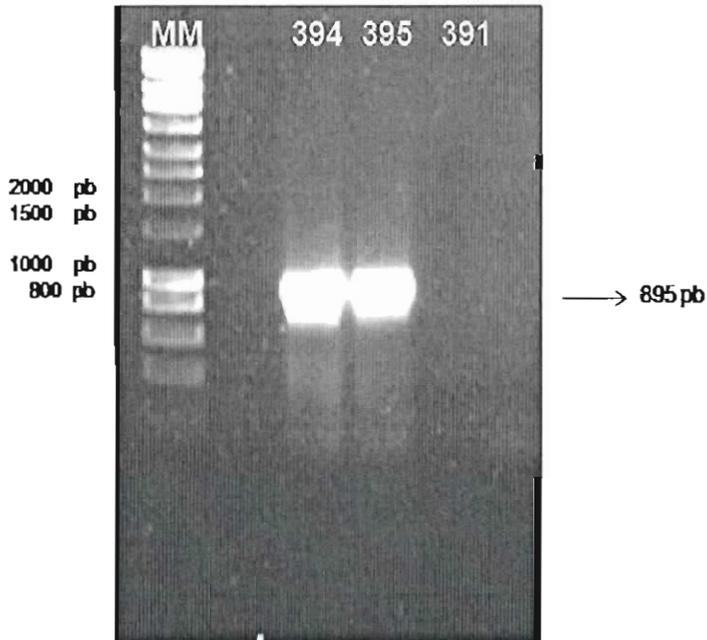


Figura 3.2. Amplificación por PCR del gen *VIR E2* de la cepa GV3101 de *A. tumefaciens*. MM marcador molecular, 394 Cepa GV3101 de *Agrobacterium* que contiene el plásmido pRG394; 395 Cepa GV3103 de *Agrobacterium* que contiene el plásmido pRG395; 391 Cepa bacteriana de *E. coli* que contiene el plásmido pRG391.

3.3 TRANSFORMACIÓN DE EXPLANTES FOLIARES A TRAVÉS DE *Agrobacterium tumefaciens* CON EL GEN *AVP1* E INDUCCIÓN DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

El protocolo de transformación por infiltración al vacío se realizó de acuerdo a lo reportado por Canché-Moo *et al.* (2006); se utilizaron cepas GV3101 de *A. tumefaciens* que contenían diferentes construcciones: 1) pRG395 conteniendo el gen *avp1* mutado en el vector binario pPzp212 y 2) pRG233 conteniendo el gen silvestre *AVP1* en el vector pPzp212. El testigo consistió del vector binario pPzp212 sin la presencia del gen *AVP1* denominado pRG394.

Adicionalmente, los explantes de hoja no transformados fueron inducidos a embriogénesis como testigo de inducción para la comparación del tiempo en que los explantes transformados y los no transformados presentan la formación de embriones.

Como explantes para transformar se utilizaron discos de hojas de café de plántulas cultivadas *in vitro* de la especie *C. arabica*, los cuales fueron sometidos a lavados con solución salina y agua y se transfirieron a medio de cultivo líquido Yasuda modificado y previamente reportado como de inducción de embriogénesis en oscuridad a 50 rpm por aproximadamente 3 a 4 meses. Transcurrido este período de tiempo, los explantes que presentaron formación de embriones se trasladaron al cuarto de fotoperiodo a 25 °C, con la finalidad de que los embriones ya formados se separen del explante inducido para luego ser transferidos a medio MS sólido adicionado con Timentina para esperar su conversión a plántula para agregarle la Kanamicina como antibiótico de selección de transformantes.

3.4. RESPUESTA EMBRIOGÉNICA DE EXPLANTES TRANSFORMADOS DE *C. arabica*

El proceso de transformación se realizó 6 veces, obteniendo diferentes respuestas las cuales se clasificaron en 2 grupos: 1) explantes con respuesta embrionaria y 2) explantes sin respuesta embrionaria para cada plásmido. El número total de respuesta embrionaria se presenta en el Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Respuesta embriogénica en explantes de *C. arabica*

	No. de Explantes de hoja inducidos a embriogénesis							
	pRG394		pRG395		pRG233		Testigo	
	Explantes totales	Con respuesta	Explantes totales	Con respuesta	Explantes totales	Con respuesta	Explantes totales	Con respuesta
	25	0	25	0	25	0	25	0
	27	23	22	10	25	17	22	19
	43	36	41	23	28	14	27	24
	49	33	38	27	42	8	38	28
	69	44	68	58	63	43	77	66
	107	89	112	68	98	37	82	57
	117	0	122	0	100	0	109	0
No. Total de explantes	437	225	426	188	379	119	378	194
Porcentaje de respuesta embriogénica	51%		44%		31%		51%	
Total de embriones formados	2108		568		351		1056	
Proporción de embriones formados por explante	9.3		3.1		2.9		5.4	
No de explantes que formaron embriones completos		28						17
Total de plántulas obtenidas	1384		3		23		869	

La respuesta de los explantes transformados con los diferentes plásmidos fue desigual, ya que si comparamos el número de embriones obtenidos en las columnas del plásmido pRG394 con respecto a las otras columnas correspondientes a los otros plásmidos pRG el número es mucho mayor. La comparación de la columna de pRG394 con respecto al los explantes testigo, indica que el número de embriones de pRG394 obtenidos sobrepasa por aproximadamente el doble a los embriones de los explantes testigo.

Los porcentajes de repuesta embriogénica que se obtuvieron van desde un 31% para pRG233 hasta un 51% encontrado en los explantes testigo y pRG394; para pRG395, se obtuvo el 44% de explantes con respuesta embriogénica.

