

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA  
FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

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

**Establecimiento de un sistema *ex vitro* de expresión transitoria del gen reportero mediante  
el sistema CRISPR/Cas9 en *Coffea arabica* L. empleando discos de hojas**

KRYSTELL MUÑOZ RAMÍREZ  
B34796

CIUDAD UNIVERSITARIA RODRIGO FACIO

SAN JOSÉ, COSTA RICA

2022

## HOJA DE APROBACIÓN

### Miembros del comité



---

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



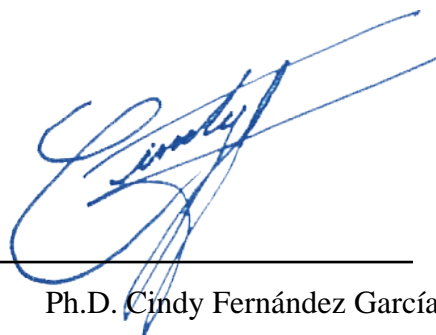
---

M. Sc. Alejandro Hernández  
Escuela de Biología, TEC  
Lector



---

Prof. Dr. Claus-Peter Witte  
Universidad de Hannover  
Lector



---

Ph.D. Cindy Fernández García  
Escuela de Biología, UCR  
Presidente del tribunal de TFG



---

Dr. Federico Albertazzi Castro  
Escuela de Biología, UCR  
Miembro del tribunal de TFG



---

B. Sc. Krystell Muñoz Ramírez  
Escuela de Biología, UCR  
Sustentante

## **DEDICATORIA**

A mis padres por el apoyo incondicional que me han brindado, por ser mis guías y por haberme forjado en la persona que soy. Por sus sacrificios y esfuerzos para brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente; muchos de mis logros de los debo a ustedes entre los que se incluye este.

A mis hermanos y hermana por la mutua motivación para alcanzar nuestras metas y ser mejor cada día.

A mi abuela Elizabeth por brindarme su comprensión y siempre creer en mí.

A Erika, Fabián y Lidia por siempre poder contar con su valioso apoyo.

A mis compañeras y compañeros de laboratorio, quienes compartieron su conocimiento y su disposición para ayudar y enseñar; y todas las personas que me brindaron su colaboración y apoyo durante el proyecto sin los cuales la realización del mismo hubiese sido imposible.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Dr. Andrés Gatica Arias por su guía y confianza para desarrollar dicho proyecto.

Al Dr. Steve Quirós Barrantes por su disponibilidad, ayuda y colaboración.

A los lectores y revisores de tesis por sus valiosas sugerencias y aportes.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Jessica y Randall quienes me brindaron su ayuda, enseñanza y consejo durante la ejecución de esta investigación.

## INDICE GENERAL

Hoja de aprobación .....	ii
Dedicatoria .....	iii
Agradecimientos .....	iv
Índice general .....	v
Índice de figuras .....	viii
Índice de cuadros.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas y unidades .....	xii
Resumen .....	xiii
Introducción.....	1
Marco teórico.....	4
Ruta biosintética de cafeína.....	4
Genes y enzimas involucrados en la biosíntesis de cafeína.....	5
Generalidades de la transformación genética mediada por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ....	7
Características de la edición genética mediante sistema CRISPR/Cas9.....	8
Aplicaciones de la transformación genética y edición de genoma en café .....	10
Ingeniería genética en genes involucrados en la biosíntesis de cafeína.....	12
Perspectiva a futuro de la edición genética para el mejoramiento de café.....	14
Justificación.....	16
Hipótesis.....	18
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Metodología.....	19
Localización de estudio.....	19
Material vegetal.....	19
Transformación genética mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV .....	20
Parámetros empleados para la transformación genética transitoria.....	20
Cultivo <i>A. tumefaciens</i> .....	20
Transformación genética transitoria <i>ex vitro</i> .....	22
Medio de cultivo.....	23
Análisis de expresión transitoria del gen <i>uidA</i> .....	23

<b>Transformación genética con los plásmidos CRISPR mediada por <i>A. tumefaciens</i>.....</b>	<b>24</b>
Comprobación transitoria genética.....	26
Extracción y cuantificación de ADN.....	27
Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído y productos de PCR .....	27
Amplificación del gen <i>18S</i> .....	28
Amplificación del gen <i>virG</i> .....	29
Amplificación del gen <i>turbo-gfp</i> .....	30
Amplificación del gen <i>hptII</i> .....	31
<b>Resultados.....</b>	<b>32</b>
<b>Estandarización de la densidad óptica (DO600) en la expresión transitoria del gen reportero <i>uidA</i> en <i>Coffea arabica</i> L. utilizando <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303.....</b>	<b>32</b>
<b>Estandarización del periodo de agitación en la expresión transitoria del gen reportero <i>uidA</i> utilizando <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303. ....</b>	<b>34</b>
<b>Optimización del periodo de cocultivo en la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en discos de hojas de café mediante <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303.....</b>	<b>36</b>
<b>Extracción y cuantificación de ADN de hojas de café para la comprobación de la inserción del gen reportero mediada por el sistema CRISPR/Cas9.....</b>	<b>38</b>
<b>Comprobación de la presencia del gen <i>18S</i> mediante la transformación con <i>A. tumefaciens</i> AGL1 con los plásmidos CRISPR en discos de hoja de café.....</b>	<b>41</b>
<b>Amplificación del gen <i>virG</i> en la transformación con <i>A. tumefaciens</i> AGL1 con los plásmidos CRISPR empleando discos de hoja de café.....</b>	<b>42</b>
<b>Comprobación de la presencia del gen reportero <i>turbo-gfp</i> en discos de hoja de café transformados con <i>A. tumefaciens</i> AGL1 con los plásmidos CRISPR/Cas9.....</b>	<b>43</b>
<b>Comprobación de la presencia del gen de resistencia a higromicina en discos de hoja de café transformados con <i>A. tumefaciens</i> AGL1 con los plásmidos CRISPR/Cas9.....</b>	<b>44</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>45</b>
<b>Determinación de la densidad óptica (DO600), tiempo de agitación y periodo de cocultivo óptimos en la expresión transitoria del gen reportero <i>uidA</i> en <i>Coffea arabica</i> L. utilizando <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA1303 .....</b>	<b>45</b>
Estandarización de la concentración de la bacteria (DO600) óptima en la expresión transitoria del gen reportero <i>uidA</i> .....	46

Determinación del tiempo de agitación óptimo en la transformación genética de discos de hojas de café.....	48
Determinación del periodo de cocultivo óptimo en discos de hojas de café tras la transformación genética.....	50
<b>Evaluación del protocolo optimizado en la transformación genética y comprobación de la inserción del gen reportero <i>turbo-gfp</i> en el genoma de café .....</b>	<b>53</b>
Cuantificación de ADN.....	53
Determinación por métodos moleculares de la presencia del gen <i>turbo-gfp</i> y el gen <i>hptII</i> en el genoma del café.....	54
<b>Conclusiones.....</b>	<b>56</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>58</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>59</b>

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Biosíntesis de cafeína mediante múltiples metilación de derivados de xantina. (Ashihara et al., 2008).....	2
<b>Figura 2.</b> Metodología empleada para la transformación de discos de hojas de café. Hojas jóvenes con perforaciones realizadas con el dermaroller (A), hojas de café de donde se obtuvieron los discos empleando tubos Eppendorf de 0.5mL (B), discos de hojas (r=0.25 mm)(C).....	20
<b>Figura 3.</b> Esquema del proceso de optimización del protocolo mediante <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303 empleando los parámetros densidad óptica bacteriana (I Fase), periodo de agitación (II Fase) y tiempo de cocultivo (III Fase).....	22
<b>Figura 4.</b> Vector CRISPR/Cas9 correspondiente al plásmido que presenta ARNguías para los genes <i>XMPasa</i> + <i>GDSA</i> , introducido en <i>A. tumefaciens</i> AGL1. El cual presenta el promotor CaM35S, los ARNg bajo el promotor U6, con el gen de selección <i>nptII</i> , que confiere resistencia a la kanamicina y el gen <i>hptII</i> , que presenta resistencia a la higromicina, además del gen reportero <i>turbo-gfp</i> .....	25
<b>Figura 5.</b> Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en segmentos de hoja de café cocultivados con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303 a densidades ópticas ( $DO_{600}$ ) de bacteria de 0.6, 0.80 y 1.0. $DO_{600}=0.60$ (A), $DO_{600}=0.80$ (B) y $DO_{600}=1.0$ (C), Control $DO_{600}= 0.00$ (A). Medición a través de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> . Escala equivalente a 0.25 mm.....	33
<b>Figura 6.</b> Efecto de la concentración bacteriana ( $DO_{600}$ ) en la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en discos de hoja de <i>C. arabica</i> L. ....	33
<b>Figura 7.</b> Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en segmentos de hoja de café cocultivados con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303 con diferentes tiempo de agitación. En donde: 60 min (A), 120 min (B) y 180 min (C), Control: 120 min + cepa silvestre (D). Medición a través de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> . Escala equivalente a 0.25 mm.....	35
<b>Figura 8.</b> Efecto del tiempo de agitación (min) en la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en discos de hoja de <i>C. arabica</i> L.....	35
<b>Figura 9.</b> Expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en segmentos de hoja de café transformadas con <i>A. tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303 con periodo de cocultivo de 1 día (A), 2 días (B), 3 días (C) y el control (cepa silvestre) (D). Medición a través de la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> . Escala equivalente a 0.25 mm.....	37



**Figura 10.** Efecto del periodo de cocultivo (días) en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hoja de *C. arabica* L.....37

**Figura 11.** Análisis de fluorescencia emitida por medio de la proteína, la cual es codificada por el gen reportero *turbo-gfp* presente en los discos de hoja de *C. arabica* L.....39

**Figura 12.** Electroforesis de la amplificación de un fragmento del gen *18S* en muestras de hoja de *C. arabica* L. con plásmidos CRISPR/Cas9. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (plásmido LBA4404), 4) Control positivo 1 (ADN hojas café), 5) Control positivo 2 (ADN hojas café), 6) Cepa AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSHI* #1, 9) ARNg gen *XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #1, 11) Cepa AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSHI* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #2 16) Cepa AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSHI* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #3. En donde #1 representa el primer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos.....41

**Figura 13.** Electroforesis de la amplificación del gen *virG* en muestras de segmentos de hoja de *C. arabica* L. con los plásmidos CRISPR. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (ADN de segmentos de hoja no transformados), 4) Control positivo 1 (plásmido LBA4404), 5) Control positivo 2 (plásmido ATHV), 6)Cepa AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSHI* #1, 9) ARNg gen *XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #1, 11) Cepa AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSHI* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #2 16) Cepa AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSHI* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #3. En donde #1 representa el primer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con cada plásmido. La segunda y tercera transformación se representan con #2 y #3, respectivamente.....42

**Figura 14.** Electroforesis de la amplificación del gen *turbo- gfp* en muestras de segmentos de hoja de *C. arabica* L. con los plásmidos CRISPR. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (ADN de segmentos de hoja no transformados), 4) Control positivo 1 (plásmido Empty CRISPR), 5) Control positivo 2 (plásmido Empty CRISPR), 6)Cepa AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSHI* #1, 9) ARNg gen

*XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #1, 11) Cepa AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSH1* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #2 16) Cepa AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSH1* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #3. En donde #1 representa el primer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con cada plásmido. La segunda y tercera transformación se representan con #2 y #3, respectivamente.....43

**Figura 15.** Electroforesis de la amplificación del gen *hptII* en muestras de segmentos de hoja de *C. arabica* L. con los plásmidos CRISPR. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (ADN de hoja de café sin transformación) 4) Control positivo 1 (plásmido LBA4404), 5) Control positivo 2 (plásmido ATHV), 6) Cepa AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSH1* #1, 9) ARNg gen *XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #1, 11) Cepa AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSH1* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #2 16) Cepa AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSH1* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg *XMPasa* + *GDSA* #3. En donde #1, #2 y #3 representa el primer, segundo o tercer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con cada plásmido.....44

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Medios de cultivo empleados en el cocultivo de discos de hoja de café con <i>A. tumefaciens</i> ATHV con el vector binario pCAMBIA 1303.....	23
<b>Cuadro 2.</b> Reactivos del buffer de extracción empleado para la obtención de ADN proveniente de los discos de hoja de <i>C. arabica</i> L.....	27
<b>Cuadro 3.</b> MasterMix utilizada en la amplificación del gen <i>18S</i> .....	28
<b>Cuadro 4.</b> MasterMix utilizada en la amplificación del gen <i>virG</i> .....	29
<b>Cuadro 5.</b> MasterMix a emplear en la amplificación del gen <i>turbo-gfp</i> .....	30
<b>Cuadro 6.</b> MasterMix por utilizar en la amplificación del gen <i>hptII</i> .....	31
<b>Cuadro 7.</b> Efecto de la concentración bacteriana (DO600) en la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en discos de hoja de <i>C. arabica</i> L. mediante la transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303.....	34
<b>Cuadro 8.</b> Efecto del tiempo de agitación (min) en la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en discos de hoja de <i>C. arabica</i> L. mediante la transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> ATHV::pCAMBIA 1303.....	36
<b>Cuadro 9.</b> Efecto del periodo de cocultivo (días) en la expresión transitoria del gen <i>uidA</i> en discos de hoja de <i>C. arabica</i> L. ....	38
<b>Cuadro 10.</b> Cuantificación de ADN de los discos de hojas de <i>C. arabica</i> L. transformados con <i>A. tumefaciens</i> AGL1 con los plásmidos CRISPR/Cas9 mediante Nanodrop Lite. ....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS Y UNIDADES

° C: Celcius

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADN-T: Ácido desoxirribonucleico de transferencia

AMP: Nucleótidos de adenina

AMP: Nucleótidos de adenina

ARN: Ácido ribonucleico

ARNg, ARN sg: Ácido ribonucleico guía

ARNi: Ácido ribonucleico de interferencia

ARNcr: Ácido ribonucleico de CRISPR

ARNtranscr: Ácido ribonucleico trans-activador

CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CTAB: Cetil-trimetil bromuro de amonio

DMSO: sulfoxido de dimetilo

DO600: Densidad óptica

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

GFP: Green fluorescent protein

LB: Luria-Bertani

MgCl<sub>2</sub>: Cloruro de magnesio

MS: Murashige & Skoog

MXMT: 7-N-metilxantina metiltransferasa

NaCl: Cloruro de sodio

NaPO<sub>4</sub>: Fosfato Trisódico

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

ZNF: Zinc Finger Nuclease

μL: Microlitros

μM: Micromolar

## **Establecimiento de un sistema *ex vitro* de expresión transitoria del gen reportero mediante el sistema CRISPR/Cas9 en *Coffea arabica* L. empleando discos de hojas**

Krystell Muñoz Ramírez

**Resumen.** El café (*Coffea* spp.) es un cultivo de importancia económica a nivel mundial por su valor como bebida de consumo. La cafeína es un compuesto de interés por sus efectos estimulantes producido mediante una ruta bioquímica de síntesis del café. La síntesis ocurre mediante la múltiple metilación de derivados de xantina. También se ha postulado que la xantosina se podría generar a partir de la adenosina producida como subproducto en las reacciones de metilación, a partir de la biosíntesis *de novo* de purina, mediante nucleótidos de adenina y por medio de los nucleótidos de guanina. La guanosina desaminasa tiene un papel importante en generación de xantosina *in vivo* en plantas como *A. thaliana*, ya que esta puede provenir de una fuente diferente a la guanosina, como lo es la desfosforilación de la xantosina monofosfato (XMP). Estos estudios sobre la biosíntesis de metabolitos secundarios han permitido que la ingeniería genética sea una herramienta para obtener plantas con características deseadas, como lo el caso de *C. arabica* L. donde por medio de herramientas como el ARNi, los genes clave en la ruta metabólica de la cafeína fueron dilucidados, obteniendo así bajo contenido de cafeína.

La edición de genomas mediante CRISPR/Cas9 se puede modificar la productividad de los cultivos como maíz, arroz e incluso café, por medio de la modificación de genes en la síntesis de compuestos orgánicos. Este sistema permite realizar cortes en sitios específicos en la cadena doble de ADN generando mutaciones, deleciones e inactivaciones de genes. Para la edición de genomas en café, se han reportado genes candidatos para tolerancia a sequía en *C. arabica* L, genes involucrados en la síntesis de compuestos lipídicos, diterpenos importantes en la calidad de taza y genes con actividad galactisol sintasa importantes en la síntesis de azúcares. Además, trabajos realizados en *Coffea canephora* permitieron disminuir la expresión y eliminación del gen de la fitoeno desaturasa (*CcPDS*) por medio de un knockout. En cuanto a la vía de biosíntesis de cafeína, se ha reportado la edición del gen *CsHBI*, logrando disminuir su expresión en un 65% en los callos de plantas de té.

En esta vía de biosíntesis de cafeína, son escasos los reportes que se han realizado sobre el estudio de compuestos involucrados en ella. Por lo que debido a la falta de trabajos aplicando el modelo CRISPR/Cas9, en este proyecto se pretendió establecer un método simple y eficiente de edición genética empleando el sistema CRISPR/Cas9 mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para la inserción del gen reportero empleando discos de hoja de *Coffea arabica* L. Esto se llevó a cabo mediante la optimización de parámetros como la densidad óptica, tiempo de agitación y periodo de cocultivo con el fin de definir un protocolo y evaluarlo mediante la transformación genética transitoria del gen reportero con el sistema CRISPR/Cas9. Luego, se analizó mediante técnicas moleculares la edición de genes involucrados en esta ruta metabólica.