En cuanto al número de plántulas completas obtenidas, la diferencia que se presentó fue notable ya que mientras para pRG394 se obtuvieron 1384, en pRG395 solo se obtuvieron 3 y para pRG233 fueron 23 plántulas,

las cuales al obtener el primer para verdadero de hojas no lograron sobrevivir.

Los explantes transformados con pRG233, presentaron respuesta embrionaria a los 2 meses de llevado a cabo el proceso de inducción a embriogénesis; a los 5 meses se presentó la formación de embriones en los explantes y comenzaron a disgregarse, aunque muchos de estos presentaron diferentes grados de fenolización y finalmente murieron; algunos de los embriones germinaron formando plántulas con genotipos distintos a los obtenidos en plántulas sin transformar.

En la Figura 3.3 se presentan las fotografías de los explantes transformados con pRG233 donde se observan las diferentes etapas y respuestas del explante durante la embriogénesis somática.

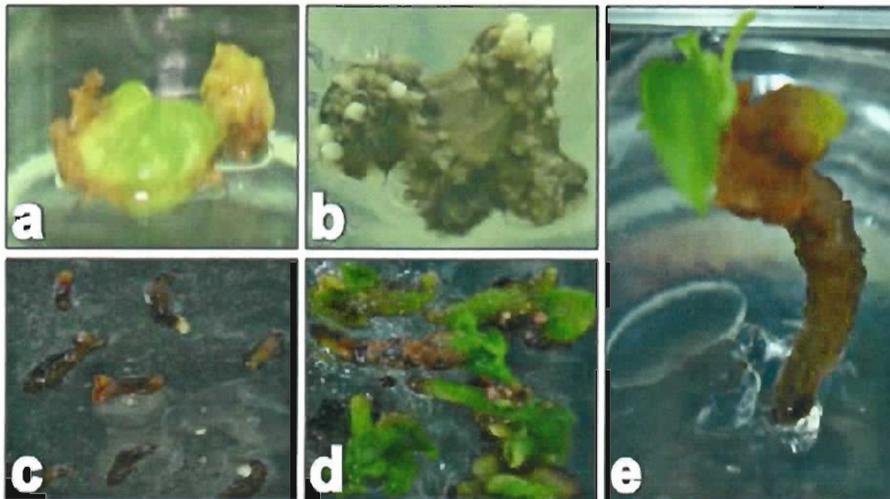


Figura 3.3. Respuesta embriogénica de los explantes foliares de *C. arabica* sometidas a transformación genética con el plásmido pRG233. a) explantes foliares de 1.5 meses con respuesta embriogénica; b) explantes foliares de 5 meses con formación de embriones; c) embriones obtenidos de explantes foliares que no sobrevivieron; d) embriones obtenidos de explantes foliares que sobrevivieron y desarrollaron a plántulas; e) Plántulas de 2 meses de edad.

Los explantes foliares transformados con el plásmido pRG395 presentaron varios problemas durante la germinación de los embriones obtenidos; durante el proceso de embriogénesis, los explantes respondieron sin ningún problema, sin embargo, en la etapa de germinación los embriones comenzaron a fenolizarse impidiendo su desarrollo para llegar a la etapa de plántulas.

En la Figura 3.4 se observan fotografías de los explantes transformados con pRG395 en donde se muestran las distintas respuestas que presentaron éstos durante el proceso de la embriogénesis somática.

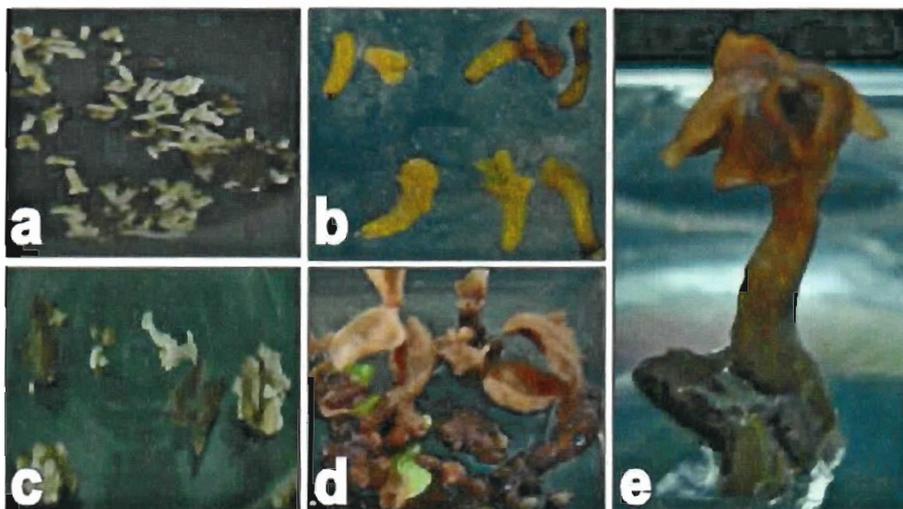


Figura 3.4. Respuesta embriogénica de explantes foliares de *C. arabica* sometidas a transformación genética con el plásmido pRG395. a) embriones disgregados obtenidos de explantes foliares en un medio líquido; b) embriones germinados de 15 días de edad transferidas a un medio MS sólidos; c) explantes foliares con respuesta y sin respuesta embrionaria; d) embriones y plántulas obtenidas de explantes foliares que no sobrevivieron; e) plántulas no sobrevivientes obtenidas de explantes foliares.

Los explantes foliares transformados con el plásmido pRG394 presentaron un desarrollo normal (Figura 3.5) comparado con los explantes sin transformar e inducidos al proceso de embriogénesis somática (Figura 3.6), en donde ambos tratamientos respondieron paralelamente igual en tiempos y forma, ya que en relación a, los fenotipos, ambos fueron bastante similares; la diferencia entre ambos tratamientos se encontró en cuanto al

número de embriones que se desarrollaron por explantes, pues mientras que en los explantes transformados se notó la presencia de un gran número de embriones, en los explantes testigo los embriones que se encontraron fueron en un número menor; esto podría deberse principalmente al origen de los explantes y a la edad de la planta de la que se obtuvieron los explantes.