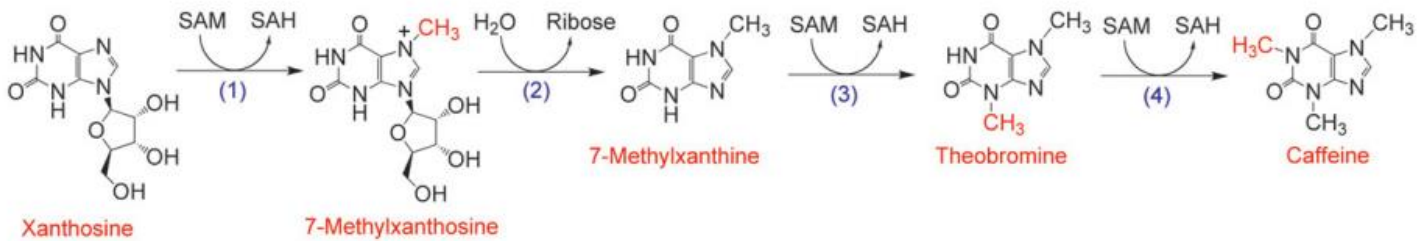
Con esto se obtuvo que la densidad óptima para obtener un mayor porcentaje de explantes con expresión transitoria del gen *uidA* fue con  $DO_{600}=0.8$  ( $51.9 \pm 25.1$ ), con una agitación de 120 min ( $51.7 \pm 24.3$ ), y 2 días de cocultivo ( $50.8 \pm 24.8$ ). Con respecto a la amplificación del gen *18S*, se obtuvieron fragmentos del tamaño esperado. Se comprobó que los explantes no presentaban contaminación por parte de *A. tumefaciens*, ya que las muestras de ADN no amplificaron fragmentos del gen *virG*. Por otra parte, no se logró la inserción de los genes *turbo-gfp* y *hptII* mediante *A. tumefaciens* AGL1 en el genoma de café, ya que no se presentaron fragmentos de ADN amplificados para el gen reportero y el gen de resistencia a higromicina. Según los parámetros optimizados, existe una influencia entre la presencia de heridas, la concentración bacteriana, la agitación y el periodo de cocultivo con la eficiencia de la expresión transitoria del gen *uidA*. Ya que al exponer explantes a periodos cortos de contacto con la bacteria la transferencia de genes es poco eficiente, pero lapsos largos de infección pueden generar necrosis y contaminación. En *Coffea* spp, algunos resultados reportados en la literatura coinciden con los obtenidos, sin embargo, existen otros parámetros que se deben analizar, contemplar y adecuar dependiendo del explante y planta con la que se desee realizar transformaciones genéticas. Además, considerar factores como temperatura y la virulencia de la bacteria.

**Palabras clave:** *Agrobacterium tumefaciens*; cafeína, *Coffea arabica* L.; CRISPR/Cas9; edición genética; transformación genética

## 1. INTRODUCCION

El café (*Coffea* spp.) es un cultivo de importancia económica por su valor como bebida de consumo (Mishra & Slater, 2012), siendo uno de los productos agrícolas con mayor relevancia a nivel mundial, ocupando el segundo puesto en el comercio internacional (Mishra, 2019). Entre las especies más cultivadas se encuentran *Coffea arabica* L., *C. canephora* L. y *C. liberica* L., de las cuales *C. arabica* L. produce entre el 70 y 90% del café comercializado (Mishra, 2019). El cultivo de café se lleva a cabo en zonas tropicales y subtropicales (Davis et al., 2012), por lo que en esos sitios se ha reportado que más de ciento veinticinco millones de personas dependen económicamente de la producción de este (Mishra, 2019).

De este cultivo se logra extraer la cafeína, la cual es un compuesto alcaloide derivado de la purina y se estima que la cafeína tiene un consumo global de 120.000 toneladas por año (Mazzafera, 2012). Este compuesto ha sido de interés, por lo que se ha investigado su biosíntesis en plantas de té (Ma et al., 2021), café (Uefuji et al., 2005), tabaco (Uefuji et al., 2005) y en *Arabidopsis thaliana* (Dahncke & Witte, 2013; Yin et al., 2014; Baccolini & Witte, 2019). En las plantas de café, la síntesis de cafeína se da mediante la múltiple metilación de derivados de xantina (Figura 1). El primer paso es la metilación de xantosina por xantosina metiltransferasa (XMT), produciendo 7-metilxantosina, este compuesto obtenido es metilado por la 7-N-metilxantina metiltransferasa (MXMT o teobromina sintasa), generando así 3, 7-dimetilxantina (teobromina). Luego, la teobromina se metila con 3, 7-dimetilxantina metiltransferasa (DXMT o cafeína sintasa) para generar así la cafeína (1, 3, 7-trimetilxantina) (Zrenner et al., 2006). Además de la triple metilación de la xantosina para la obtención de cafeína, se ha postulado que la xantosina se podría generar por al menos cuatro rutas biosintéticas: a partir de la adenosina producida como subproducto en las reacciones de metilación (ciclo SAM), a partir de la biosíntesis de novo de purina, mediante nucleótidos de adenina (AMP) y finalmente por medio de los nucleótidos de guanina (GMP) (Ashihara et al., 2008).



**Figura 1.** Biosíntesis de cafeína mediante múltiples metilaciones de derivados de xantina: (1) 7-metilxantósina sintasa (xantósina N-metiltransferasa); (2) N-metilnucleosidasa; (3) teobromina sintasa (monometilxantina N-metiltransferasa); (4) cafeína sintasa (dimetilxantina N-metiltransferasa); (3–4) cafeína sintasa de doble función. La obtención de cafeína a partir de xantósina se debe a N-metiltransferasas que presentan diferente especificidad de sustrato. Los pasos 1 y 2 de la biosíntesis de cafeína son catalizados por la xantósina N-metiltransferasa. SAM, S-adenosil-L-metionina; SAH, S-adenosil-L-homocisteína. (Ashihara et al., 2008).

En *A. thaliana*, se ha descrito que la guanosina desaminasa (*GSDA*), tiene un papel importante en generación de xantósina *in vivo* (Dahncke & Witte, 2013). En esta planta modelo, se ha determinado por mutaciones que la xantósina se deriva de la guanosina por desaminación y también podría provenir de una fuente diferente a la guanosina, como lo es la desfosforilación de xantósina monofosfato (XMP). Esta desfosforilación es realizada por una fosfatasa específica de XMP (XMPP), la cual presenta ortólogos potenciales en plantas superiores, incluido el café (Heinemman et al., 2021, Voß et al., 2022). También en *A. thaliana*, se ha reportado la degradación de xantósina a través de un complejo conformado por nucleósido hidrolasa 1 (NSH1) y nucleósido hidrolasa 2 (NSH2), produciendo ribosa y xantina, que luego se degrada en el catabolismo del anillo de purinas (Riegler et al., 2011; Baccolini & Witte, 2019).

El estudio de biosíntesis de metabolitos secundarios ha permitido que la ingeniería genética sea una herramienta eficaz y potencial para obtener plantas con características deseadas (Melese, 2016; Villalta-Villalobos & Gatica-Arias, 2019), por lo que se han desarrollado metodologías para obtener plantas con menor contenido de compuestos químicos. Silvarolla et al., (2004) seleccionaron variantes de *C. arabica* L. con bajo contenido de cafeína, sin embargo, las plantas



no presentaron floración uniforme y su rendimiento se vio disminuido. En *C. canephora*, se reguló un gen involucrado en la biosíntesis de cafeína por medio de ARN de interferencia, obteniendo plantas con contenido de cafeína reducido entre un 50 y 70% (Ogita et al., 2004). No obstante, la fertilidad fue baja y no se desarrollaron granos de café (Borrell, 2012).

Otro método para mejoramiento del cultivo es la edición de genomas mediante CRISPR/Cas9, la cual se ha utilizada para modificar la productividad de los cultivos como el maíz al expresar genes de regulación que interfieren en la interacción de etileno con el receptor de la hormona objetivo, esto por medio del silenciamiento de la hormona responsable de reducir la división y el crecimiento celular. De esta manera, las plantas sintetizaban menos etileno en condiciones de sequía, generando menores pérdidas de cosecha y logrando el crecimiento de las plantas (Shi et al., 2017). En estudios realizados en arroz (Sun et al., 2017), se generaron plantas con calidad nutricional superior al modificar la ruta de síntesis del almidón mediante la edición genética por CRISPR/Cas9. Por medio de la edición genética del gen *SBEIIb*, que juega un papel importante en la síntesis de la amilopectina se obtuvieron granos con mayor porcentaje de amilosa, ya que se considerada una de las formas moleculares del almidón más saludables (Royo et al., 2020). También, se ha realizado edición de genoma en *A. thaliana*, plantas de té, tabaco, lechuga, petunia, trigo, soya, manzana y uva, obteniendo plantas resistentes a agentes patógenos, factores abióticos; y modificaciones en la expresión de genes involucrados en la síntesis de compuestos orgánicos. (Ortega et al., 2013; Malnoy et al., 2016; Liu et al., 2016; Liang 201; Liang et., 2019; Ma et al, 2021).

Para emplear edición de genomas en café, es necesario identificar los genes específicos relacionados a las características que se desean modificar (Sant'Ana et al., 2018; Vats et al., 2019). Se han reportado genes candidatos para tolerancia a sequía en *C. arabica* L. (Mofatto et al., 2016), genes involucrados en la síntesis de compuestos lipídicos diterpenos importantes en la calidad de taza y genes con actividad galactisól sintasa importantes en la síntesis de azúcares (Ivamoto et al., 2017).

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1 Ruta biosíntesis de cafeína

El inicio del proceso de biosíntesis de cafeína se da mediante la xantosina, la cual es un nucleósido derivado del catabolismo de nucleótidos como la xantina y la ribosa, las cuales están presentes en todas las plantas (Zrenner et al., 2006). Se han descrito al menos cuatro rutas biosintéticas por las cuales se genera la xantosina: a partir de la adenosina producida como subproducto en las reacciones de metilación (ciclo SAM), a partir de la biosíntesis de purina *de novo*, mediante nucleótidos de adenina (AMP) y por medio de los nucleótidos de guanina (GMP) (Ashihara et al., 1995; Zrenner et al., 2006; Ashihara et al., 2008).

Para la biosíntesis de xantosina mediante adenosina producida por metilaciones, se ha reportado mecanismos que se encuentran estrechamente relacionados y las rutas no son independientes. Estos procesos de producción de cafeína involucra tres reacciones de metilación y una reacción de nucleosidasa. Dicho proceso inicia al darse la metilación de la xantosina mediante una la 7-metilxantosina sintasa obteniendo como producto una molécula de 7-metilxantosina (Uefuji et al., 2003; Ashihara et al., 2008). Seguidamente, un segundo paso se da mediante una nucleosidasa llamada N-metilnucleosidasa que cataliza la hidrólisis de la 7-metilxantosina, produciendo así la 7-metilxantina. Las últimas dos reacciones restantes en la biosíntesis de cafeína involucran una enzima N-metiltransferasa dependiente de SAM (S-adenosil-L-metionina). Esta enzima recibe el nombre de cafeína sintasa y se encarga de la conversión de 7-metilxantina en cafeína a través de la teobromina (Ashihara et al., 2008).

Otro proceso de síntesis de xantosina es llevada a cabo mediante la biosíntesis de purina *de novo*, en este los nucleótidos de purina se sintetizan mediante vías de recuperación y de novo (Ashihara & Crozier, 1999; Zrenner et al., 2006; Ashihara et al., 2008). La inosina monofosfato (IMP), es el primer producto formado en la ruta de purinas y esta relacionado también con la formación de xantosina. La IMP forma xantosina monofosfato (XMP) mediante la intervención de las enzimas IMP deshidrogenasa y 5'-nucleotidasa (Keya et al., 2003; Ashihara et al., 2008)

En cuanto a la ruta de nucleótidos de adenina (AMP) para generar xantosina, este proceso inicia con adenosín-monofosfato (AMP) que al interactuar con la enzima AMP desaminasa

propicia la formación de inosina-monofosfato (IMP), luego una IMP deshidrogenada genera una xantosina monofosfato (XMP) forma xantosina por medio de la interacción con la enzima 5'-nucleotidasa (Koshiishi et al., 2001; Ashihara et al., 2008). Finalmente, se ha descrito la formación de xantosina de la biosíntesis de café también puede ser producida por nucleótidos de guanina (GMP). En esta ruta, la guanina genera guanosina, y esta guanosina produce moléculas de xantosina, en este proceso las reacciones son mediadas por la enzima guanosina deaminasa (Negishi et al., 1988; Negishi et al., 1994; Stasolla et al., 2003; Ashihara et al., 2008).

En *A. thaliana*, se ha descrito la enzima guanosina desaminasa (*GSDA*), la cual resulta ser importante en el proceso de generación de xantosina *in vivo* (Dahncke & Witte, 2013). Sin embargo, es posible que un porcentaje de las xantosinas presentes en esta planta provenga de una posible desfosforilación de xantosina-monofosfato y no de la desaminación de la guanosina. Se ha descrito una xantosina monofosfato fosfatasa (*XMPP*) en *A. thaliana*, que presenta secuencias similares en plantas como el café, y participa en la producción de xantosina (Heinemann et al., 2021). En el modelo de degradación de guanosín monofosfato (GMP) de *A. thaliana*, el GMP es desfosforilado por una fosfatasa, formándose la guanosina. Esta a su vez es desaminada a xantosina por *GSDA* o recuperada en nucleótidos y ácidos nucleicos. La hidrólisis de xantosina a xantina y ribosa es catalizada por el complejo *NSH1/NSH2*. La xantosina y la xantina se degradan a través del catabolismo del anillo de purina (Riegler et al., 2011; Dahncke & Witte, 2013).

## **2.2 Genes y enzimas involucrados en la biosíntesis de cafeína**

Muchos genes que son codificados por enzimas presentes en la biosíntesis de la cafeína se han logrado encontrar en diferentes especies de la familia Rubiaceae (Ogawa et al., 2001; Uefuji et al., 2003). Se han logrado identificar genes de N-metiltransferasa como lo son xantosina metiltransferasa (*XMT*), 7-metilxantina metiltransferasa o teobromina sintasa (*MXMT/CTS*) y 3,7-dimetilxantina metiltransferasa o cafeína sintasa (*DXMT/CCS*), los cuales están involucrados en la biosíntesis de cafeína (Kato & Mizonu, 2004).

Se ha reportado que un solo gen codifica la xantosina metiltransferasa (*XMT*), esta muestra expresión genética en hojas, botones florales y granos verdes de *C. arabica*. (Mizuno et al., 2003b; Ashihara et al., 2008). En el caso de la 7-metilxantina metiltransferasa (*MXMT*), se han encontrado hasta el momento tres genes que pueden codificar esta enzima. Entre los genes que codifican la *MXMT* se encuentran el gen *MXMT1*, *MXMT2* y *CTS2*. Estos presentan diferencias en su secuencia genética, ya que presentan inserciones o deleciones, además sus propiedades catalíticas también son diferentes. Se expresan en hojas tiernas, botones florales y granos inmaduros, pero no maduros (Mizuno et al., 2003a; Kato & Mizono, 2004; Ashihara et al., 2008).

Para la 3,7-dimetilxantina metiltransferasa (cafeína sintasa) se han identificado tres genes que la codifican; *DXMT*, *CCSI* y *CtCS7*, cada uno de los cuales codifica un polipéptido que consta de 384 aminoácidos. Sin embargo, sus propiedades cinéticas difieren, por ejemplo, *DXMT* y *CCSI* muestran valores de concentración de sustrato a la cuál la velocidad de reacción es la mitad de la velocidad máxima para teobromina diferentes. En cuanto a perfiles de expresión también se presentan diferencias, *DXMT* se expresa exclusivamente en granos inmaduros, mientras que la expresión de *CCSI* ocurre en todos los tejidos. La presencia de isoformas de estas enzimas con diferentes propiedades sugiere que la cafeína se sintetiza a través de múltiples vías dependiendo de la disponibilidad y concentración de los sustratos (Mizuno et al., 2003a, b; Ogawa et al., 2001; Uefuji et al., 2003).

La guanina desaminasa (GDA) es una enzima que contiene zinc involucrado en el metabolismo de los nucleótidos. La guanósín desaminasa está involucrada en la desaminación de la *GSDA* y de esta se puede generar xantosina, que a su vez forma parte de la ruta biosintética de cafeína (Dahncke & Witte, 2013). La xantosina luego se convierte en xantina, un intermediario clave en el metabolismo de las purinas y el reciclaje de nitrógeno. Este proceso se lleva a cabo mediante un mecanismo de protonación generando reordenamientos estructurales tanto en el sustrato como en la enzima (Jia et al., 2021). Se ha reportado la actividad de genes ortólogos de *GSDA* en plantas como *A. thaliana*, *C. arabica*, *Camellia sinensis*, *Solanum tuberosum*, *Theobroma cacao* y *Glycine max* ((Negishi et al., 1994; Katahira & Ashihara, 2006; Keya et al., 2003; Koyama et al.,

2003; Werner et al., 2008). Esta comparación de secuencias ha permitido determinar que la desanimación se conserva en grupos, además los residuos necesarios para la unión al sustrato provienen de una estructura cristalina de GDA. Esta estructura se conserva entre GSDA y GDA, con la diferencia de un triptófano (Trp) en GDA, que se intercambia por leucina (Leu) en GSDA de planta (Liaw et al., 2004; Dahncke & Witte, 2013). Se ha determinado que, en hojas jóvenes de té, *N. benthamiana* y *A. thaliana*, la guanósín desaminasa presenta una mayor expresión (Negishi et al., 1994; Dahncke & Witte, 2013).

En estudios donde se ha analizado la expresión del nucleósido hidrolasa 1, se ha determinado características bioquímicas como la actividad hidrolítica de uridina, inosina y adenosina (Versées et al., 2001; Jung et al., 2011; Riegler et al., 2011). Además de la adenosina y la inosina, en las plantas se encuentra otra purina, la xantosina, que actúa como un metabolito central en la vía de degradación de las purinas. Se ha demostrado que el complejo NSH1/NHS2 también presenta actividad de hidrólisis para xantosina. La enzima NSH2 es la encargada principalmente de la hidrólisis de xantosina, esta NSH2 es activada mediante la enzima NSH1 (Baccolini & Witte, 2019). Con relación a perfiles de expresión, se expresa en partes aéreas de plantas, semillas y raíces (Jung et al., 2009; Jung et al., 2011).

### **2.3 Generalidades de la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens***

La transformación genética ha sido empleada en investigaciones ya que permite modificar las funciones de genes de interés al sobreexpresarlos o silenciarlos, y para obtener las características deseadas (Gelvin, 2003; Albuquerque et al., 2009). La transformación genética puede realizarse mediante físicos, entre los cuales están la electroporación y la biobalística, o métodos biológicos. Entre ellos el uso de bacterias del género *Agrobacterium* sp ha sido el método más utilizado (Ribas et al., 2006; Fernández et al., 2010). La transformación genética de plantas se refiere a la integración de ADN foráneo en una célula vegetal con la finalidad de otorgarle características que antes no poseía, o modificar genes de la planta al alterar sus niveles de expresión mediante técnicas de ingeniería genética (Ribas et al., 2011; da Silva & Menéndez-Yuffá, 2003). Esto puede

realizarme por medio de *Agrobacterium tumefaciens*, ya que permite la transferencia de segmentos largos de ADN con extremos definidos y con un rearrreglo mínimo, integración de un número bajo de copias del gen en zonas transcripcionales activas de cromosomas, alta calidad y fertilidad de las plantas (Fernández et al., 2010; Pacurar et al., 2011).

El método de infección de *A. tumefaciens* (actualmente llamada *Rhizobium radiobacter*) se basa en la transferencia de una pequeña parte de su ADN (ADN-T), localizado en la parte del genoma que induce la formación de tumores (Ti) en el genoma nuclear del organismo hospedero (Ribas et al., 2011). El plásmido de la bacteria posee una región de virulencia (vir), en la cual los genes de virulencia intervienen en transporte del ADN-T. Esta región es regulada por compuestos fenólicos que se producen cuando se da una lesión o herida en la planta (Mishra et al., 2002). Para lograr la transformación genética mediante *A. tumefaciens* se debe aumentar la permeabilidad de la membrana celular para el traspaso del ADN-T en el tejido vegetal y lograr que se introduzca el ADN foráneo en la célula (Ribas et al., 2006; Mishra & Slater, 2012).

Una vez que *A. tumefaciens* logra penetrar a través de heridas en la epidermis, se adhiere a la pared externa de una célula vegetal para transferir un fragmento del ADN de transferencia (ADN-T), hasta el núcleo, de modo que se integre en uno de los cromosomas, y, por ende, las células descendientes por división de esa célula portarán este fragmento (Pacurar et al., 2011; Mishra & Slater, 2012). La frecuencia de éxito de una transformación depende del tipo de explante, genotipo y condiciones de selección como fotoperiodo, tiempo de cocultivo, periodo de agitación, temperatura y concentración de la bacteria (Ribas et al., 2006).

#### **2.4 Características de la edición genética mediante sistema CRISPR/Cas9**

El sistema de edición de genoma CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) representa una de las tecnologías en auge en el área de la biotecnología molecular (Sander & Joung, 2014; Malzahn et al., 2017). La edición de genomas mediante CRISPR/Cas consiste en un complejo conformado por una endonucleasa Cas9 y su respectiva

ARN guía (ARNg). En bacterias y arqueas, este sistema está presente como un mecanismo de defensa inmune. Estas incorporan ADN de bacteriófago entre sus secuencias palindrómicas repetidas y generan un ARN mediante su transcripción llamado ARNcr (Barrangou et al., 2007; Barrangou, 2013). Con este sistema de defensa, al darse una reinfección, el ARNcr en conjunto con la proteína Cas reconoce el transcrito del patógeno y es Cas quien degrada el ARNm (Lammoglia-Cono et al., 2016).

El sistema CRISPR/Cas se ha aprovechado en la ingeniería genética para la activación de genes, reprimirlos o silenciarlos, inducir mutaciones puntuales, cambiar secuencias mediante recombinaciones homólogas y evaluar la fisiología celular mediante la activación o represión simultánea de diversos genes, debido a su actividad como endonucleasa y capacidad de reconocimiento en secuencias específicas (Lammoglia-Cobo et al., 2016). Ya que este complejo permite realizar cortes en sitios específicos en la cadena doble de ADN generando mutaciones, deleciones e inactivaciones de genes (Barrangou et al., 2007; Xie & Yang, 2013). CRISPR/Cas al igual que la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, ha permitido obtener características de interés en cultivos, tales como resistencia a enfermedades, estrés abiótico, mayor rendimiento y edición de genes (Malzahn et al., 2017).

Para la aplicación de esta técnica en la biotecnología vegetal, este sistema ha sido modificado para poder ser empleado en la edición de genomas (Xie & Yang, 2013; Bortesi & Fischer, 2015). La enzima Cas9 forma un complejo de dos moléculas: ARNcr (ARN CRISPR) y ARNtranscr (trans-activador ARNcr), estas fueron adaptadas mediante una combinación de ambas para obtener una nueva molécula denominada ARN guía. La secuencia líder del ARN guía presente en el extremo 5', dirige el complejo ARNg/Cas9 al sitio específico del ADN, y se une al sitio por complementariedad (Ran et al., 2013). A su vez, en este sitio específico del ADN se presenta una región PAM, necesaria para que la enzima Cas9 se adhiera y pueda realizar cortes. Esta secuencia PAM (protospacer adjacent motif) está conformada entre 2 a 6 nucleótidos (Ran et al., 2013; Lammoglia-Cobo et al., 2016).

Cuando la enzima Cas9 realiza un corte en el sitio objetivo, se introducen inserciones o deleciones, generando así mutaciones. Dado que el mecanismo de reparación mediante uniones no homólogas (NHEJ) puede generar errores, el sistema CRISPR/Cas9 es ampliamente utilizado para producir deleciones, mutaciones, desactivación o activación de genes (Brinkman et al., 2018). La inactivación de genes mediada por NHEJ es la forma más sencilla de modificación dirigida, y generalmente se usa para eliminar genes que tienen una influencia negativa en un rasgo de interés en la planta (Bortesi & Fischer, 2015, Borelli et al., 2018). Existe otro mecanismo de reparación dirigida por homología (HDR), en esta es necesaria un molde de ADN que se introduce en el sitio del corte, esta plantilla presenta una alta homología de secuencia en las zonas por reparar (Sander & Joung, 2014; Lammoglia-Cobo et al., 2016; Borelli et al., 2018). Este mecanismo es utilizado para insertar una secuencia o reparar una mutación en una parte específica de un gen (Kamburova et al. 2017; Malzahn et al. 2017).

Para garantizar un mayor éxito en la edición de genoma mediante el sistema CRISPR/Cas9, se sugiere el diseño de varias ARNg por cada sitio blanco, puesto que éstos no son eficientes en su totalidad. Existen factores que afectan la eficiencia de las ARNg como el porcentaje de guanina-citocina (GC), estructuras secundarias y el nivel de expresión (Baysal et al., 2016). A su vez, los ARNg diseñados pueden aparearse a sitios objetivos no deseados en el ADN, conocido como mutaciones “off-target”, siendo esta una de las principales desventajas del sistema CRISPR/Cas9. Para evitar estas mutaciones, las regiones objetivo deben diferir en al menos cuatro o más pares de bases de otras secuencias similares en el genoma de la planta (Baysal et al., 2016; Lammoglia-Cobo et al., 2016).

## **2.5 Aplicaciones de la transformación genética y edición de genoma en café**

La transformación genética mediante *A. tumefaciens* se ha llevado a cabo en café empleando diversos explantes, sin embargo, la creación de protocolos es baja, por lo que afecta de manera negativa el uso y aplicación (Ribas et al., 2011; Mishra & Slater, 2012). Debido a esto, definir



condiciones óptimas es necesario para implementar este método en investigaciones y producción de plantas de interés comercial y así obtener células transformadas de manera estable y mayor rendimiento de esta aplicación genética (da Silva & Menéndez-Yuffá, 2003; Ribas et al., 2011).

Las estrategias de modificación genética han permitido transformaciones a bajo costo y con un procedimiento sencillo, con la posibilidad de introducir fragmentos de ADN y altas tasas de eficiencia en numerosas especies (Ribas et al., 2011). Estas técnicas han sido implementadas en cultivos como el café para su mejoramiento genético, debido a que presenta importancia en áreas como la agricultura y comercio (Fernández et al., 2010). Los primeros reportes sobre modificación genética en café se presentan a inicios de la década de 1990, en los cuales se realizó transformación genética empleando protoplastos de *C. canephora* mediante cepas de *A. tumefaciens* (Spiral & Petiard, 1991; Spiral et al., 1993), embriones somáticos de *C. arabica* L. utilizando electroporación para integrar el ADN foráneo (Barton et al., 1991) y segmentos de hipocótilos de *C. arabica* L. (Ocampo & Manzanera, 1992).

Como resultado del avance en los métodos de transformación genética, se ha dado un incremento en la cantidad de plantas modificadas, implicando a su vez un avance en los protocolos de transformación genética (Carneiro, 1999; Pua & Davey, 2007). En el establecimiento de protocolos de transformación genética en café se presentan: transformación en *C. arabica* L. evaluando la resistencia a kanamicina, expresión del gen *uidA* y el grado de infección de la cepa *A. tumefaciens* (Gimenez et al., 1994), en el cual se obtuvo un efecto inhibitor del antibiótico en el crecimiento del explante e infección eficaz por parte de la bacteria. También se ha reportado la transformación de callos embriogénicos de *C. canephora*, en donde la prueba histoquímica GUS fue positiva y se desarrollaron plántulas, de donde posteriormente se tomaron muestras y se obtuvo la amplificación para los genes *hpt* y *uidA* (Hatanaka et al., 1999). En esta misma especie, se han logrado transformar embriones cigóticos y somáticos, hipocótilos y segmentos de hojas, en donde se determinó la expresión transitoria del gen *uidA* (Mishra et al., 2002).

En estudios realizados por Sugiyama et al. (1995) se determinó que la transformación mediada por *A. rhizogenes* puede aplicarse a la producción de plantas de café portando genes foráneos, al obtener plantas que presentaron expresión del gen deseado. Esta bacteria fue utilizada en trabajos de transformación de embriones somáticos y segmentos de hoja de *C. canephora*, obteniendo la adecuada integración de transgenes (Sugiyama et al., 1995). En *C. arabica* se han reportado protocolos de raíces transformadas a partir de hipocótilos de embriones cigóticos (Alpizar et al., 2006; Alpizar et al., 2008).

Además, por medio del uso de *A. tumefaciens*, se ha estudiado la ruta metabólica de síntesis de cafeína. Se introdujeron ARN de interferencia en plantas de *C. arabica* L. y *C. canephora* con la finalidad de suprimir la expresión de los genes *CaMXMT1*, *CaXMT1* y *CaDXMT1*, y de esta manera evaluar la influencia de estos genes en el contenido de cafeína en las plantas, para con esto en un futuro producir café libre de cafeína. Las líneas transgénicas presentaron una reducción de 30-50% en los transcritos de los tres genes en comparación con las plantas control no transformadas (Ogita et al., 2004). También se ha editado el gen *CcPDS* en callos embriogénicos a través de la transformación mediada por *A. tumefaciens*, por medio de algoritmos que permitieron detectar sitios objetivos en el genoma de *C. canephora* para su posterior edición CRISPR/Cas9. En este proyecto se obtuvo que el 30% de las plantas presentaban una mutación; sin embargo, ninguna de las plantas presentó un fenotipo completamente albino y también se observaron anomalías como menor tamaño de las hojas y cambios no deseados en la pigmentación (Breitler et al., 2018).

## **2.6 Ingeniería genética en genes involucrados en la biosíntesis de cafeína**

En *A. thaliana* mediante el análisis metabolómico de mutantes, se ha determinado que genes derivados de xantosinas actúan como un sustrato del nucleósido hidrolasas. Esto ha permitido determinar que compuestos como la xantosina son un metabolito importante en la biosíntesis de alcaloides de purina en plantas productoras de cafeína y teobromina. Se ha visto que en *A. thaliana* al generar mutaciones en genes involucrados producción de xantosina como *GDSA* y *XMPP*, la

concentración de cafeína disminuye, pero al inducir una mutación en el gen *NSHI*, se obtiene una mayor concentración (Dahncke & Witte, 2013).

En *Camellia sinensis* se ha analizado la expresión de *CsHBI* y *yhNMT* al inducir mutaciones en callos, la expresión de *CsHBI* y *yhNMT1* disminuyó un 65 % y un 93 %, respectivamente, y la acumulación de cafeína disminuyó un 97,5 %. Obteniendo como resultado la influencia de *CsHBI* sobre el gen *yhNMT1*. Estos resultados a su vez ayudaron a comprender el mecanismo de regulación de la biosíntesis de cafeína en el té, ya que la inhibición de la expresión del gen del factor de transcripción *CsHBI* en el callo del té podrían regular significativamente la baja la expresión del gen de la cafeína sintasa *yhNMT1* y reducir drásticamente la acumulación de cafeína, lo que indica que *CsHBI* tiene un efecto regulador sobre el metabolismo de la cafeína en las plantas de té (Ma et al., 2021).

De igual manera, en plantas de té se ha estudiado la actividad del gen *TCSI* (Tea Caffeine Synthase1) que posee actividad metiltransferasa responsable de convertir la teobromina en cafeína (Kato et al., 2000; Kato & Mizuno, 2004; Jin et al., 2016). Por medio de la sobreexpresión de genes, en donde el factor de transcripción *MYB184* mostró la mayor activación del promotor *TCSI*. También se examinó la función de *MYB184* en la regulación de la síntesis de cafeína en las plantas de té, en la que por medio de un experimento de interferencia de oligodesoxinucleótido antisentido (asODN) se eliminó la expresión de *MYB184*. En consecuencia, el contenido de cafeína y la expresión de *TCSI* se redujeron significativamente. Sin embargo, la sobreexpresión de *MYB184* regula significativamente la transcripción de *TCSI* y, por lo tanto, aumentaba el contenido de cafeína (Li et al., 2022).

En plantas de té de *Camellia ptilophylla* se presenta menos cafeína, pero más teobromina que en otras especies. Se ha visto que *TCSI* en *C. ptilophylla* presenta actividad metiltransferasa más baja en comparación con *TCSI* en cultivares de té modernos (Jin et al., 2016). Por medio de experimentos de clonación llevados a cabo por Li et al., (2022), los análisis del transcriptoma muestran que el nivel de expresión de *MYB184* es significativamente más bajo *C. ptilophylla* que en otros cultivares de té, por lo que se propone que estos niveles bajos de transcripción de *MYB184*

podría ser la causa del nivel reducido de expresión de *TCS1*. Por medio de clonaciones del promotor del gen *MYB184*, se identificó una inserción de repetición terminal larga presente en *C. ptilophylla*, la cual no está presente en otros cultivares de té.

En las plantas de té, la inserción de secuencias de nucleótidos conocidas como repetición terminal larga (LTR) en un gen generalmente conduce a la supresión de la expresión del gen (Xia et al., 2020), lo que puede explicar el nivel de expresión más bajo de *MYB184* en *C. ptilophylla* que en otros cultivares de té. Por lo tanto, la inserción de LTR en el promotor de *MYB184* dio como resultado la supresión de la expresión de este, lo que condujo a un nivel de transcripción de *TCS1* más bajo y, por lo tanto, a un contenido de cafeína más bajo (Li et al., 2022).

## **2.7 Perspectiva a futuro de la edición genética para el mejoramiento de café**

CRISPR/Cas9 se ha aplicado para mejorar varios rasgos importantes, incluido el aumento del rendimiento, la resistencia a plagas y enfermedades y la mejora de la nutrición en más de 20 especies de plantas (Ricroch et al., 2017). El uso de la tecnología CRISPR/Cas9 mediante el silenciamiento de genes únicos es crucial en la mejora de plantas. En el mejoramiento genético de café hay factores que incluyen como el antecedente genético muy estrecho de la especie *C. arabica*. Esta condición resulta en características agronómicas homogéneas, alta susceptibilidad a plagas y enfermedades, baja productividad, baja adaptación a estreses abióticos y climas extremos, y baja calidad. (Ricroch et al., 2017; Santoso & Sisharmini, 2022). Por lo tanto, aumentar la diversidad genética, mejorar la resistencia a los patógenos y las limitaciones ambientales son algunos de los enfoques para desarrollar variedades superiores de café. Debido a esto, es importante desarrollar herramientas confiables y rápidas para acelerar la liberación variedades con rasgos específicos que incluyen alto rendimiento y buena calidad.

Un uso potencial de la tecnología CRISPR/Cas9 es la producción de café con bajo contenido en cafeína ya que el consumo excesivo de la cafeína puede ocasionar efectos adversos en la salud del propio consumidor. Por lo tanto, la producción de café con bajo contenido de cafeína es urgente

para consumidores seguros y saludables. Se han llevado a cabo estudios para producir café con síntesis de cafeína suprimida mediante el sistema de ARN de interferencia (ARNi) (Ogita et al., 2004) Los resultados mostraron una reducción de cafeína y teobromina en plantas modificadas hasta en un 70%. Sin embargo, la aplicación de la técnica de ARNi tiene limitaciones, incluyendo que sufre de altos efectos fuera del objetivo y da como resultado un fenotipo modificado. Sin embargo, no hay reportes sobre el uso de CRISPR/Cas9 para producir café con bajo contenido de cafeína. La aplicación de la tecnología CRISPR/Cas9 para producir un knockout del gen *CaMXMT1*, podría producir café con una reducción del contenido de teobromina y cafeína.