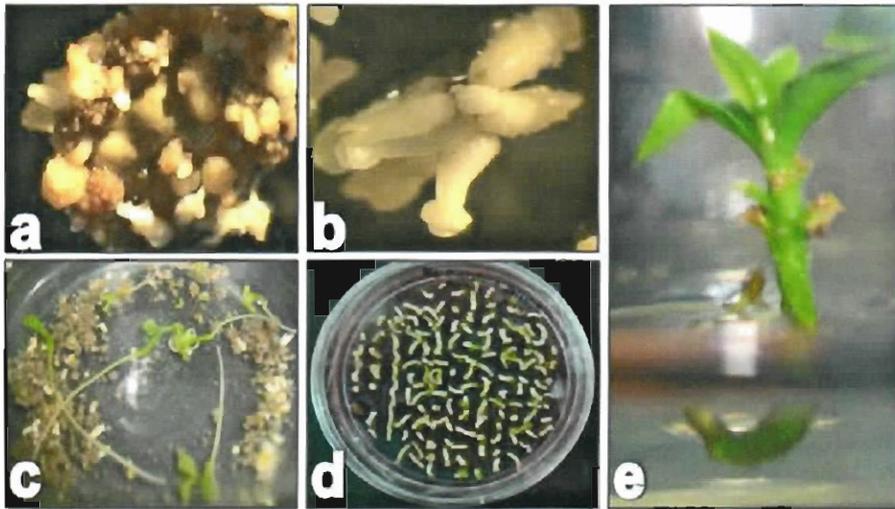


Figura 3.5. Respuesta embriogénica de explantes foliares de *C. arabica* sometidas a transformación genética con el plásmido pRG394. a) explantes foliares con presencia de respuesta embrionaria; b) embriones para transferir a un medio MS sólidos; c) embriones y plántulas sin transferir a medio MS sólido; d) embriones obtenidos de explantes foliares e inducidos a embriogénesis y transferidos a medio MS sólido; e) plántulas de 4 meses de edad obtenidas de los explantes foliares transformados.

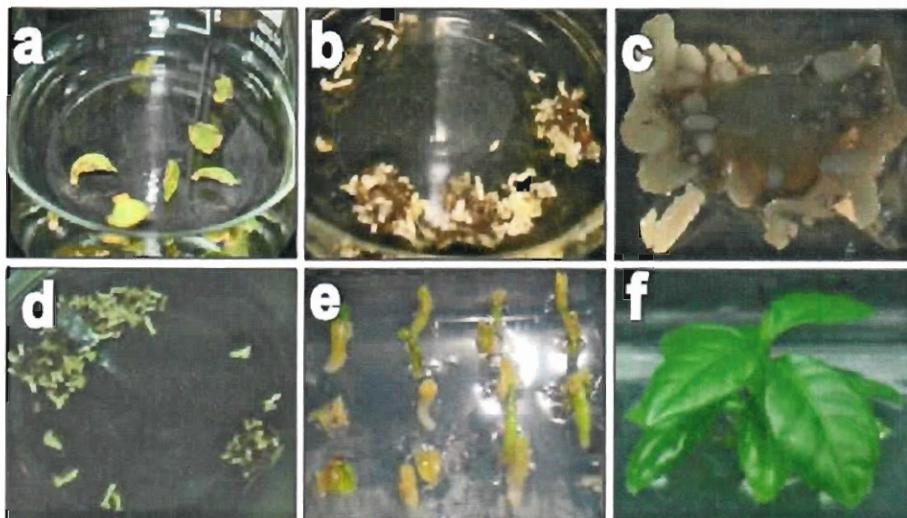


Figura 3.6. Respuesta embriogénica de los explantes foliares de *C. arabica* como testigos de la inducción a embriogénesis somática. a) explantes foliares con presencia de respuesta embrionaria, b) explantes foliares con presencia de embriones, c) explante foliar con presencia de embriones en diferentes etapas de crecimiento, d) embriones disgregados para transferir a un medio MS sólidos, e) embriones de 15 días que germinaron en un medio MS sólido, f) plántulas de 6 meses de edad obtenidas de explantes foliares no transformados.

3.5 UTILIZACIÓN DE LA KANAMICINA COMO UN ANTIBIÓTICO DE SELECCIÓN DE TRANSGENES

Los embriones somáticos tomados a partir de los explantes inducidos al proceso de embriogénesis sin pasar por proceso de transformación con alguno de los plásmidos pRG, fueron expuestos a diferentes concentraciones de Kanamicina, esto es para obtener las concentraciones letales para los embriones sin transformar y las concentraciones óptimas de resistencia para los embriones transformados.

Los resultados que se obtuvieron se presentan en la Figura 3.7, en donde se puede observar que a las concentraciones que representan a 400 y 450 $\mu\text{g/ml}$ y que se encuentran en color naranja y azul, fueron en las que se obtuvieron un número menor de embriones sobrevivientes, esta fue una indicación para considerar una concentración próxima superior como la

concentración letal para las plántulas (500 $\mu\text{g/ml}$); para el caso de los embriones se consideró como concentración óptima a aquella que después de los 35 días del experimento presentó una mayor afectación visual a los embriones, la cuál resultó ser de 150 $\mu\text{g/ml}$. Esta consideración fue debido a que el tiempo en el que se desarrollo el experimento no fue suficiente para la letalidad.