En cuanto al uso de la edición de genoma mediante el sistema CRISPR/Cas9 para mejorar la calidad de la taza, se han realizado investigaciones sobre las funciones de la sacarosa, el ácido clorogénico (CGA) y la trigonelina. Los cuales son tres componentes principales de la calidad del café. El contenido de sacarosa en los granos de café se puede relacionar con el sabor del café, ya que cuanto mayor sea el contenido de sacarosa en los granos de café, más fuerte será el sabor en taza (De Maria et al., 1996). Por lo tanto, por medio del sistema CRISPR/Cas9 se puede mejorar el contenido de sacarosa en los granos de café y así para mejorar la calidad de la taza. Se ha visto que la eliminación del gen de la sacarosa sintasa (*CcSUS2*) de *C. canephora* mediante CRISPR/Cas9 puede aumentar el contenido de sacarosa de los granos de café. Además, el ácido clorogénico en el café está asociado con la resistencia a enfermedades y se sabe que tiene propiedades antioxidantes (Campa et al., 2003). La modificación de los genes implicados en la síntesis de CGA mediante CRISPR/Cas9 puede mejorar este rasgo al regular al alza o a la baja la vía (Santoso & Sisharmini, 2022).

En cuanto a la maduración de los frutos de café, en la biosíntesis de etileno, los genes ACC sintasa y la ACC oxidasa están involucrados en este proceso. Por lo tanto, anular el gen que produce una explosión temprana de etileno usando CRISPR/Cas9 es una forma de controlar la maduración de la fruta del café (Ribas et al., 2006). Así se puede obtener una maduración uniforme, lo cual se correlaciona con la calidad de la bebida.

### 3. JUSTIFICACIÓN

CRISPR/Cas9 se origina como una respuesta inmune de bacterias y arqueas contra ADN foráneo proveniente de virus y plásmidos (Johnson et al., 2015). Un bacteriófago infecta dichos organismos y se insertan segmentos del genoma del fago en el genoma bacteriano. Si se llega a dar una segunda infección, en la bacteria sintetiza un ARN CRISPR que se encargará de guiar a una endonucleasa Cas hacia el ADN foráneo para su degradación (Johnson et al., 2015; Nussenzweig & Marraffini, 2020). En las bacterias se han identificado sistemas CRISPR de tipo I, II y III, que utilizan las endonucleasas Cas3, Cas9 y Cas10, respectivamente (Barrangou, 2013; Chylinski et al. 2014; Ishino et al. 2018). Esta tecnología CRISPR/Cas ha sido empleada para la edición de genomas debido a que permite introducir cambios al realizar cortes de manera precisa en el genoma, logrando modificaciones al insertar o eliminar fragmentos de ADN (Svitashev et al., 2016; Demirci et al., 2018).

Estos cortes se repararán por medio de una endonucleasa Cas9 y una molécula ARN guía (ARNg, ARNsg), encargada de dirigir la endonucleasa. El ARNg se obtiene al fusionar ARN del sistema (ARNcr) y ARN transactivador (ARNtracr) (Sander & Joung, 2014). Al generarse una ruptura en el genoma de un organismo de interés para modificar o mejorar, se desencadena un sistema de reparación de unión de extremos no homólogos (Non-Homologous End Joining, NHEJ) que conduce a inserciones o deleciones de secuencias cortas adyacentes al sitio de escisión (Brinkman et al., 2018). La inactivación de genes mediada por NHEJ es la forma más sencilla de modificación dirigida, y generalmente se usa para eliminar genes que tienen una influencia negativa en un rasgo de interés en la planta (Bortesi & Fischer, 2015, Borelli et al., 2018). También se puede dar la reparación dirigida por homología (Homology directed repair, HDR), en esta se requiere de una plantilla de ADN con una alta homología de secuencia en las zonas donde se dio el corte (Sander & Joung, 2014; Borelli et al., 2018). Este mecanismo es utilizado para insertar una secuencia o reparar una mutación en una parte específica de un gen (Kamburova et al. 2017; Malzahn et al., 2017).

Entre las principales ventajas del sistema CRISPR/Cas9 con otras tecnologías de edición genética (como por ejemplo TALEN, dedos de zinc) es que el diseño de ARN guía es de bajo costo, sencillo y accesible al compararse con el reconocimiento de sitios objetivos mediante proteínas que se deben diseñar al emplear nucleasas con dedos de zinc y TALENs (Lou et al., 2016; Farooq et al. 2018). Con respecto al ARN de interferencia (ARNi), se ha visto que presenta limitaciones en el silenciamiento de génico, generando pérdida incompleta de función y actividades extensas fuera del sitio objetivo en varias especies de plantas (Xu et al., 2006, Kiu et al., 2017). En relación con CRISPR/Cas9, entre sus características se encuentra la desactivación completa del gen objetivo en lugar de la desactivación parcial y un cambio genómico estable que se puede mantener fácilmente en la descendencia (Barrangou et al., 2015; Liu et al., 2016). Además, CRISPR/Cas9 permite tener a varios genes diferentes como objetivo mediante múltiples ARN guías (Li et al. 2017).

La edición de genoma mediante CRISPR/Cas9 ha permitido múltiples posibilidades de aplicación en la intervención de rutas metabólicas en plantas (Concepción-Hernández, 2018). En *Papaver somniferum* L. se generaron cambios en la cantidad de alcaloides provenientes de la vía de biosíntesis de alcaloides de bencilisoquinolina mediante la edición del gen *4'OMT2* (Alagoz et al., 2016). De igual manera, en la salvia (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), por medio la edición en el gen de la diterpeno sintasa (*SmCPS1*) que participa en la biosíntesis de tanshinone se obtuvieron mutantes que no presentaban este compuesto químico (Li et al., 2017). En arroz se han desarrollado líneas con baja acumulación de cadmio en los granos debido a un knockout del gen *OsNramp5* (Tang et al., 2017). En este mismo cultivo, se logró modificar el contenido de amilosa mediante la edición del gen *SBEIIb* (Royo et al., 2020). En *Coffea canephora* por medio de un knockout en el gen de la fitoeno desaturasa (*CcPDS*), se logró disminuir la expresión de dicho gen y la eliminación de genes en el café (Breitler et al., 2018).

En cuanto a la vía de biosíntesis de cafeína, se ha reportado la edición del gen *CsHBI*, logrando disminuir su expresión en un 65% en los callos provenientes de plantas de té (Ma et al., 2021). Obteniendo que la acumulación de cafeína se reduzca en un 97% y a su vez que la expresión del

gen *yhNMT* se vea afectada, ya que está regulado por el gen *CsHBI* (Ma et al., 2021). En esta vía de biosíntesis de cafeína, son escasos los reportes que se han realizado sobre el estudio de compuestos involucrados en ella. Por lo que debido a la falta de trabajos aplicando el modelo CRISPR/Cas9, en este proyecto se pretende establecer un método simple y eficiente de edición genética empleando el sistema CRISPR/Cas9 mediado por *Agrobacterium tumefaciens* para el análisis de genes involucrados en la síntesis de cafeína empleando discos de hoja de *Coffea arabica* L. Esto por medio de los genes guanosina desaminasa (*GDSA*), nucleósido hidrolasa 1 (*NSHI*) y la fosforilasa específica de XMP (*XMPP*) presentes en *Arabidopsis thaliana*, los cuales presentan ortólogos en el café. Por lo que se espera que al lograr insertar el gen reportero por medio del sistema CRISPR/Cas con ARNg de los genes involucrados producción de xantosina (*GDSA* y *XMPP*) se obtenga la edición genética en café.

## **4. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Establecer un sistema ex vitro de edición genética CRISPR/Cas9 para comprobar la integración del gen reportero *turbo-gfp* en el genoma de *Coffea arabica* L. empleando discos de hojas.

### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Determinar el efecto de la concentración ( $DO_{600}$ ) de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, periodo de agitación y el tiempo de cocultivo en la expresión transitoria del gen reportero *uidA* en el genoma de *Coffea arabica* L.

3.2.2 Evaluar el protocolo de transformación genética transitoria establecido para la edición genética de café mediada por el sistema CRISPR/Cas9.

3.2.3 Comprobar mediante técnicas moleculares la integración del gen reportero *turbo-gfp* en el genoma de *C. arabica* L.



## **5. HIPOTESIS**

4.1 Los parámetros como concentración de la bacteria (DO<sub>600</sub>), periodo de agitación y tiempo de cocultivo influyen en la expresión transitoria del gen reportero *uidA* en los segmentos de hoja de *Coffea arabica* L.

4.2 Los parámetros establecidos en el protocolo de transformación genética transitoria mediante *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA1303 podría influir en la inserción del gen reportero *turbo-gfp* al emplear el sistema CRISPR/Cas9 mediante *A. tumefaciens* AGL1.

4.3 La inserción del gen reportero *turbo-gfp* puede ser influenciada por los distintos vectores CRISPR/Cas9 empleados mediante la transformación con *A. tumefaciens* AGL1.

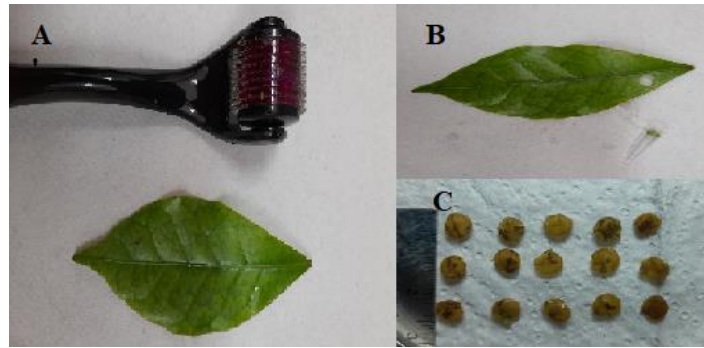
## **6. METODOLOGÍA**

### **6.1 Localización de estudio**

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

### **6.2 Material vegetal**

Se usaron discos de hojas jóvenes de plantas de café (*Coffea arabica* L. var. Caturra), a las cuales se les realizaron perforaciones con micro agujas hechas con un dermaroller (Figura 2). Los discos se realizaron utilizando un tubo Eppendorf de 0.5 mL, generando círculos de un radio de 0.25 mm



**Figura 2.** Metodología empleada para la transformación de discos de hojas de café. Hojas jóvenes con perforaciones realizadas con el dermaroller (A), hojas de café de donde se obtuvieron los discos empleando tubos Eppendorf de 0.5mL (B), discos de hojas ( $r=0.25$  mm) (C).

### 6.3 Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* ATHV

#### a. Parámetros empleados para la transformación genética transitoria

La modificación genética fue mediada mediante *A. tumefaciens* con el plásmido pCAMBIA 1303. Para la transformación *ex vitro* de los discos de hojas se utilizó la cepa bacteriana ATHV, y se analizó la densidad óptica (0.6, 0.8 y 1.0), periodo de agitación (60, 120 y 180 min) y tiempo de cocultivo (1, 2 ó 3 días). Se aplicó vacío durante 30 min con una presión de 500 mmHg, con una temperatura de incubación de 26 °C ( $\pm 2$ ). Se realizaron 3 repeticiones de cada experimento, con 30 explantes por tratamiento.

#### b. Cultivo *A. tumefaciens*

##### 1. Cepa bacteriana de *A. tumefaciens*

Se utilizó la cepa bacteriana ATHV, la cual presenta resistencia a rifampicina, y cuenta con el vector binario pCAMBIA 1303, que contiene el gen *nptII*, el cual confiere resistencia a la kanamicina. Dentro de la región del ADN-T posee el marcador de selección en plantas *hptII*, que

presenta resistencia a la higromicina y *uidA-gusA-mgfp5-His6* como genes reporteros, que codifica para las proteínas GUS y GFP, bajo el control del promotor CAMV35S. Para el control negativo se usó una cepa de ATHV sin el plásmido (cepa silvestre).

## **2. Crecimiento de la bacteria *A. tumefaciens***

Se tomó una colonia de la cepa bacteriana ATHV con el vector binario pCAMBIA 1303 y se inoculó en 5 mL de medio Luria-Bertani (LB) líquido con los antibióticos rifampicina (50 mg/L) y kanamicina (50 mg/L), y acetosiringona (20µM), se incubaron a 25-28°C, bajo agitación constante (110 rpm), durante 24 h. Luego, se subcultivó la bacteria agregando los 5 mL en 45 mL en medio LB líquido complementado con acetosiringona (200 µM), y se incubará bajo las mismas condiciones por 48h.

## **3. Preparación suspensión bacteriana**

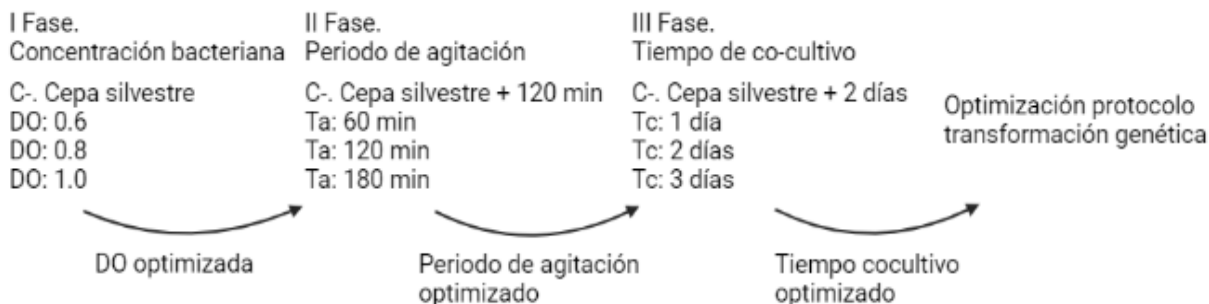
El cultivo bacteriano de la cepa ATHV con el vector binario pCAMBIA 1303 se transfirió a un tubo Falcon de 50 mL, se centrifugó 4000 rpm por 20 min y se desechó el sobrenadante. Luego, se resuspendió la bacteria en 50 mL medio de cultivo de lavado (cuadro I), se centrifugó 4000 rpm por 20 min y se desechó el sobrenadante. Finalmente, se agregaron 50 mL de medio de cocultivo líquido (cuadro I) para resuspender la bacteria, y se midió la DO<sub>600</sub> deseada.

### **c. Transformación genética transitoria *ex vitro***

#### **1. Cocultivo de explantes de café con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303**

Se colocaron los discos de hojas en placas Petri que contenían 25 mL de la suspensión bacteriana según el tratamiento de densidad óptica (DO<sub>600</sub>: 0.6, 0.8 y 1.0). Los explantes se colocaron en medio de cocultivo líquido, con agitación constante a 100 rpm por el tiempo definido

(60, 120 y 180 min), seguidamente se aplicó vacío durante 30 minutos con una presión de 500 mmHg. Luego, se eliminó la suspensión bacteriana, y los explantes colocados en placas Petri, se dejaron en el cuarto de crecimiento por el periodo de cocultivo determinado (1, 2 ó 3 d), en oscuridad, y a la temperatura ambiente del laboratorio ( $26 \pm 2$  °C).



**Figura 3.** Esquema del proceso de optimización del protocolo mediante *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 empleando los parámetros densidad óptica bacteriana (I Fase), periodo de agitación (II Fase) y tiempo de cocultivo (III Fase).

## 2. Lavados con antibióticos

Al finalizar el proceso de cocultivo con *A. tumefaciens* ATHV con el vector binario pCAMBIA 1303, los discos de hoja se colocaron en placas Petri con agua destilada estéril y se realizaron dos lavados de 10 min, seguido de un lavado de 30 min con agua destilada estéril con el antibiótico Cefotaxima (500 mg/L) para eliminar las bacterias, todo esto con agitación a 110 rpm.

### d. Medio de cultivo

Los medios de cultivo a utilizar para cada tratamiento y etapa se muestran en el cuadro 1.

**Cuadro 1.** Medios de cultivo empleados en el cocultivo de discos de hoja de café con *A. tumefaciens* ATHV con el vector binario pCAMBIA 1303.

<b>Etapa</b>	<b>Medio de cultivo</b>	<b>Componentes del medio</b>
Crecimiento <i>A. tumefaciens</i>	Medio LB ATHV::pCAMBIA1303	Medio Luria-Bertani (LB) + 50 mg/L de kanamicina + 200 $\mu$ M acetosiringona
Preparación suspensión bacteriana	Medio de lavado	10 mM MgCl <sub>2</sub> (0.95211 g/L)
Preparación suspensión bacteriana	Medio cocultivo líquido	¼ Medio Murashige & Skoog (1962) + 10 g/L sacarosa + 0.005% (v/v, 50 mL/L) Silwet L-77 + 200 $\mu$ M acetosiringona pH= 5,7

#### **e. Análisis de expresión transitoria del gen *uidA* (GUS)**

##### **1. Prueba histoquímica de la enzima $\beta$ -glucuronidasa (GUS)**

Se usó el protocolo definido por Gatica (2013c) para el análisis de la expresión de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en tejidos transformados con el gen reportero *uidA*. Para ello, los segmentos de hojas se colocaron tubos Falcon de 15 mL, se agregó buffer de tinción (50mM de Buffer Fosfato de sodio (NaPO<sub>4</sub>) a pH 7.0, 0.2% de Tritón X-100, 0.5mM de Ferrocianuro de potasio, 0,5mM de Ferricianuro de potasio, 10mM de EDTA, 4% v/v de Metanol y 65% de agua destilada) hasta cubrirlos y se almacenaron a -80 °C por 1 hora. Luego, se agregaron 20  $\mu$ L de X-Gluc disuelto en DMSO por cada 10 mL de buffer de tinción (se requieren 7 mg de X-Gluc por cada 20  $\mu$ L de DMSO). Esto se agregó en los tubos con los discos y se incubaron a 37 °C por 24 h. Seguidamente, se llevó a cabo la decoloración del tejido utilizando una solución de alcohol 95% v/v y ácido acético (3:1) en baño maría a 70 °C por 1 h. Se tomaron fotografías del resultado obtenido con cada tratamiento y se usó una regla como escala de referencia.

## 2. Cálculo de área transformada

Se utilizó el software ImageJ (Schnider et al., 2012) para el análisis de las imágenes y la determinación del área total y al área con tinción GUS. Se calculó el área que muestre la expresión del gen *uidA* para cada tratamiento mediante la tinción de prueba GUS empleando la siguiente fórmula.

$$\text{Área transformada} = \frac{\text{Área del explante con tinción}}{\text{Área total del explante}} \times 100$$

## 3. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la tinción de la prueba GUS se analizaron mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis para determinar si hay diferencias significativas entre el porcentaje de transformación según los diferentes parámetros a optimizar (densidad óptica, tiempo de agitación y periodo de cocultivo). Además, para determinar si hay diferencias entre los tratamientos de cada parámetro optimizado se realizó la prueba de Dunn empleando el ajuste de Bonferroni. Los análisis estadísticos se realizaron con el software R Studio (RStudio Team, 2020).

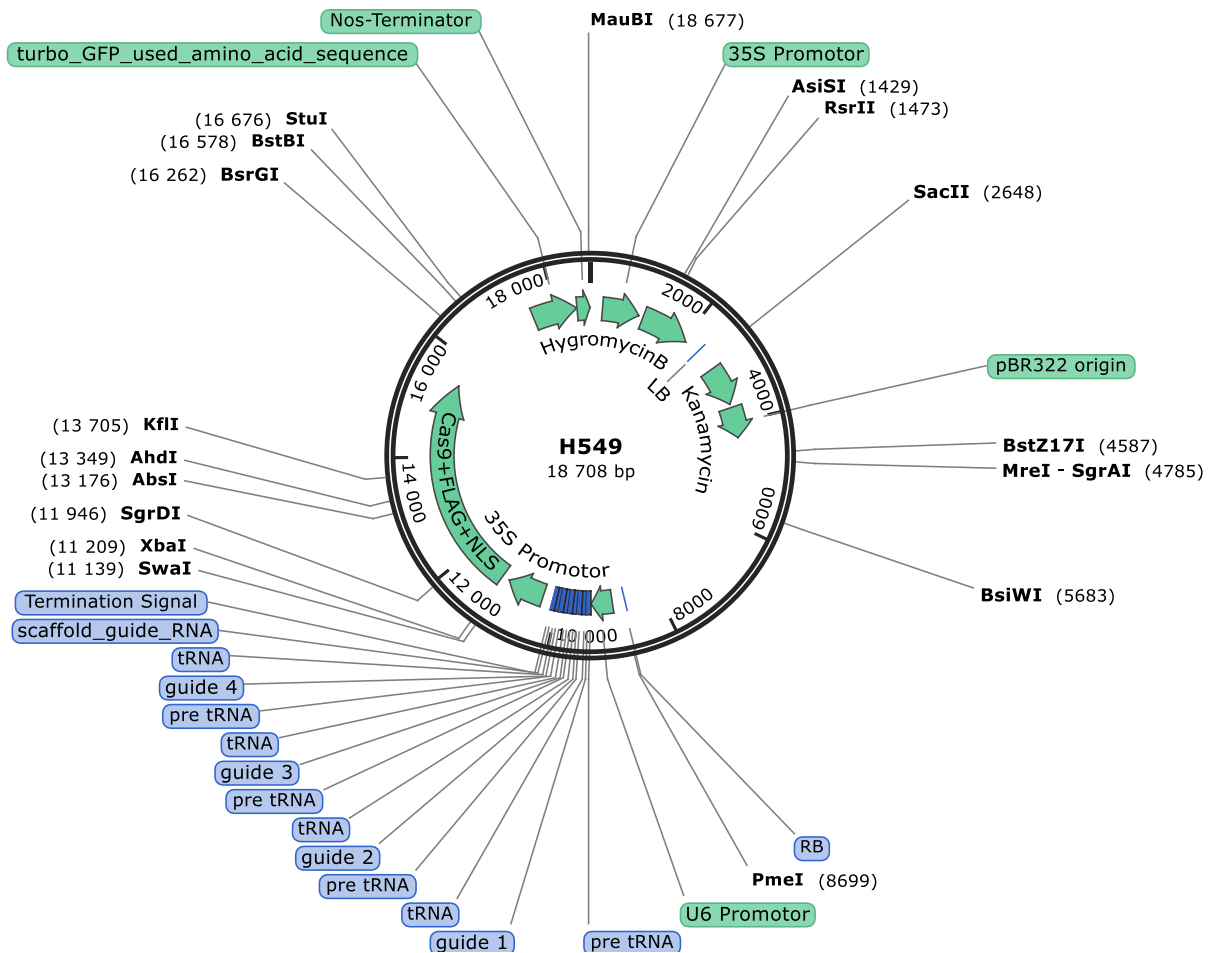
### f. Transformación genética con los plásmidos CRISPR/Cas9 mediada por *A. tumefaciens*

Se transformaron discos de hojas de café con el protocolo previamente optimizado (protocolo descrito en la sección 6.3, apartado c). Se utilizaron los mejores parámetros seleccionados con base en el área transformada en cada tratamiento.

#### 1. Vectores CRISPR/Cas9 empleados para la inserción del gen reportero *turbo-gfp*

Para la transformación de café mediada por *A. tumefaciens*, cepa AGL1, se usaron plásmidos CRISPR/Cas9, los cuales poseen los genes de Cas9 bajo el promotor CaM35S, los respectivos

ARNg bajo el promotor U6, con el gen de selección *nptII*, el cual confiere resistencia a la kanamicina para la bacteria y el gen *hptII*, que presenta resistencia a la higromicina para los explantes transformados, además cuentan con *turbo-gfp* como gen reportero (Fig 4). Cada plásmido posee el respectivo ARN guía correspondiente a los genes *NSH1*, *XMPasa*, *XMPasa + GDSA*. Se emplearon como controles negativos la cepa AGL1 wild (silvestre) y la empty CRISPR; el cual no posee la secuencia líder del ARN guía.



**Figura 4.** Vector CRISPR/Cas9 correspondiente al plásmido que presenta ARNgúas para los genes *XMPasa + GDSA*, introducido en *A. tumefaciens* AGL1. El cual presenta el promotor CaM35S, los ARNg bajo el promotor U6, con el gen de selección *nptII*, que confiere resistencia a la kanamicina y el gen *hptII*, que presenta resistencia a la higromicina, además del gen reportero *turbo-gfp*.

## **2. Transformación de explantes con plásmidos CRISPR/Cas9**

Para la inserción del gen reportero *turbo-gfp* en el genoma del café, se utilizaron vectores CRISPR que poseen la secuencia de ADN que se transcribe en los ARN guías respectivos para los genes *NSH1*, *XMPasa* y *XMPasa + GDSA*. Se utilizaron los parámetros optimizados en el protocolo llevado a cabo mediante *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 con base en el área transformada en cada tratamiento. Se emplearon como controles AGL1 silvestre (control negativo) y AGL1 empty CRISPR. Se realizaron 3 repeticiones, con 30 segmentos de hoja por tratamiento

## **3. Cocultivo de discos de café con *A. tumefaciens* AGL1 con los vectores CRISPR/Cas9**

Los discos de hojas se colocaron en una placa Petri con la suspensión bacteriana de *A. tumefaciens* AGL1 con los vectores CRISPR/Cas9 (ver sección 1) según la densidad óptica ( $DO_{600}$ ), periodo de agitación y tiempo de cocultivo establecidos en el protocolo optimizado previamente. Para el cocultivo de los explantes de café con *A. tumefaciens* AGL1 con los vectores CRISPR/Cas9 se aplicó vacío por 30 min con una presión de 500 mmHg, un tiempo de agitación de 120 min y la temperatura ambiente del laboratorio ( $26 \pm 2$  °C).

### **g. Comprobación de transformación genética**

Para la comprobación de la transformación genética por medio de *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos CRISPR y sus respectivos ARNg para los genes *NSH1*, *XMPasa* y *XMPasa + GDSA*, se comprobó la presencia de fluorescencia del gen reportero *turbo-gfp* en los discos de hoja de *C. arabica*, mediante una microscopia de fluorescencia con el microscopio Cytation™ 3.



## 1. Extracción y cuantificación de ADN

Se obtuvo el ADN mediante la maceración de los discos de hojas de café transformados, se agregó 450  $\mu$ L de buffer de extracción (Cuadro 2) y se mezcló con el vórtex. Las muestras se incubaron a 65 °C por 12 min, luego de 7 min, las muestras se agitaron por inversión. Se agregaron 450  $\mu$ L de cloroformo:octanol (24:1) y las muestras se agitaron suavemente 20 veces por inversión. Las muestras fueron centrifugadas por 5 min a 13000 rpm y a 4 °C. Luego, se transfirió el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1.5 mL, se agregó un volumen de isopropanol frío y se agitaron 10 veces por inversión. Seguidamente, las muestras se incubaron 10 min a -20 °C y se centrifugaron por 7 min a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500  $\mu$ l de etanol 70% frío, se procedió a centrifugar las muestras por 2 min a 13000 rpm (4 °C) y se descartó el etanol con cuidado para no perder el pellet. Los tubos con pellet se secaron a 42 °C por 15-20 min y el pellet se resuspendió en 50  $\mu$ l de TE 1X con 1  $\mu$ L de ARNasa Thermo Scientific (conc. Solución stock 10 mg/mL). Las muestras se incubaron por 30 min a 37 °C, se agitaron y almacenaron a -20 °C. Finalmente se realizó la cuantificación de las muestras de ADN obtenidas empleando el Nanodrop Lite.

**Cuadro 2.** Reactivos del buffer de extracción empleado para la obtención de ADN proveniente de los discos de hoja de *C. arabica* L.

Reactivo	pH	Concentración final	Volumen
Tris/HCl	8.0	1 M	10.0 mL
NaCl	-	5 M	28.0 mL
EDTA	8.0	0.5 M	4.0 mL
CTAB	-	2 %	2 g
PVP	-	2%	2g
H <sub>2</sub> O	-	-	58.0 mL
Volumen total			100 mL

\*Se agregó 40  $\mu$ L de mercaptoetanol fresco por cada 20 mL de buffer de extracción.

## 2. Electroforesis en gel de agarosa del ADN extraído y productos de PCR

Para analizar la integridad de las muestras de ADN extraído y los productos obtenidos de las PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa. Se mezcló colorante de carga (6X) con GelRed (1  $\mu$ L) y ADN (4  $\mu$ l), se cargó en gel de agarosa al 1,0 % m/v en 1X TBE, y el marcador molecular de ADN Thermo Scientific GeneRuler 100 pb Plus. Esto se corrió a 100 V por 1 h.

## 3. Amplificación del gen *18S*

Se amplificó un fragmento del gen *18S* para comprobar la calidad del ADN extraído de las muestras de hojas de café. Para la amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S (ADNr 18S) se utilizó el protocolo definido por Gatica et al., (2012b). En el cuadro 3 se muestra la composición de la MasterMix para amplificar el gen *18S*, donde el primer forward corresponde a 18S\_S: 5'-AGGTAGTGACAATAAATAACAA-3' y el reverse a 18S\_AS: 5'-TTTCGCAGTTGTTTCGTCTTTC -3'. El programa de amplificación es un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, hibridación a 53 °C por 30 seg, extensión a 72°C por 1.5 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Se utilizaron agua y ADN del plásmido LBA4404 como controles negativos; y dos muestras de ADN de *C. arabica* variedad Obatá como controles positivos.

**Cuadro 3.** MasterMix utilizada en la amplificación del gen *18S*

Componente	Concentración inicial	Concentración final	1X ( $\mu$ L)
H <sub>2</sub> O	-	-	18.70
Buffer Taq+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10X	1X	2.50
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.50
dNTPs	10 mM c/u	0.2 mM c/u	0.50
Primer forward	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.50
Primer reverse	10 $\mu$ M	0.2 $\mu$ M	0.50
Taq polimerasa	5U/ $\mu$ l	0.5 U	0.10
ADN	-	-	1.0
Volumen final	-	-	25

#### 4. Amplificación del gen *virG*

Se amplificó un fragmento del gen *virG* para descartar la contaminación de las muestras con ADN de *A. tumefaciens*, y para ello se utilizó el protocolo definido por Gatica (2013a). La composición de la MasterMix se muestra en el cuadro 4, el primer forward corresponde a At\_virG\_1F: 5'-CCGACAGCACCCAGTTCAC-3' y el reverse a At\_virG\_1R: 5'-CCTGCCGTAAGTTTCACCTCACC-3'. El programa de amplificación es un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 60°C por 30 s, extensión a 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % m/v en solución de TBE 1X, el cual se corrió a 100 V por 1 hora. Se utilizaron agua y ADN de segmentos de hoja no transformados como controles negativos, y como controles positivos se empleó ADN de los plásmidos LBA4404 y ATHV.

**Cuadro 4.** MasterMix utilizada en la amplificación del gen *virG*

Componente	Concentración inicial	Concentración final	1X (μL)
H <sub>2</sub> O	-	-	18.70
Buffer Taq+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10X	1X	2.50
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1.5 mM	1.50
dNTPs	10 mM c/u	0.2 mM c/u	0.20
Primer forward	10 μM	0.2 μM	0.50
Primer reverse	10 μM	0.2 μM	0.50
Taq polimerasa	5U/μl	0.5 U	0.10
ADN	-	-	1.0
Volumen final	-	-	25

## 5. Amplificación del gen *turbo-gfp*

Se amplificará un fragmento del gen reportero *turbo-gfp* para analizar su integración en el genoma, se utilizará el protocolo definido por Gatica (et al., 2012a). En el cuadro 5, se muestra la composición de la MasterMix para amplificar un fragmento del gen *turbo-gfp*, el primer forward corresponde a GFP\_2\_F: 5'-CGAGAAGTACGAGGATGGTGG-3' y el reverse a GFP\_2\_R: 5'-TCACCAGCATCAGCATCAGG-3'. El programa de amplificación es un ciclo de desnaturalización inicial a 95°C por 10 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 min, hibridación a 60°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Como controles negativos se utilizó agua y ADN de segmentos de hoja no transformados, y como controles positivos se emplearon muestras de ADN del plásmido Empty CRISPR. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % m/v en solución de TBE 1X, el cual se corrió a 100 V por 1 hora

**Cuadro 5.** MasterMix a emplear en la amplificación del gen *turbo-gfp*

Componente	Concentración inicial	Concentración final	1X (μL)
H <sub>2</sub> O	--	--	18.20
Buffer 10X+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10X	1X	2.5
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1.5
dNTPs	25 mM each	0,2 mM each	0.2
Primer forward	10 μM	0,3 μM	0.75
Primer reverse	10 μM	0,3 μM	0.75
Taq polimerasa	5U/μl	0,5 U	0.10
ADN	-	-	1
Volumen final	-	-	25

## 6. Amplificación del gen *hptII*

Para la amplificación del gen del marcador de selección *hptII* se utilizó el protocolo de Gatica (2013b). La MasterMix para amplificar el gen del marcador de selección *hptII* se muestra en el cuadro 6. El primer forward corresponde a *hpt-F* 5'-TCCATCACAGTTTGCCAGTGATACA-3' y el reverse es *hpt-R* 5'-ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGA-3'. El programa de amplificación es un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min, 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, hibridación a 69°C por 1 min, extensión a 72°C por 1 min y un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR se analizaron en un gel de agarosa al 1 % m/v en solución de TBE 1X, el cual se corrió a 100 V por 1 hora. Se utilizaron agua y ADN de segmentos de hoja no transformados como controles negativos, y como controles positivos se empleó ADN de los plásmidos LBA4404 y ATHV.

**Cuadro 6.** MasterMix por utilizar en la amplificación del gen *hptII*

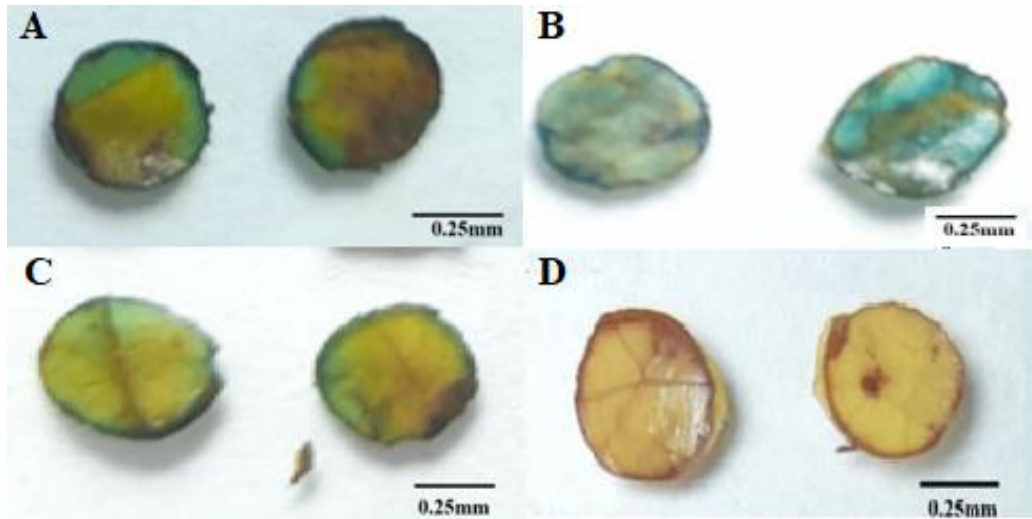
Componente	Concentración inicial	Concentración final	1X (µL)
H <sub>2</sub> O	--	--	12.55
Buffer 10X+ (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10X	1X	2.0
MgCl <sub>2</sub>	25 mM	1,5 mM	1.2
dNTPs	25 mM each	0,2 mM each	0.4
Primer forward	10 µM	0,3 µM	0.4
Primer reverse	10 µM	0,3 µM	0.4
BSA	10mg/mL	--	0.8
Taq polimerasa	5U/µl	0,5 U	0,25
ADN	-	-	2.0
Volumen final	-	-	20

## 7. RESULTADOS

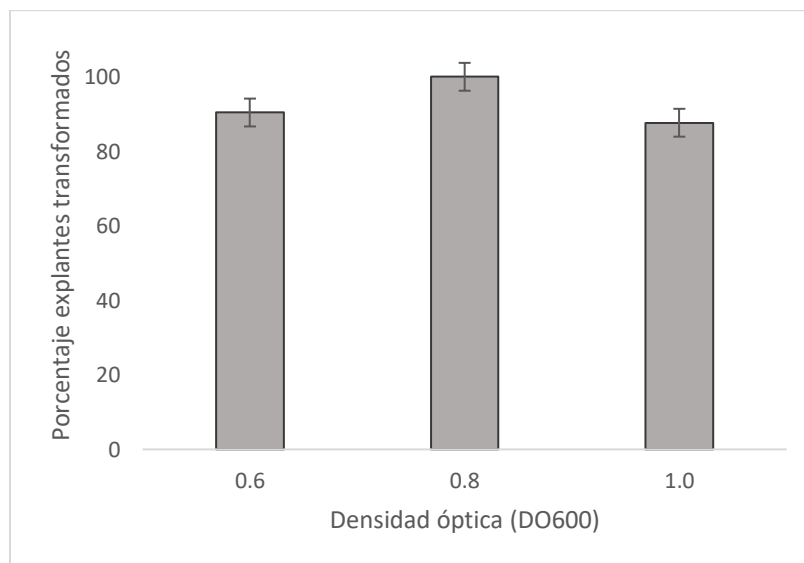
### 7.1 Estandarización de la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) en la expresión transitoria del gen reportero *uidA* en *Coffea arabica* L. utilizando *A. tumefaciens* ATHV::*pCAMBIA 1303*

En la optimización de la densidad óptica de la bacteria, se observó que los explantes cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::*pCAMBIA 1303* con las densidades ópticas de 0.60, 0.80 y 1.0 tuvieron resultados positivos ante la prueba GUS (presencia de coloración azul) (Figura 5 A, B y C, respectivamente), exceptuando el control negativo (Figura 5 D). En cuanto a la estandarización de la densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de la concentración de bacteria óptima, se obtuvo un mayor porcentaje de expresión transitoria el gen *uidA* en los explantes utilizando una DO<sub>600</sub> de 0.80 (100%), seguido de la DO<sub>600</sub> de 0.60 y 1.0, cuyos porcentajes fueron del 90.4 y 86.7% respectivamente (Figura 6, Cuadro 7).