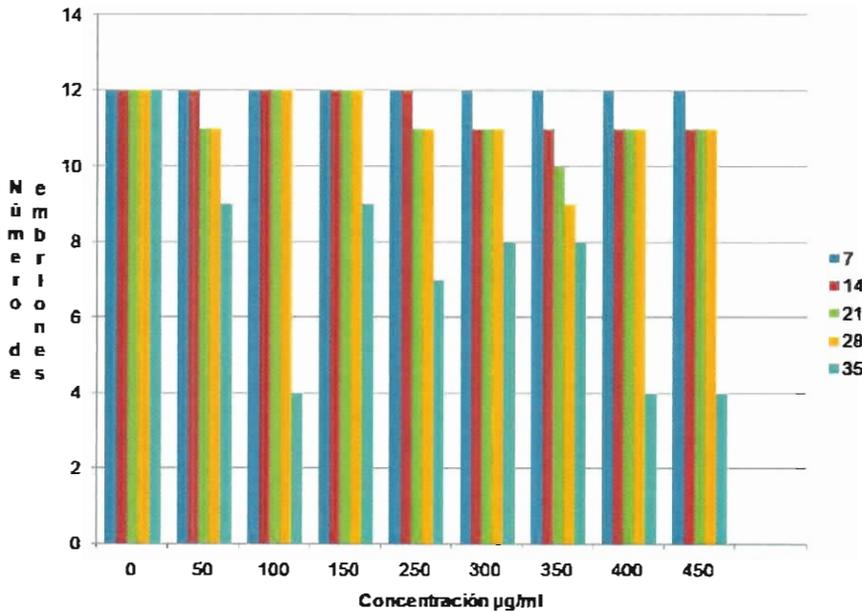


Figura 3.7. Número de embriones sobrevivientes a distintas concentraciones de Kanamicina. Tiempo de evaluación 35 días. $n=108$

Posteriormente, se realizó la selección utilizando kanamicina como antibiótico de selección en embriones y plántulas que fueron inducidas al procesos de embriogénesis somática; en principio, debido a la presencia del gen *NTPII* en los plásmidos pRG, las plántulas que presenten la integración de dichos plásmidos deberían de incluir la resistencia a dicho antibiótico.

Se evaluaron 2108 embriones obtenidos de la transformación con el plásmido pRG394, de los cuales 303 sobrevivieron a la concentración de 150 mg/ml , por lo que a los 2 meses de crecimiento en un medio MS con el antibiótico fueron transferidos a un medio para plántulas con una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$; actualmente, de las plantas sobrevivientes, 42 han sobrevivido a dicha concentración.

En la Figura 3.8 se presentan las fotografías de las plántulas que no sobrevivieron a las concentraciones de 150 y 500 $\mu\text{g/ml}$ de Kanamicina en comparación con las plántulas sobrevivientes a dicho antibiótico; se presentaron diferentes respuestas que se observaron en el fenotipo de las plántulas; entre estas, blanqueamientos, deformaciones, necrosis y muerte foliar.

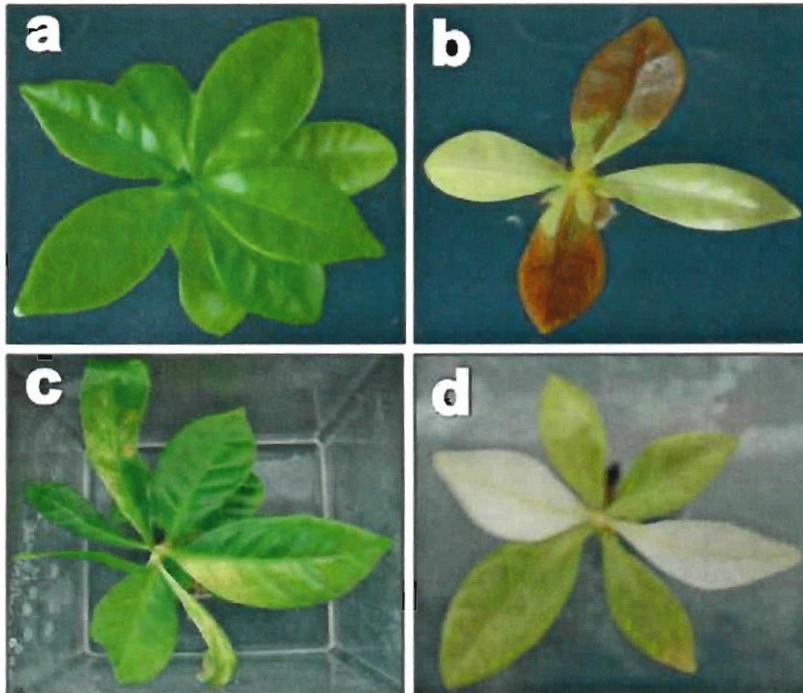


Figura 3.8. Respuesta de las plántulas transformadas con el plásmido *pRG394* expuestas a kanamicina como antibiótico de selección. a) Plántas testigo sin antibiótico de selección; b) plántulas con necrosis foliar expuestas a 500 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina; c) plántulas con deformación foliar expuestas a 500 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina; d) plántulas con blanqueamiento foliar expuestas a 500 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina.

3.6 ANÁLISIS DE LA INTEGRACIÓN DEL GEN AVP1 MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

Las hojas de las plántulas de café cultivadas *in vitro* y transformadas mediante el proceso de infiltración al vacío con la cepa GV3101 fueron colectadas en paquetes de 0.1 gr y congeladas a -20 ° C para su posterior utilización en análisis moleculares.

Las muestras colectadas, nombradas y etiquetadas como pRG394T1 a la 303, fueron sometidas a una extracción de ADN genómico; se analizó la amplificación del promotor 35S (Figura 3.9) mediante la técnica molecular de PCR, utilizando cebadores específicos y en donde se obtuvieron resultados positivos para todas las muestras. Se observó la amplificación de un fragmento de 195 pb, lo que sugirió la posibilidad de la transformación en las plantas correspondientes.