Con respecto al promedio del área transformada, se obtuvo un mayor promedio de expresión transitoria del gen *uidA* en lo de explantes utilizando una DO<sub>600</sub> de 0.80 ( $51.9 \pm 25.1$ ), seguida por la DO<sub>600</sub> de 0.6 ( $29.1 \pm 25.4$ ), la DO<sub>600</sub> de 1.0 ( $10.6 \pm 12.0$ ) y el control negativo ( $0.00 \pm 0.00$ ) (Cuadro 7). Se determinó que existían diferencias significativas ( $\chi^2 = 90.89$ ,  $df = 2$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ) entre el promedio del área transformada en los explantes con expresión transitoria del gen *uidA* utilizando las densidades ópticas (DO<sub>600</sub>) de 0.6, 0.80, 1.0 y el control (DO<sub>600</sub>=0) (Cuadro 7). También se encontraron diferencias significativas al comparar los promedios del área transformada obtenido entre las densidades ópticas (DO<sub>600</sub>) utilizadas ( $p < 0.05$ ). Al obtenerse un mayor promedio en el área de los explantes transformados mediante con la DO<sub>600</sub> de 0.80, se determinó que esta es la concentración óptima para la expresión transitoria del gen *uidA*.



**Figura 5.** Expresión transitoria del gen *uidA* en segmentos de hoja de café cocultivados con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 a densidades ópticas ( $DO_{600}$ ) de bacteria de 0.6, 0.80 y 1.0.  $DO_{600}=0.60$  (A),  $DO_{600}=0.80$  (B) y  $DO_{600}=1.0$  (C), Control  $DO_{600}= 0.00$  (A). Medición a través de la expresión transitoria del gen *uidA*. Escala equivalente a 0.25 mm



**Figura 6.** Efecto de la concentración bacteriana ( $DO_{600}$ ) en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hoja de *C. arabica* L.

**Cuadro 7.** Efecto de la concentración bacteriana (DO<sub>600</sub>) en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hoja de *C. arabica* L. mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303.

Densidad óptica (DO <sub>600</sub> )	Promedio área transformada (± sd)	Porcentaje de explantes transformados (%)
<b>0.0</b>	0 (± 0.001)	0
<b>0.60</b>	29.1 (± 25.4)	90.4
<b>0.80</b>	51.9 (± 25.1)	100
<b>1.0</b>	10.6 (± 12.0)	86.7

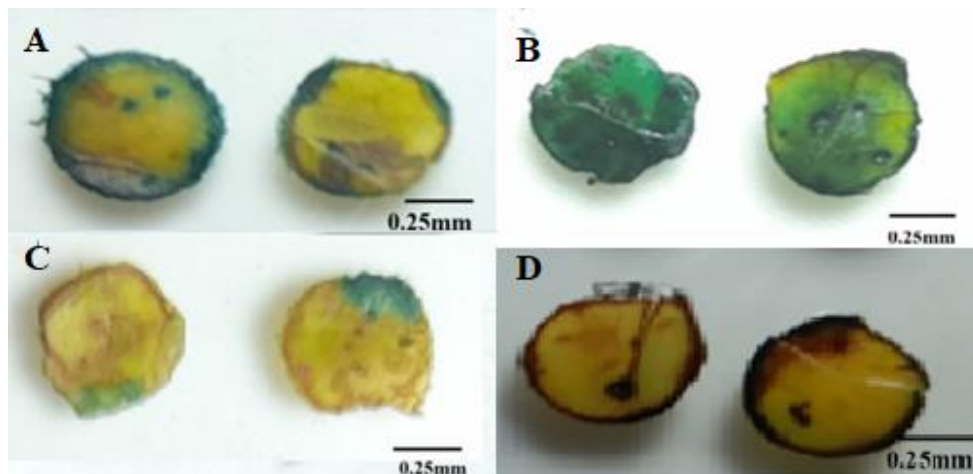
## 7.2 Estandarización del periodo de agitación en la expresión transitoria del gen reportero *uidA* utilizando *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303

Los explantes de hojas de café mostraron resultados positivos al ser cocultivados con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 en los periodos de agitación de 60, 120 y 180 min, por lo que mostraron coloración azul al realizarse la prueba histoquímica de la β-glucoronidasa (GUS) (Figura 7A, B y C). En cuanto a la estandarización del periodo de agitación, se obtuvo un mayor porcentaje de transformación de explantes utilizando un periodo de 120 min (100%), seguido un periodo de 180 min y 60 min, cuyos porcentajes fueron del 95 y 80%, respectivamente (Figura 8, Cuadro 8).

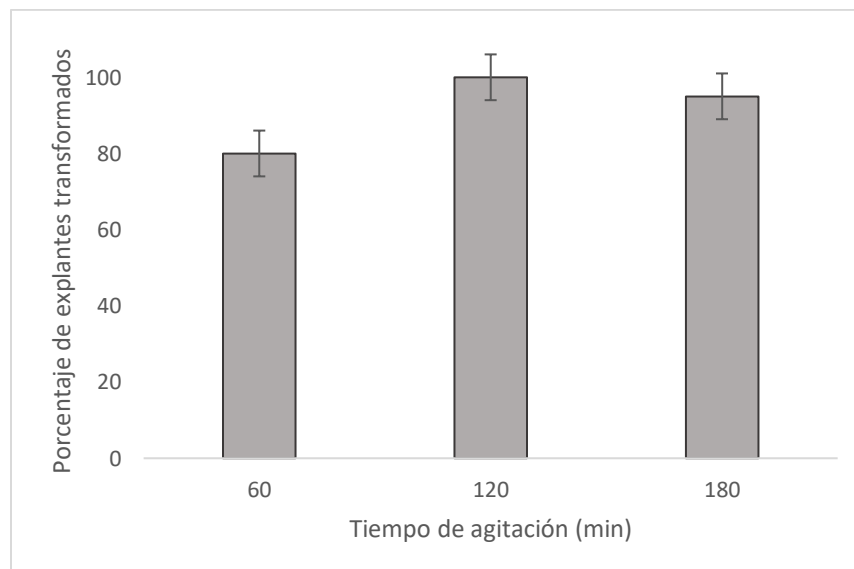
Con respecto al promedio del área transformada, se obtuvo un mayor promedio de expresión transitoria del gen *uidA* en los explantes utilizando 120 min de agitación ( $51.7 \pm 24.3$ ), seguido por 180 min ( $22.9 \pm 19.3$ ) y finalmente 60 min ( $17.0 \pm 18.6$ ) (Cuadro 8). Se determinó que existían diferencias significativas ( $\chi^2 = 46.21$ ,  $df = 2$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ) entre el promedio de explantes con expresión transitoria del gen *uidA* y los tiempos de agitación empleados (Cuadro 8). También se encontraron diferencias significativas al comparar los promedios del área transformada obtenido



entre dichos periodos de agitación utilizadas ( $p < 0.05$ ). Debido a que el área transformada de los explantes con 120 min de agitación presentaron mayor tinción, se determinó este periodo como el óptimo para la expresión transitoria del gen reportero presente en la bacteria.



**Figura 7.** Expresión transitoria del gen *uidA* en segmentos de hoja de café cocultivados con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 con diferentes tiempo de agitación. En donde: 60 min (A), 120 min (B) y 180 min (C), Control: 120 min + cepa silvestre (D). Medición a través de la expresión transitoria del gen *uidA*. Escala equivalente a 0.25 mm.



**Figura 8.** Efecto del tiempo de agitación (min) en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hoja de *C. arabica* L.

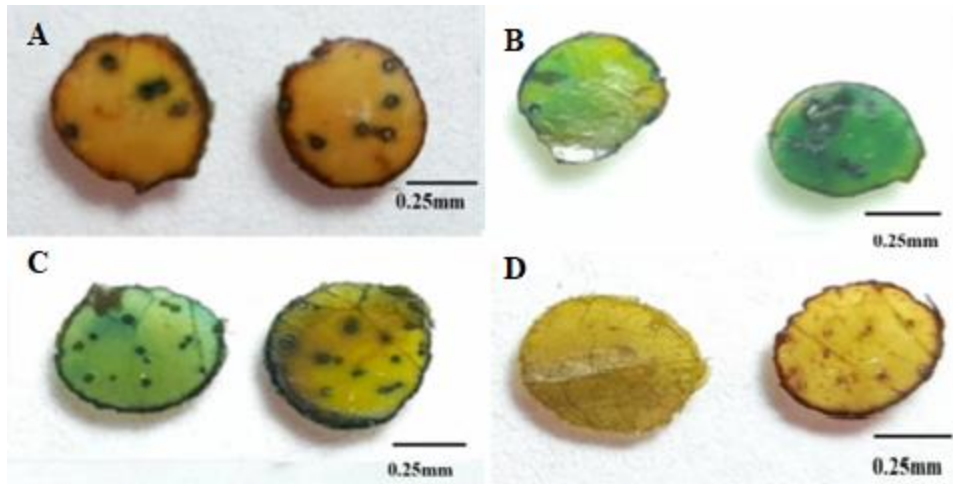
**Cuadro 8.** Efecto del tiempo de agitación (min) en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hoja de *C. arabica* L. mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303.

Tiempo agitación (h)	Promedio área transformada (± sd)	Porcentaje de explantes transformados (%)
<b>Control negativo</b>	0 (± 0.001)	0
<b>1h</b>	17.0 (± 18.6)	80
<b>2h</b>	51.7 (± 24.3)	100
<b>3h</b>	22.9 (± 19.3)	95

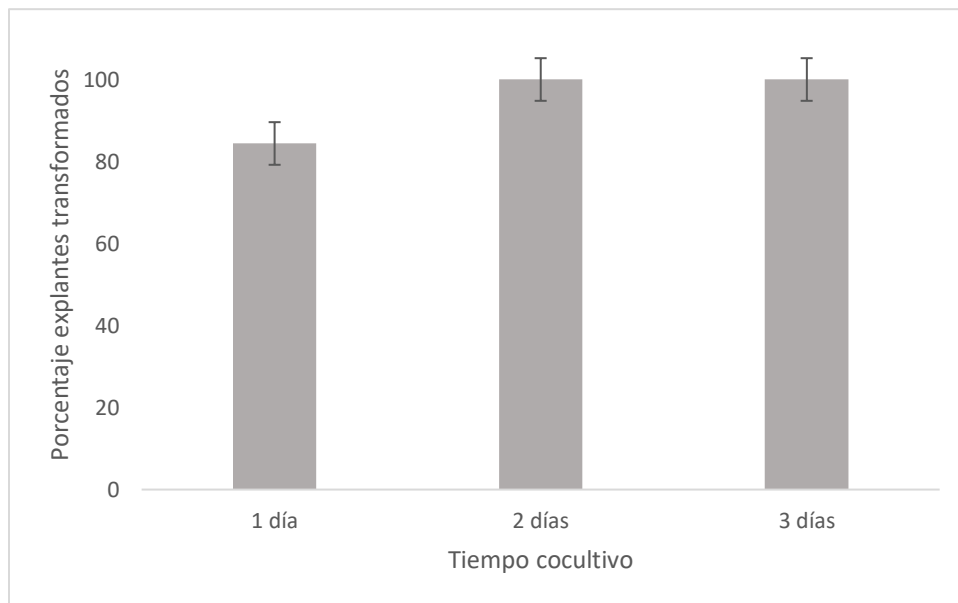
### 7.3 Optimización del periodo de cocultivo en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hojas de café mediante *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303

Se observó que los explantes cocultivados en los periodos de 1, 2 y 3 días con *Agrobacterium tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 tuvieron resultados positivos ante la prueba GUS (presencia de coloración azul) (Figura 9 A, B y C). En cuanto a la estandarización del tiempo de cocultivo, se obtuvo un mayor porcentaje de transformación de explantes utilizando un tiempo de 2 y 3 días (100%), seguido de un periodo de cocultivo de 1 día (84 %) (Figura 10, Cuadro 9).

Con respecto al promedio del área transformada, se obtuvo un mayor promedio en los discos de hoja de café con el periodo de 2 días ( $50.8 \pm 24.8$ ), seguido por 3 y 1 día ( $14.5 \pm 14.8$  y  $3.00 \pm 2.90$  respectivamente, Cuadro 9). Se encontraron diferencias significativas ( $x^2 = 94.913$ ,  $df = 2$ ,  $p\text{-value} < 0.05$ ) entre el promedio de explantes con tinción GUS entre los distintos tratamientos (1, 2 y 3 días, Cuadro 9). También se encontraron diferencias significativas al comparar los promedios del área transformada obtenido entre los periodos a optimizar ( $p < 0.05$ ). Al obtenerse un mayor promedio en el área de los explantes transformados mediante el periodo de cocultivo de 2 días, se determinó que es el tiempo óptimo para la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de café.



**Figura 9.** Expresión transitoria del gen *uidA* en segmentos de hoja de café transformadas con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 con periodo de cocultivo de 1 día (A), 2 días (B), 3 días (C) y el control (cepa silvestre) (D). Medición a través de la expresión transitoria del gen *uidA*. Escala equivalente a 0.25 mm



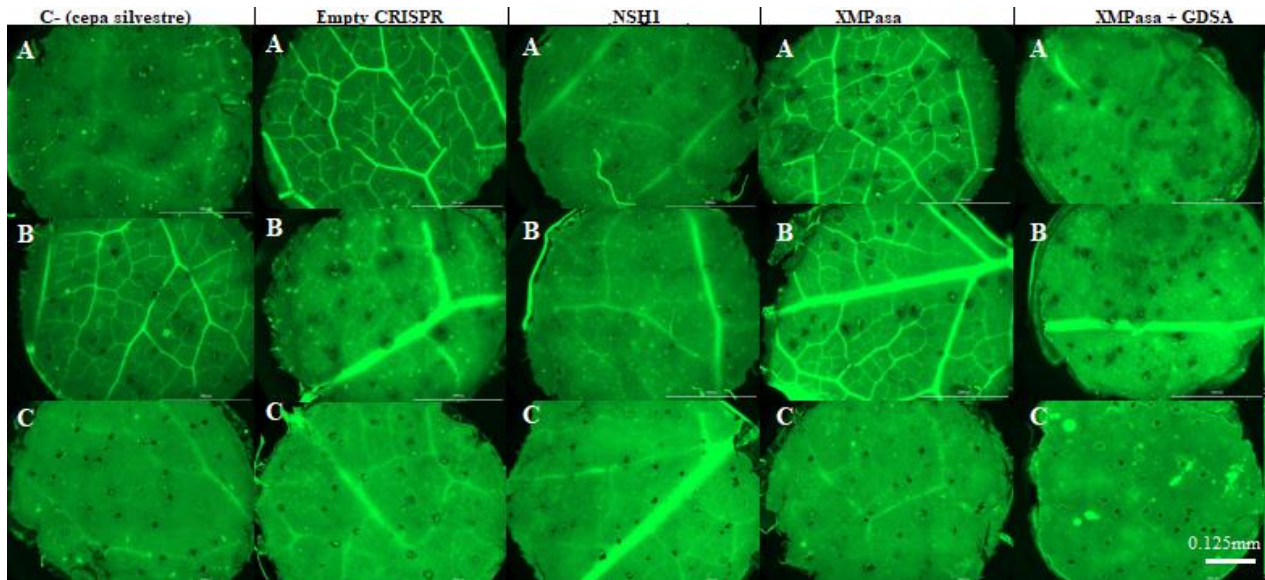
**Figura 10.** Efecto del periodo de cocultivo (días) en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hoja de *C. arabica* L.

**Cuadro 9.** Efecto del periodo de cocultivo (días) en la expresión transitoria del gen *uidA* en discos de hoja de *C. arabica* L.

Periodo cocultivo (día)	Promedio área transformada (± sd)	Porcentaje de explantes transformados (%)
<b>Control negativo</b>	0 (± 0.001)	0
<b>1</b>	3.00 (± 2.90)	84
<b>2</b>	50.8 (± 24.8)	100
<b>3</b>	14.5 (± 14.8)	100

#### **7.4 Extracción y cuantificación de ADN de hojas de café para la comprobación de la inserción del gen reportero mediada por el sistema CRISPR/Cas9**

Para la comprobación del gen reportero *turbo-gfp* presente en los vectores CRISPR/Cas9, se visualizaron los discos de hojas de café. Obteniendo la presencia de partículas fluorescentes en los tejidos transformados (Figura 11). Los discos correspondientes al control negativo, en donde se empleó una cepa silvestre de AGL1 presencia fluorescencia emitida por parte de los cloroplastos aun presente en el tejido. En cuanto al material transformado con *A. tumefaciens* AGL1 con el vector Empty CRISPR (el cual no posee ARNg específico para genes), *NHS1*, *XMPasa* y *XMPasa* + *GDSA*, se muestra fluorescencia propia del tejido vegetal como también por parte de la proteína GFP. En el caso del disco B y C correspondientes a Empty CRISPR; y el disco A de *NSH1*, se presencia fluorescencia de la proteína GFP en sitios cercanos a las heridas realizadas por las microagujas del dermaroller. Además, con respecto a la fluorescencia emitida por parte de los pigmentos del tejido vegetal, esto se presenta en el disco B de la cepa silvestre (control negativo), disco A de empty CRISPR; y disco A y B de *XMPasa* (Figura 11)



**Figura 11.** Análisis de fluorescencia emitida por medio de la proteína, la cual es codificada por el gen reportero *turbo-gfp* presente en los discos de hoja de *C. arabica* L.

En el cuadro 10, se observa el ADN extraído de hojas de café obtenidas tras la transformación mediante *A. tumefaciens* AGL1 a una  $DO_{600}$  de 0.8, un periodo de agitación de 120 minutos y 2 días de cocultivo. Se puede ver que la mayor concentración de ADN en la transformación 1 se obtiene en el control negativo en donde se utilizó la cepa silvestre (91.3 ng/ $\mu$ L), seguido por *XMPasa* + *GDSA* (82.0 ng/ $\mu$ L) y *XMPasa* (63.4 ng/ $\mu$ L); las demás muestras no superan una concentración de 50 ng/ $\mu$ L (Cuadro 10). En cuanto a las extracciones correspondientes a la segunda transformación, las muestras Empty CRISPR (101.9 ng/ $\mu$ L), control negativo (73.7 ng/ $\mu$ L) y *XMPasa* + *GDSA* (71.4 ng/ $\mu$ L) presentan las mayores concentraciones (Cuadro 10). En la tercera transformación (Cuadro IX), *XMPasa* + *GDSA*, *XMPasa*, el control negativo y Empty CRISPR presentan las mayores concentraciones de ADN (225.0, 182.0, 174.0 y 145.0 ng/ $\mu$ L respectivamente).

La relación A260/280 indica ADN de buena calidad y con una pureza aceptable mayor a 1.80 (Cuadro 10), en las muestras de la transformación 1, no se obtuvo ADN de pureza óptima, en la transformación 2 el ADN de Empty CRISPR presenta una relación A260/280 óptima. En cuanto a las extracciones de la tercera transformación el control negativo (cepa silvestre), Empty CRISPR,

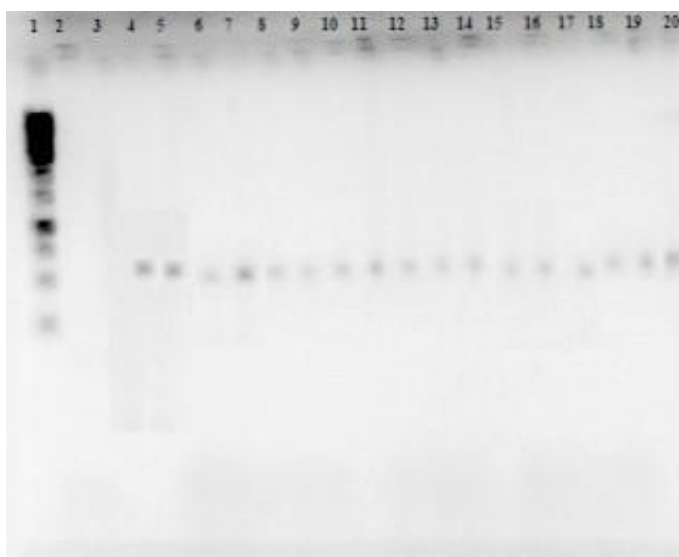
*XMPasa* y *XMPasa* + *GDSA* presentan una relación A260/280 aceptable (>1.60). Mientras que la pureza del ADN con relación a A260/230, las muestras presentan valores menores a 1.5, por lo que el ADN presenta contaminación (Cuadro 10).

**Cuadro 10.** Cuantificación de ADN de los discos de hojas de *C. arabica* L. transformados con *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos CRISPR/Cas9 mediante Nanodrop Lite.

Experimento	Muestra	Ácido nucleico (ng/μL)	A260 (Abs)	A280 (Abs)	260/280	260/230	Pureza ADN (260/280)	Pureza ADN (260/230)
1	C- (wild)	91.3	1.83	1.30	1.41	0.45	Contaminada	Contaminada
	Empty CRISPR	37.2	0.75	0.52	1.42	0.42	Contaminada	Contaminada
	NSH1	31.7	0.63	0.45	1.42	0.40	Contaminada	Contaminada
	XMPasa	63.4	1.27	0.85	1.48	0.36	Contaminada	Contaminada
	<i>XMPasa</i> + <i>GDSA</i>	82.0	1.64	1.03	1.59	0.79	Contaminada	Contaminada
2	C- (wild)	73.7	1.47	1.00	1.47	0.48	Contaminada	Contaminada
	Empty CRISPR	101.9	2.04	1.26	1.62	0.65	Aceptable	Contaminada
	NSH1	61.1	1.22	0.83	1.48	0.42	Contaminada	Contaminada
	XMPasa	55.6	1.11	0.75	1.49	0.43	Contaminada	Contaminada
	<i>XMPasa</i> + <i>GDSA</i>	71.4	1.428	0.973	1.47	0.48	Contaminada	Contaminada
3	C- (wild)	174	3.49	1.97	1.77	0.81	Aceptable	Contaminada
	Empty CRISPR	145.0	2.90	1.81	1.60	0.55	Aceptable	Contaminada
	NSH1	51.8	1.037	0.66	1.57	0.37	Contaminada	Contaminada
	XMPasa	182.0	3.64	2.05	1.77	0.82	Aceptable	Contaminada
	<i>XMPasa</i> + <i>GDSA</i>	225.0	4.99	3.08	1.62	0.62	Aceptable	Contaminada

### 7.5 Comprobación de la presencia del gen *18S* mediante la transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos CRISPR en discos de hoja de café

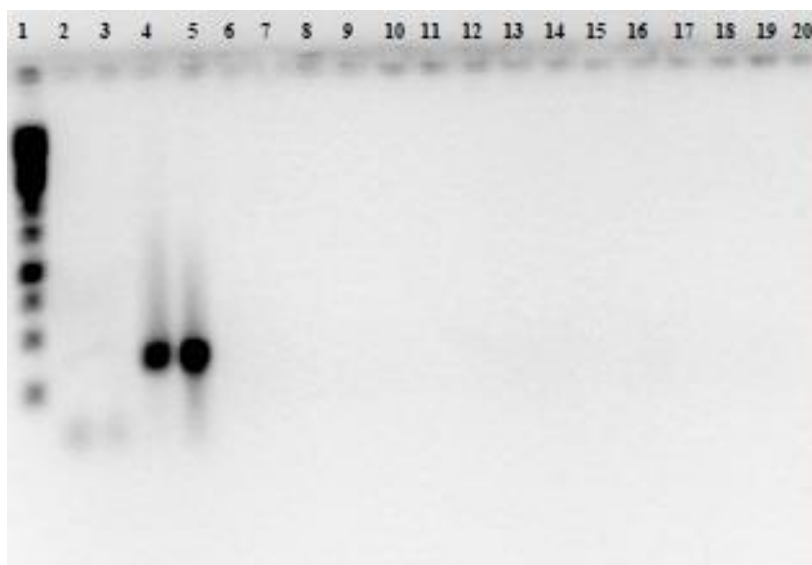
La figura 12 muestra el resultado de la electroforesis de los productos de PCR de la amplificación de un fragmento de ~481 bp del gen de la subunidad ribosomal *18S* (ADNr 18S) en muestras de ADN extraído de discos de hojas de café, obtenidas a partir de la transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con plásmidos CRISPR/Cas9 que poseen los ARN guías para los genes *NSH1*, *XMPasa* y *XMPasa* + *GDSA*. Se observa que en las muestras de control positivo (carril 4 y 5) y las muestras de ADN vegetal 6-20, se obtuvo una banda de aproximadamente 400-500 pb.



**Figura 12.** Electroforesis de la amplificación de un fragmento del gen *18S* en muestras de hoja de *C. arabica* L. con plásmidos CRISPR/Cas9. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (plásmido LBA4404), 4) Control positivo 1 (ADN hojas café), 5) Control positivo 2 (ADN hojas café), 6) Cepa AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSH1* #1, 9) ARNg gen *XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #1, 11) Cepa AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSH1* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #2 16) Cepa AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSH1* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #3. En donde #1 representa el primer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos. La segunda y tercera transformación se representan con #2 y #3, respectivamente.

## 7.6 Amplificación del gen *virG* en la transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos CRISPR empleando discos de hoja de café

En el gel de la electroforesis de los productos de PCR de la amplificación del gen *VirG* en muestras de ADN de hojas de café se muestra la amplificación de los controles positivos de ADN de los plásmidos LBA4404 y ATHV (carril 4 y 5), con un tamaño de aproximadamente 500 pb. Para las muestras correspondientes a los controles negativos (carril 2 y 3) y las muestras obtenidas de la amplificación del gen *VirG* no se obtuvo ningún fragmento (Figura 13).

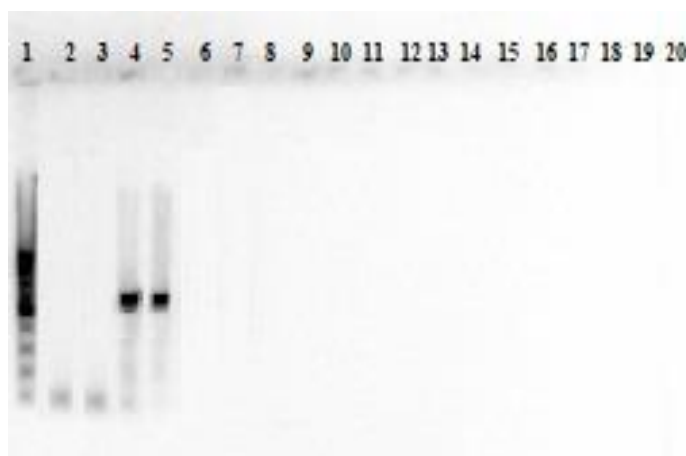


**Figura 13.** Electroforesis de la amplificación del gen *virG* en muestras de segmentos de hoja de *C. arabica* L. con los plásmidos CRISPR. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (ADN de segmentos de hoja no transformados), 4) Control positivo 1 (plásmido LBA4404), 5) Control positivo 2 (plásmido ATHV), 6) Cepa AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSH1* #1, 9) ARNg gen *XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #1, 11) Cepa AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSH1* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #2 16) Cepa AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSH1* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #3. En donde #1 representa el primer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con cada plásmido. La segunda y tercera transformación se representan con #2 y #3, respectivamente.



## 7.7 Comprobación de la presencia del gen reportero *turbo-gfp* en discos de hoja de café transformados con *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos CRISPR/Cas9

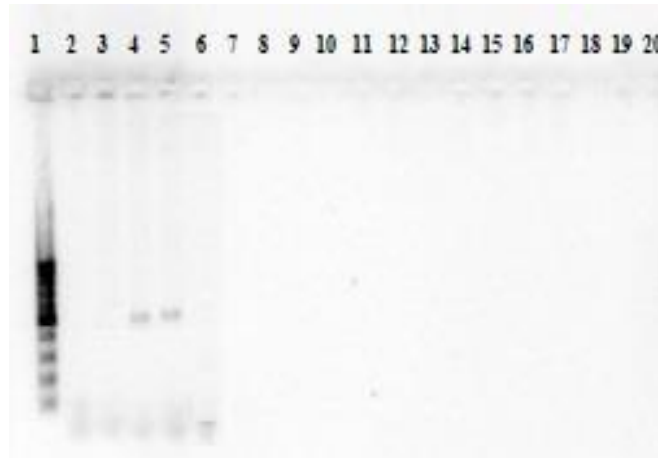
En el gel de la electroforesis de los productos de PCR de la amplificación del gen *turbo-gfp* en muestras de ADN de hojas de café se muestra la amplificación de los controles positivos de ADN de los plásmidos Empty CRISPR (carril 4 y 5), con un tamaño de aproximadamente 500 pb. Para las muestras correspondientes a los controles negativos (carril 2 y 3) y las muestras obtenidas a partir de la transformadas con *A. tumefaciens* AGL1 y los respectivos plásmidos CRISPR/Cas9 (carril 6-20) no se amplificó ningún fragmento (Figura 14).



**Figura 14.** Electroforesis de la amplificación del gen *turbo-gfp* en muestras de segmentos de hoja de *C. arabica* L. con los plásmidos CRISPR. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (ADN de segmentos de hoja no transformados), 4) Control positivo 1 (plásmido Empty CRISPR), 5) Control positivo 2 (plásmido Empty CRISPR), 6) Cepas AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSH1* #1, 9) ARNg gen *XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #1, 11) Cepas AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSH1* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #2 16) Cepas AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSH1* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg gen *XMPasa* + *GDSA* #3. En donde #1 representa el primer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con cada plásmido. La segunda y tercera transformación se representan con #2 y #3, respectivamente.

## 7.8 Comprobación de la presencia del gen de resistencia a higromicina en discos de hoja de café transformados con *A. tumefaciens* AGL1 con los plásmidos CRISPR/Cas9

La figura 15 muestra el resultado de la electroforesis de los productos de PCR de la amplificación de un fragmento del gen *hptII* en muestras de ADN de discos de hojas de café, obtenidas a partir de la transformación mediante *A. tumefaciens* AGL1 con plásmidos CRISPR/Cas9 que poseen los ARN guías respectivos para los genes *NSH1*, *XMPasa* y *XMPasa + GDSA*. Se observa que en las muestras de control positivo (carril 4 y 5) presentan bandas tenues de un tamaño aproximadamente entre los 400-500pb, mientras que los controles negativos (carril 2 y 3), y las muestras de ADN vegetal 6-20, no presentan fragmentos amplificados.



**Figura 15.** Electroforesis de la amplificación del gen *hptII* en muestras de segmentos de hoja de *C. arabica* L. con los plásmidos CRISPR. 1) Marcador molecular 100bp (Thermo Scientific), 2) Control negativo 1 (agua), 3) Control negativo 2 (ADN de hoja de café sin transformación) 4) Control positivo 1 (plásmido LBA4404), 5) Control positivo 2 (plásmido ATHV), 6) Cepa AGL1 wild #1, 7) Empty CRISPR #1, 8) ARNg gen *NSH1* #1, 9) ARNg gen *XMPasa* #1, 10) ARNg gen *XMPasa + GDSA* #1, 11) Cepa AGL1 wild #2, 12) Empty CRISPR #2, 13) ARNg gen *NSH1* #2, 14) ARNg gen *XMPasa* #2, 15) ARNg gen *XMPasa + GDSA* #2 16) Cepa AGL1 wild #3, 17) Empty CRISPR #3, 18) ARNg gen *NSH1* #3, 19) ARNg gen *XMPasa* #3, 20) ARNg *XMPasa + GDSA* #3. En donde #1, #2 y #3 representa el primer, segundo o tercer experimento de transformación con *A. tumefaciens* AGL1 con cada plásmido.

## 8. DISCUSIÓN

### 8.1 Determinación de la densidad óptica (DO600), tiempo de agitación y periodo de cocultivo óptimos en la expresión transitoria del gen reportero *uidA* en *Coffea arabica* L. utilizando *A. tumefaciens* ATHV::*pCAMBIA1303*

Por medio del análisis histoquímico de la prueba GUS se permite determinar la expresión transitoria del gen reportero *uidA* de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Este gen se utiliza como gen reportero para el análisis de promotores e identificar la expresión de genes en tejidos (Jefferson et al., 1987; Jefferson, 1989). Mediante el análisis histoquímico, se puede analizar la actividad del gen *uidA* por medio del sustrato X-GLUC (Jefferson et al., 1987), ya que se da una coloración azul en el explante. Los explantes que son transformados mediante cepas de *A. tumefaciens* que poseen en su plásmido el gen reportero *uidA*, presentan expresión de este gen; a excepción de los controles negativos ya que este tratamiento se realiza con cepas silvestres o en ausencia de la bacteria. Según los resultados obtenidos en la transformación de discos de hojas de café mediante *A. tumefaciens* ATHV::*pCAMBIA1303* (Figura 5,7,9), se presenta tinción azul para los experimentos de optimización de los parámetros densidad óptica, tiempo de agitación y periodo de cocultivo. Para los controles negativos se realizó la transformación con una cepa ATHV silvestre.