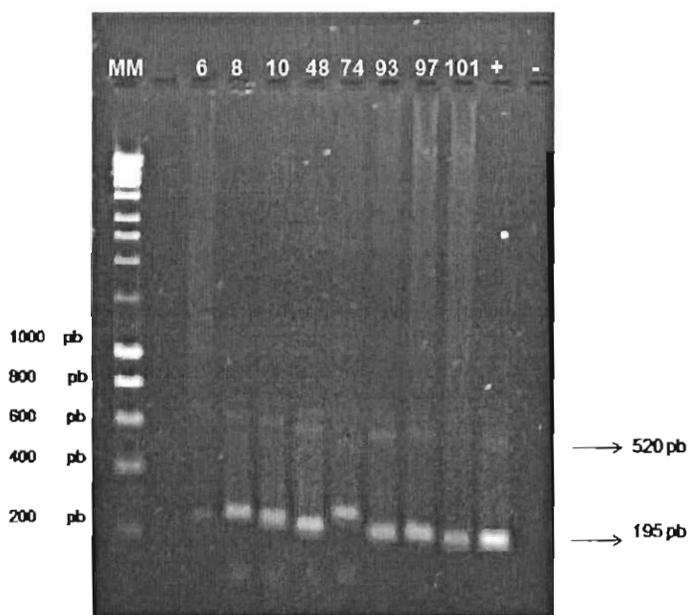


Figura 3.9. Amplificación del fragmento del promotor 35S en plántulas transformadas de *C. arabica* con el plásmido pRG394 cultivadas *in vitro*. MM marcador molecular; 6-101 Muestras pRG394T6-101 colectadas de plántulas transformadas; + control positivo (plásmido pRG394); - control negativo (agua).

Para descartar la posibilidad de contaminación con *A. tumefaciens* en las plantas transformadas, se realizó la amplificación de un fragmento del gen *virE2*, el cual solo está presente en la cepa bacteriana y no debe presentarse en las plantas transgénicas. En la Figura 3.10 se observa que la plántula con el nombre pRG394T48 no presenta fragmento amplificado que corresponde a *virE2*, por lo que ésta podría ser una planta transgénica, aunque en la amplificación del gen 35S presentó un patrón de bandas diferente al de las demás plántulas.

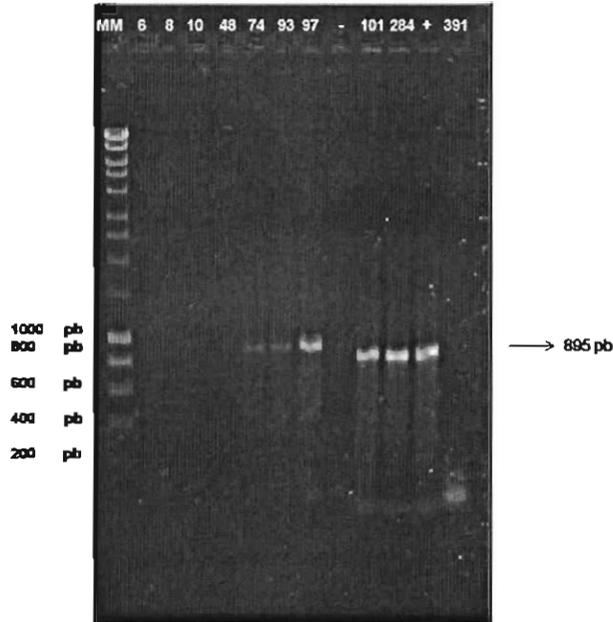


Figura 3.10. Amplificación de un fragmento del gen *virE2* de *A. tumefaciens* en plántulas transformadas con el plásmido pRG394 de *C.arabica*. MM marcador molecular; 6-284 Muestras pRG394T6-284; + control positivo (plásmido pRG394); - control negativo (agua); 391 control negativo (plásmido pRG391 en *E. coli*).

Para comprobar la presencia del gen *AVP1* en las plántulas transformadas con pRG394, se llevó a cabo la amplificación del promotor en tándem 35S y del gen *AVP1*, mismos que se encuentran fusionados dentro de los constructos pRG (Figura 3.11).

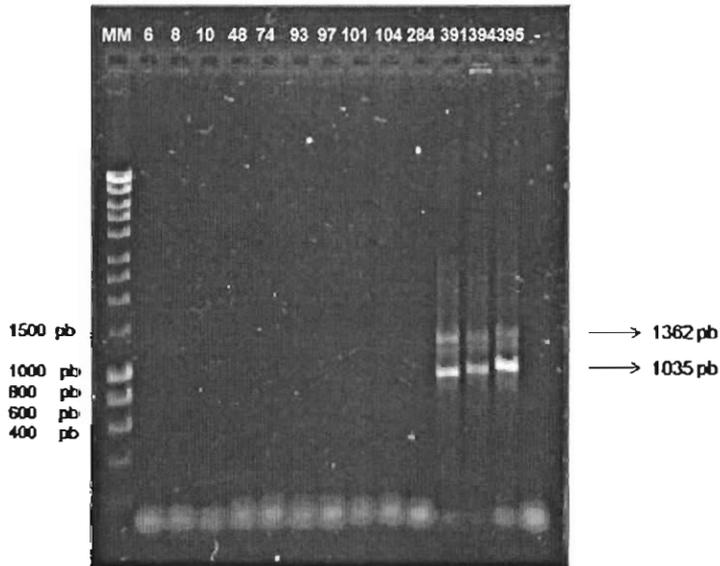


Figura 3.11. Amplificación del fragmento del promotor 35S y el gen *AVP1* en plántulas transformadas con el plásmido pRG394 de *C. arabica* cultivadas *in vitro*. MM marcador molecular; 6-284 Muestras pRG6-284 colectadas de plántulas transformadas; + control positivo plásmidos pRG391, pRG394 y pRG395; - control negativo (agua).

La amplificación del promotor 35S y el gen *AVP1* de *A. thaliana* fué negativa para el caso de las plantas denominadas pRG394T, esto es debido a que el plásmido pRG394, no contiene integrado al gen *AVP1*, sino que solamente tiene al vector binario pPzp212 en el que se encuentra contenido el promotor 35S.

Capitulo IV

DISCUSIONES

La transformación genética de plantas permite un incremento en la amplitud de “pool” de genes disponibles en sistemas de cultivos convencionales, permitiendo así la transferencia de genes a través de las especies, siendo de particular importancia el desarrollo de nuevos cultivares en plantas perennes pero que frecuentemente es difícil debido al largo tiempo que tarda en la obtención de una nueva generación.

El mejoramiento convencional se ha llevado a cabo para llenar la mayoría de las necesidades de la agricultura; para la producción del café, con éxitos sobresalientes en la selección y producción de cultivares tanto para la resistencia a plagas como en cambios en los períodos de maduración y arquitectura de las plantas. Sin embargo, la introducción de nuevos tratamientos en variedades élite de cafeto es un proceso largo que tarda de 20 a 35 años antes de obtener el nuevo cultivar; por ello, la ingeniería genética puede reducir el tiempo necesario en la obtención de nuevos cultivares con tratamientos deseables, así la transformación genética abre una ventana a la oportunidad de introducir genes de diferentes especies sumando características que serían difícil o imposible adquirir usando métodos tradicionales como son la resistencia a herbicidas, aumento de calidad y tolerancia a estrés abióticos como la salinidad, sequía o heladas.

Como cualquier trabajo que involucra la ingeniería genética de plantas, para el café es crítico contar con un eficiente protocolo de cultivo de tejidos, un sistema de selección y un método de transformación.

Los protocolos de sistema de cultivo de tejidos para su uso en la transformación debe proporcionar una regeneración eficiente en los cultivares, desafortunadamente la regeneración de plantas en cafeto depende estrictamente del germoplasma (Ribas *et al.*, 2006); como ejemplo de esto, se puede observar con *C. canephora* que muestra un respuesta más rápida a su regeneración comparada con *C. arabica*, aunque ambas especies presentan variabilidad en respuesta a cultivos de tejidos entre diferentes cultivares de mismas especies.

Uno de los protocolos de mayor uso para la inducción de la embriogénesis somática directa en caféto es el descrito por Yasuda *et al.* (1985) que Quiróz-Figueroa *et al.*, (2005) más tarde reporta para la obtención de embriones de *C. canephora* el cual complementó con benzilaminopurina (BAP). Estos investigadores indican la aparición de un callo blanco friable en el borde de los explantes 16 semanas después de la incubación de los explantes (segmentos de hoja de *Coffea arabica* L.); cuatro semanas después de la aparición del callo, se encontró la presencia de tejidos globulares y embriones somáticos diferenciados sobre la superficie del callo. Este resultado se pudo observar en el protocolo para regeneración que se siguió en este trabajo, donde se obtuvieron embriones aproximadamente a los 6 a 7 meses de la inducción de los explantes de *C. arabica* al proceso de embriogénesis somática, en donde se utilizó como medio de inducción el reportado por Quiróz-Figueroa *et al.*, (2005) adicionado con la citocinina Benzilaminopurina (BAP) como único regulador de crecimiento, el cual como reporta Dublin, (1991) tiene cierta influencia en la embriogénesis somática de *C. arabica*. En cuanto al explante del cuál se partió para llevar a cabo la inducción a embriogénesis, estos fueron círculos foliares debido a su gran disponibilidad y fácil desinfección tal como reporta Dublin, (1991) ya que no se presentó ningún tipo de contaminación en los medios de cultivo ni en los explantes inducidos a embriogénesis.

Debido a que el protocolo utilizado en este trabajo relacionado con la embriogénesis somática no reporta problemas en cuanto a la obtención de embriones en caféto, es posible que la inserción de los plásmidos pRG (Figura 3.1) hayan interferido en la formación de los embriones. En los explantes transformados con los plásmidos pRG395 (Figura 3.3d) y pRG233 (Figura 3.4e), aunque se formaron embriones, muy pocos de estos germinaron y lograron llegar a la etapa de plántulas, las cuáles presentaron sobrevivencia por pocos días. Dado que no se encontró ningún reporte de la influencia negativa en la inserción de plásmidos de transformación que afecten al procesos de embriogénesis somática, se podría sugerir que la integración de los plásmidos con el gen *AVP1* pudo ocasionar la inhibición de la germinación de los embriones formados; esto es, debido a que *avp1* codifica para una enzima de tipo pirofosfatasa implicada principalmente en el transporte de protones hacia el interior de la vacuola y, como reporta Grebe, (2005), basándose en el trabajo de Li *et al.*, (2005), esta pirofosfatasa se encuentra involucrada en la regulación y posible transporte de auxinas, cuyo exceso causa la inhibición de la germinación de embriones en explantes sometidos al proceso de embriogénesis como lo reporta Ayub & Gebieluca, (2003). Es posible que la transformación con dicho gen provocara la muerte de los embriones por exceso en la expresión de la proteína. No obstante, Gaxiola *et al.*, (2001) llevaron a cabo la transformación de *Arabidopsis thaliana* para sobre-expresar el gen *AVP1* de

las misma especie y se obtuvieron plantas tolerantes a altas concentraciones de NaCl; de la misma forma y utilizando el mismo gen de *Arabidopsis thaliana*, Park *et al.*, (2005) obtuvieron plántulas de tomate con una rápida recuperación a períodos de sequía. Aunque ambos trabajos fueron positivos, estos se realizaron en plantas inferiores con ciclos de vida cortos; pero en el caso del cafeto, esta es una planta superior de ciclos de vida largo, por lo que es posible esperar respuestas diferentes a las que se obtuvieron en los 2 casos anteriores.

Dicha hipótesis se basa tomando en cuenta los embriones obtenidos mediante la transformación con el plásmido pRG394 (Figura 3.5b,c y d), que nos permitió la obtención de embriones que se cree fue debido a la ausencia del gen *AVP1* en su estructura, por lo que proponemos llevar a cabo un estudio que investigue el papel que podría tener la pirofosfatasa vacuolar dentro del proceso de embriogénesis somática como transportador de fitoreguladores como las auxinas.

La transformación de explantes de plántulas de la especie *C. arabica* siguiendo el protocolo de Canché-Moo *et al.*, (2005); esto, debido a la obtención exitosa de plántulas transformadas de *C. canephora* con el gen *WUSHEL*; dicho protocolo incluía el proceso de infiltración al vacío, donde numerosas publicaciones para diferentes especies de cultivos reportan la posibilidad de una mayor eficiencia de transformación con *Agrobacterium tumefaciens*.

Tomando los resultados de PCR que se presentaron anteriormente, podemos sugerir que el protocolo de transformación realizado para *C. arabica* funciona, ya que como se observa en la Figura 3.9, se encontraron los fragmentos amplificados que corresponden a la presencia del promotor 35S, el cuál se encuentra dentro de los plásmidos pRG, lo que nos lleva a sugerir que la integración del plásmido resultó positiva aunque esto solo pudo evaluarse en las plántulas resultantes de explantes transformados con el plásmido pRG394 debido a que los embriones correspondientes a los otros 2 plásmidos pRG no sobrevivieron a la etapa de plántulas.

Numerosos artículos reportan el uso de timetina (Cheng *et al.*, 1998) (ticarcilina y ácido carvulánico) sola o en combinación (Hammershlang *et al.*, 1995) como antibiótico para eliminar la incidencia bacteriana a diferentes concentraciones en diferentes especies de plantas transformadas con cepas bacterianas (Torn *et al.*, 1992; Buckley & Reed 1994; Zimmerman 1995). Lin *et al.*, (1995) reportan el efecto en la eficiencia de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación de tejidos de plantas de *Nicotiana tabacum* transformadas y utilizando 3 cepas bacterianas (LBA4404, C58 y EHA101) y la toxicidad de carbencilina utilizado como

antibiótico para la eliminación de bacterias en los tejidos transformados; encontrando a LBA4404 como la más sensible a dicho antibiótico y que la toxicidad de los explantes se puede presentar en medios MS adicionados con 2,4-D y carbencilina, aunque en cuanto a los embriones obtenidos en la transformación de cafeto se presentaron en pocas ocasiones la presencia visual de cepas bacterianas, por lo que se le llevó a cabo un análisis de PCR para la amplificación del gen *VIR E2* de *Agrobacterium tumefaciens*.

Nauerby *et al.*, (1997), reportan de igual forma que el uso de dicho antibiótico para eliminar bacterias puede tener un rol positivo en la respuesta embriogénica de plantas de las especie *Nicotiana tabacum*; tomado en cuenta dicho reporte, para el caso de los explantes de *C. arabica*, se pudo observar una mayor respuesta a los explantes transformados y control que estuvieron expuestos a tiementina en comparación con explantes control que no contenían dicho antibiótico.

El gen *VIR E2* exclusivo de *Agrobacterium tumefaciens* codifica una proteína que tiene una función importante en la transferencia del T-ADN para insertarse en el ADN nuclear de otros organismos y así llevar a cabo el proceso de transformación genética; el rol de *VIR E2* en dicho proceso es la protección del T-ADN formando un complejo con otras proteínas de la región *vir* que permiten la transferencia al citoplasma y ADN nuclear (Gelvin, 1998); por lo tanto en plantas transformadas el que esté presente este gen *VIR E2* solo indica la presencia del *Agrobacterium tumefaciens* dentro de ellas, por lo que se recomienda realizar una amplificación mediante PCR de un fragmento de dicho gen; en este trabajo se utilizaron cebadores específicos para el gen *VIR E2* para la amplificación de un fragmento de 895 pb detectándose la presencia de dicho gen (Figura 3.10), que demuestra la contaminación de *Agrobacterium tumefaciens* y su ausencia en las plantas con nomenclatura T6, T8, T10 y T48. Sugerimos que la presencia de *Agrobacterium tumefaciens* en las plantas se encontró de manera endógena ya que durante el tiempo en el que se llevó a cabo esta tesis no se detectó la presencia bacteriana en el entorno del medio en el que se encontró el material vegetal.

En el proceso de transformación, no todas las células del tejido vegetal blanco son transformadas, por lo que no todos los embriones formados, ya sea por embriogénesis o por organogénesis darán lugar a una planta transformada; para esto es necesario establecer un protocolo de selección mediante el cual se impida, o al menos se reduzca, la aparición de escapes (embriones no transformados) y se conceda una ventaja a las células que han sido modificadas genéticamente para que estas lleguen a diferenciarse y dar lugar a una plántula completa. Es aquí donde tienen un papel muy importante los genes marcadores de selección como *NTPII* que

le confiere resistencia a antibióticos de la familia de los aminoglicósidos como es el caso de la Kanamicina, esto mediante la fosforilación de dichos antibióticos. Canché-Moo *et al.*, (2006) reporta la utilización de kanamicina como antibiótico de selección para embriones de *C. canephora* a una concentración de 100 mg/ml; tomando en cuenta que *C. arabica* es una especie diferente a *C. canephora* y que presenta respuestas distintas, en este trabajo se realizó una curva dosis-respuesta partiendo de embriones cigóticos, en la que se obtuvieron las concentraciones de 150 y 550 mg/ml para embriones y plántulas respectivamente; los resultados obtenidos caen en el rango utilizado para otras especies de plantas distintas al café.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

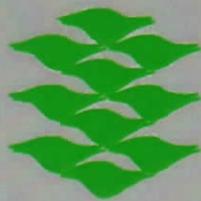
- Ayub R. and A. Gebieluca. (2003). Embrionogenesis somática em genótipos de café (*Coffea arabica*) é citocinina dependente. Ci. Agr. Eng., Ponta Grossa 9(2):25-30.
- Buckley PM and BM Reed. (1994). Antibiotic susceptibility of plant-associated bacteria. HortScience 29:434.
- Canché-Moo R; A. Kú-González, C. Burgeff, V. Loyola-Vargas, L. Rodríguez-Zapata and E. Castaño. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 84(3):373-377.
- Cheng Z; Schnurr and J. Kapaun. (1998). Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. Plant Cell Reports 17:646-649.
- Dublin, P. 1991. Multiplicación vegetativa de café, hevea y cacao. In: Roca, W. M y Mroginsky L. A (Eds.). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Cali, Colombia. Pp 578- 619.
- Gaxiola R; J. Li, S. Undurraga, L. Dang, G. Allen, S. Alper and G. Fink. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. PNAS. 98(20):11444-11449.
- Gelvin S. (1998). *Agrobacterium* VirE2 proteins can form a complex with T strands in the plant cytoplasm. Journal of Bacteriology 180(16):4300-4302.
- Grebe M. (2005). Growth by Auxin: When a weed needs Acid. Science 310:60-61.

- Hammerschlag F; R. Zimmerman, U. Yadava, S. Hunsucker, P. Gercheva. (1995) An evaluation of antibiotics for the elimination of *Agrobacterium tumefaciens* from apple leaf explants in vitro and for the effect of regeneration. HortScience 30:876.
- Li J, H. Yang, W. Peer, G. Richter, J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, B. Titapiwantakun, S. Undurraga, M. Khodakovskaya, E. L. Richards, B. Krizek, A. Murphy, S. Gilroy, R. Gaxiola. (2005). *Arabidopsis* H⁺-PPase AVP1 Regulates Auxin-Mediated Organ Development. Science 310:121-125.
- Lin J; N. Assad-García and J. Kuo. (1995) Plant hormone effect of antibiotics on the transformation efficiency of plant tissues by *Agrobacterium tumefaciens* cell. Plant Science 109:171-177.
- Nauerby B; K. Billing and R. Wyndaele. (1997). Influence of the antibiotic timentin on plant regeneration compared to carbencillin and cefotaxime in concentrations suitable for elimination of *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Science 123:169-177.
- Park S; J. Li, J. Pittman, G. Berkowitz, H. Yang, S. Undurraga, J. Morris, K. Hirschi and R. Gaxiola. (2005). Up-regulation of H⁺-pyrophosphatase (H⁺-PPase) as a strategy to engineer drought-resistant crop plants. PNAS 102(52):18830-18835.
- Quiróz-Figueroa F; M. Monforte-González, R.M. Galáz-Ávalos and V.M. Loyola-Vargas. (2005). Direct Somatic Embryogenesis in *Coffea canephora*. In: Methods in Molecular Biology: Plant Cell Protocols. 2^aEdition. 318:111-117.
- Ribas A; L. Protasio and L. Gonzaga. (2006). Genetic transformation of Coffee. Brazilian J. Plant Physiology 18(1):83-94.
- Tor M; H. Mantell, C. Ainsworth. (1992) Endophytic bacteria expressing β-glucuronidase cause false positive in transformation of *Dioscorea* species. Plant Cell Rep 11:452-456.
- Yasuda T; Y. Fujii and T. Yamaguchi. (1985). Embryogenic callus induction from *Coffea arabica* leaf explants by benziladenine. Plant and Cell Physiology 26(3):593-597.
- Zimmerman TW. (1995). Effect of Timentin for controlling *Agrobacterium tumefaciens* following cocultivation on select plant species. In Vitro Cell Dev Biol 31:70.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

- Actualmente 300 plántulas de cafeto de la especie *C. arabica* que son transferidas cada dos meses a medio de mantenimiento.
- Se obtuvieron 724 explantes foliares con respuesta embriogénica pertenecientes a 3 plásmidos de transformación pRG y testigo; 225 de pRG394, 186 de pRG395, 119 de pRG233 y 194 de testigo de embriogénesis.
- Se obtuvieron 1410 embriones de explantes sometidos a transformación genética pertenecientes a 3 plásmidos denominados pRG, de los cuales 1384 embriones pertenecientes al plásmido pRG394 llegaron a la etapa de plántulas completas.
- Los embriones obtenidos de la transformación con los plásmidos pRG395 y pRG233 no sobrevivieron hasta la etapa de plántulas.
- Las plantas nombradas pRG394T6, pRG394T8, pRG394T10 y pRG394T48 mostraron la presencia de los fragmentos amplificados del promotor 35S y la no presencia del gen *VIR E2* que sugiere la ausencia del *A. tumefaciens*.
- Las plántulas analizadas provenientes de la transformación con el plásmido pRG394 con el par de cebadores 35S y *AVP1*, no presentaron fragmentos amplificados, ya que dicho plásmido tiene ausente el gen *AVP1* de *Arabidopsis thaliana*.



CICY

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A.C.