Se ha visto que diversos factores que interfieren en la transformación de plantas al emplear *A. tumefaciens*. Estos parámetros son determinantes en el éxito o el fracaso de la transferencia del gen de interés y su posterior integración y expresión (Tzfira et al., 2002). Estos factores varían según la especie vegetal (Schrammeijer et al., 2003), por lo que se deben considerar algunos aspectos como la edad de la planta, tipo de tejido a transformar, selección de la cepa bacteriana, tiempo de agitación, condiciones de inoculación de *Agrobacterium*, concentración de la bacteria y ciclo de cocultivo (Valderrama, 2005). Debido a la influencia de distintos parámetros, se analizó el promedio de área transformada en discos de hoja de café mediante *A. tumefaciens* ATHV::*pCAMBIA1303* en relación a la densidad óptica (DO600), tiempo de agitación y periodo de cocultivo.

**a. Estandarización de la concentración de la bacteria (DO600) óptima en la expresión transitoria del gen reportero *uidA***

La densidad óptica es un factor influyente en el grado de transformación con *A. tumefaciens* en café, en el caso de discos de hojas de café se obtuvo que la densidad óptima de la bacteria fue de 0.8 (Figura 5-6, Cuadro 7). Estos resultados concuerdan con experimentos realizados por Lorz (2018), en donde al transformar segmentos de hoja de *C. arabica*, variedad Caturra, con *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA1303, el mayor promedio de explantes transformados se presentan con densidades ópticas de 0.75 y 1.0 ( $0.72 \pm 0.06$  y  $0.75 \pm 0.04$ , respectivamente), y con porcentajes de transformación del 75 y 72%. Mostrando también que no se hallaron diferencias significativas entre el promedio de área transformada por densidad óptica, indicando que las densidades ópticas para transformar discos de hojas empleando la cepa ATHV se encuentran entre el rango de 0.75 y 1.0. En trabajos donde se ha utilizado la cepa EHA101 y EHA105, se ha estimado que las concentraciones óptimas de la suspensión bacteriana se encuentran alrededor de 0.6 (Leroy & Dufour, 2004), y se han logrado tasas de transformación eficientes entre densidades de 0.2 a 0.6 (Hatanaka et al., 1999 & Ribas et al., 2005).

En transformaciones de callos embriogénicos derivados de hoja se empleó la cepa LBA1119, en donde se determinó que una densidad óptica de 0.6 fue la óptima para lograr una mayor la integración de genes de interés, en donde se obtuvo una eficiencia mayor al 90 % de transformación y conversión de callos a embriones somáticos y posteriormente a plantas, las cuales amplificaron fragmentos del gen *hptII*. Además, tras realizar un Southern blot, se determinó aproximadamente el 70% de estas plantas presentaron una copia del ADN-T en su genoma (Ribas et al., 2011). Se han realizado experimentos de transformación de discos de hojas con las cepas GV3101::pCAMBIA1303, LBA440::pCAMBIA1303, y ATHV::pCAMBIA1303, a una densidad óptica de 0.6, se presenta una menor eficiencia de transformación por parte de la cepa ATHV en comparación con GV3101 y LBA4404 (Vargas-Guevara et al., 2018). Se ha reportado que las densidades ópticas para transformar tejidos de café deben encontrarse en el rango entre 0.6

y 0.8, sin embargo este parámetro puede variar dependiendo de la variedad de café que se utiliza, el tipo de explante y la virulencia de la cepa de *A. tumefaciens* (Déchamp et al., 2015)

En *Vitis vinifera* L. (uva) se transformaron discos foliares, en donde al exponer los explantes a densidades ópticas de *A. tumefaciens* mayores a 0.8, se presentó necrosis tisular (Das et al. 2002; Kuta & Tripathi 2005). Estos resultados también se han reportado en callos de arroz Indica (*O. sativa* L.), en donde se afectaron negativamente la regeneración de brotes (Kumria et al., 2001). En trigo se ha analizado el efecto de la densidad del cultivo bacteriano, obteniendo que la máxima eficiencia de transformación (12.5 %) se observó a DO600=0.5. Cuando la densidad óptica era de 0.75 y 1, los explantes transformados mostraban contaminación (Rashid et al., 2010). Estos resultados son respaldados por Hu et al., (2003) y McCormac et al., (1998) quienes utilizaron la misma densidad celular de *Agrobacterium* sp. y obtuvieron la máxima eficiencia de transformación (4,4%). En el caso de DO600= 0.75 y 1.0, la eficiencia de transformación fue del 4,07% y 0,0% respectivamente y se observó un crecimiento bacteriano excesivo a estos niveles más altos de cultivos bacteriano y como resultado de lo cual los explantes murieron. Sarker y Biswas (2002) obtuvieron la máxima eficiencia de transformación con *A. tumefaciens* empleando la cepa EHA105 y una densidad óptica de 0.75. Wang et al., (2002) obtuvieron la máxima eficiencia de transformación cuando se utilizó una densidad de células bacterianas O.D.600nm = 1,0. Ke et al., (2002) transformaron embriones inmaduros de trigo y cebada con *A. tumefaciens* con una concentración bacteriana de 1.5. Amoah et al., (2001) transformaron tejido de inflorescencia de trigo utilizando densidad de cultivo bacteriano O.D.600nm = 2.0. Todos estos informes contrastan bastante con el presente estudio.

En general se ha determinado que existe una correlación positiva entre la densidad óptica de la bacteria y la tasa de transformación de explantes. Sin embargo, si esta concentración bacteriana es muy alta (DO600>1), complica la eliminación de la bacteria y por lo tanto propicia contaminación no deseada (Ribas et al., 2011). Además, se ha reportado que, al exponer tejidos de hojas de café a altas concentraciones bacterianas, los explantes presentan coloración amarillenta (Cazzonelli &

Velten, 2006). Por lo que una densidad de *A. tumefaciens* influye considerablemente en la eficiencia de transformación de la planta. Puede producirse necrosis y muerte celular del tejido después de que haya tenido lugar la transferencia de ADN-T, y las células recién transformadas incrustadas en dichos tejidos se pierden, disminuyendo así la recuperación de clones transformados (Potrykus, 1990). Además, algunos compuestos antimicrobianos se acumulan en los tejidos necróticos, lo que reduce potencialmente la capacidad de *A. tumefaciens* para colonizar las células vegetales y la subsiguiente transferencia de ADN-T (Goodman & Novacky, 1994). En cuanto a bajas densidades ópticas, esto induce una baja eficiencia de transformación; haciendo que la tasa de infección sea insuficiente para introducir el ADN-T (junto con los genes deseados) en las células de la planta y, si es demasiado alta, será difícil controlar el sobrecrecimiento bacteriano, lo que provocará la necrosis del explante (Curtis, 2010; Hada et al., 2018).

#### **b. Determinación del tiempo de agitación óptimo en la transformación genética de discos de hojas de café**

Mediante diversos experimentos realizados en café, se ha estudiado la influencia del periodo de agitación en el grado de expresión de los genes reporteros. Entre los diferentes tiempos de agitación en estudio, se presenta una mayor área transformada con 2 horas ( $51.7 \pm 24.3 \text{ mm}^2$ ) de los explantes en contacto con la bacteria (Figura 7-8, Cuadro 8). También se ha reportado una influencia positiva al usar agroinfiltración en diversos explantes y plantas, como el algodón (Leelavathi et al., 2004) y café (Canche-Moo et al., 2006). Lo cual es compatible con los resultados obtenidos, ya que los discos de hojas fueron tratados con un dermaroller que permitió la perforación del tejido foliar. Aunado a esto, los tratamientos y explantes del presente trabajo presentaron expresión transitoria del gen reportero, a excepción de los controles negativos que fueron tratados con una cepa silvestre. Relacionado a este parámetro, Subramanyam et al., (2011) indican que al sumergir la planta, o como es en este caso los discos de hoja, en una suspensión bacteriana líquida sumado a bajo presión para lograr vacío, y agitación; se ha logrado la

introducción de *A. tumefaciens* al interior del tejido vegetal, ya que aumenta el contacto entre la bacteria y el explante, mejorando la penetración y la eficiencia en la transferencia. La combinación de estos factores ha propiciado hasta un 33% de explantes transformados genéticamente en embriones de *C. canephora* (Canché-Moo et al., 2006). De igual manera, en *C. canephora* se han optimizado protocolos para inducir transformación en embriones somáticos empleando *A. rhizogenes*, y se determinó que había diferencias significativas entre los tratamientos en los cuales el material vegetal fue sometido a agitación, y a su vez, se observó una mayor tasa de eficiencia en explantes transformados tras emplear 2 horas de agitación (Kumar et al., 2006). En *C. canephora* y *C. arabica* para el desarrollo de suspensiones celulares, se han aplicado diferentes periodos de agitación y se han presentado mejores resultados cuando el material se coloca en la suspensión de interés bajo agitación, ya que facilita y aumenta el contacto de este con el líquido (Venial et al., 2020).

En *Cucumis sativus* L., se aplicó ausencia o presencia de agitación para la introducción de ADN foráneo empleando meristemas apicales y segmentos de hoja. En este experimento se obtuvo mayor porcentaje de transformación en los explantes a los cuales se les aplicó agitación, mostrando rangos entre 41 y 65%; mientras que al material donde no se aplicó agitación, el rango se encuentra entre el 19 y 39% (Baskaran et al., 2016). Lo mismo ocurre con protocornos de *Dendrobium* sp., donde se muestra un efecto beneficioso en la eficiencia de transformación con la cepa EHA101 al aplicar agitación. Se compararon 10, 20, 30 y 40 minutos de agitación, obteniendo mejores resultados en la tinción al emplear un tiempo de 30 minutos (13.9%), seguido por 40 minutos (6.9%), 20 minutos (5.6%) y 10 minutos (2.8%). Además, se colocaron protocornos con y sin agitación, obteniendo una eficiencia de transformación del 12% en presencia de agitación, y un 6.7% en explantes donde no se aplicó este factor (Phlaetita et al., 2015). De igual manera, en *Oryza sativa* L. al realizarse la transformación mediada por *A. tumefaciens* aplicando un periodo de inmersión de 30 minutos y en agitación, los porcentajes de explantes transformados presentan un 35% de transformación mayor en contraste con el material al cuál no se le aplicaron dichos parámetros (Fook et al., 2015). En *Ipomoea batatas* L., una agitación lenta y por periodos cortos

generan que las colonias de *Agrobacterium* sp. presenten una infección poco desarrollada empleando hojas, en comparación a una transformación estacionaria. Sin embargo, se ha determinado que la agitación propicia una alta densidad celular de *A. tumefaciens* y permite obtener suspensiones homogéneas durante una transformación (González et al., 2008).

Con base a diversos estudios, se ha determinado que la duración del tiempo de contacto influye significativamente en la transformación de explantes al ser cocultivados con *A. tumefaciens*, esto a su vez se ve favorecido al agregar acetosiringona en el medio a utilizar en el proceso (Mishra & Slater, 2012). Además, si los explantes son expuestos a agroinfiltración o se les realiza perforaciones con agujas y son colocados en agitación, se propicia el ingreso de la bacteria por las heridas realizadas al material (Subramanyam et al., 2011). Por lo que el periodo de agitación influye en el porcentaje de explantes y área transformada. Si se emplea un ciclo corto de agitación, la infección por parte de *A. tumefaciens* será menor en comparación a un periodo de más días (Feng et al., 2009; Subramanyam et al., 2011). Sin embargo, al ser la agitación una técnica efectiva para incorporar a *A. tumefaciens* en el tejido vegetal, se ha visto que una exposición por un periodo prolongado puede representar dificultades a la hora de suprimir la bacteria, requiriendo tratamientos con antibióticos para su completa eliminación. Además, estos periodos prolongados puede generar daños no deseados en el tejido por parte de la bacteria (Mehrotra et al., 2008; Feng et al., 2009; Hada et al., 2018).

### **c. Determinación del periodo de cocultivo óptimo en discos de hojas de café tras la transformación genética**

Al utilizar 1, 2 o 3 días de cocultivo, el mayor porcentaje de explantes transformados (100 %) y mayor promedio de área con la expresión transitoria ( $50.8 \pm 24.8 \text{ mm}^2$ ) se obtiene con 2 días de cocultivo, por lo que se considera como el periodo óptimo (Figura 9-10, Cuadro 9). En experimentos realizados en *C. arabica*, este periodo también coincide, ya que se compararon tiempos de cocultivo de 2 y 4 días a temperaturas de 25 y 28 °C. Obteniendo un mayor porcentaje



de explantes transformados con el tratamiento 25 °C-2 días (42 %) y 28°C-2 días (42%), mientras que con los tratamientos 25°C-4 días y 28°C-4 días los porcentajes de transformación fueron de un 38 y 91% respectivamente, pero además se presentaron altos porcentajes de contaminación (2 y 46% correspondientemente) (Lorz, 2018). La temperatura de incubación empleada para la optimización del periodo de cocultivo fue de 26 ( $\pm 2$  °C), por lo que las condiciones son similares al estudio anteriormente mencionado. Aunado a esto, estos resultados también muestran semejanza con lo propuesto por Ribas et al. (2011), en donde al utilizar *A. tumefaciens* LBA1119 para transformar callos embriogénicos de *C. arabica* se determinó que el tiempo de cocultivo óptimo era de 2 días. En *C. canephora*, se compararon periodos de 0, 1, 3 y 7 días de cocultivo tras realizar la transformación con la cepa EHA101 con callos, se obtuvieron los mejores porcentajes de expresión del gen reportero *uidA* con un ciclo de 3 días (aproximadamente 70%), mientras que para el periodo de 1 y 7 días el grado de transformación fue de aproximadamente 30 y 25%, respectivamente. Por lo que los autores indican que existe influencia entre el periodo de cocultivo y la frecuencia de transformación mediante la prueba histoquímica GUS (Mishra & Sreenath, 2004). En transformaciones de hipocótilos de *C. canephora*, se determinó que un periodo de cocultivo mayor a 4 días provoca un crecimiento incontrolable de la bacteria, generando necrosis y muerte celular de los explantes (Mishra et al., 2002).

Comparando este factor con otras plantas, en *Camellia sinensis* L., se emplearon periodos de cocultivo entre los 2 y 7 días. Obteniendo que el tiempo óptimo con el cual se tuvo una mayor eficiencia en la transformación empleando la cepa GV3101 fueron 2 días. Además, los resultados siguen un cocultivo por un tiempo mayor a 3 días presenta un decrecimiento en la frecuencia de transformación y un sobrecrecimiento de *A. tumefaciens* (Mohanpuria et al., 2011). Este crecimiento excesivo por parte de la bacteria también se ha reportado en investigaciones realizadas en *Pisum sativum* L., en donde los periodos entre 3-5 días generaban una contaminación bacteriana e incluso la muerte de los hipocótilos transformados con la cepa GV2260 (De Kathen & Jacobsen, 1990). De igual manera, en transformaciones con esta misma cepa realizadas en hipocótilos de *Daucus carota*, se determinó que al menos se requieren 2 días de cocultivo para que se logre la

introducción del ADN-T en los explantes (Thomas et al., 1989). En trabajos donde se emplearon segmentos de hoja de *Datura innoxia* para realizar transformaciones mediante *A. tumefaciens* LBA4404 se obtuvo una mayor frecuencia de transformación con 3 días de cocultivo (70.73%, seguido de 2 días de cocultivo (50.23 %) y un decrecimiento en el área de tinción con 4 días (45.87), sin embargo, para el tiempo 3 y 4 días, los segmentos presentaban contaminación (Sangwan et al., 1991). En híbridos de caña de azúcar (*Saccharum* spp), se comparó la eficiencia de transformación con *A. tumefaciens* LBA4404 y *A. tumefaciens* EHA105, y entre uno de los factores a analizar fue el tiempo de cocultivo. Se emplearon meristemas a los cuales por medio de una aguja se les realizaron perforaciones, expuestos a periodos de cocultivo de 2, 3, 4 y 5 días; con tratamientos con y sin acetosiringona. Entre los resultados obtenidos se muestra que al usar la cepa LBA4404, en presencia de acetosiringona (50 $\mu$ M) y un periodo de cocultivo de 3 días, los explantes de dos híbridos mostraron una mayor cantidad de material transformado (11.6  $\pm$  0.24 y 12.8  $\pm$  0.37, respectivamente). En cuanto al uso de la cepa EHA105, la mayor cantidad de explantes transformados se obtuvieron con la misma combinación de parámetros de la cepa anterior, mostrando valores de 23.03 ( $\pm$ 0.44) y 24.8 ( $\pm$ 0.37) para los híbridos en estudio de la caña de azúcar (Manickavasagam et al., 2004).

Por lo que el periodo de cocultivo y la eficiencia de transformación es influenciado por diferentes factores como el uso de acetosiringona, el tipo de explante e incluso la presencia de perforaciones en los explantes a utilizar (Manickavasagam et al., 2004; Ribas et al., 2011; Subramanyam et al., 2011). En periodos cortos de cocultivo, el contacto de la bacteria con el material de interés a transformar puede ser insuficiente para lograr una correcta incorporación del ADN foráneo en el genoma de la planta por transformar (Subramanyam et al., 2011; Mishra & Slater, 2012). Contrario a esto, se ha determinado mediante diferentes investigaciones que periodos de cocultivo mayores a 3 días pueden propiciar un crecimiento no deseado por parte de *A. tumefaciens*, generando como consecuencias negativas contaminación en el tejido vegetal, necrosis y muerte (Mishra et al., 2002; Hada et al., 2018) o incluso un decrecimiento en la eficiencia de transformación de la bacteria (Sangwan et al., 1991).

## 8.2 Evaluación del protocolo optimizado en la transformación genética y comprobación de la inserción del gen reportero *turbo-gfp* en el genoma de café

### a. Cuantificación de ADN

Los discos de hojas de café transformados con *A. tumefaciens* AGL1 silvestre no mostraron fluorescencia emitida por GFP. En el caso de las muestras transformadas con Empty CRISPR y con los vectores CRISPR con ARNg para los genes *NSH1*, *XMPasa* y *XMPasa + GDSA* mostraron fluorescencia dada por pigmentos en el tejido (Figura 11). El control negativo (AGL1 silvestre) indica que los explantes presentan fluorescencia emitida por pigmentos presente en los tejidos, ya que este tratamiento no contaba en su vector con el gen reportero *turbo-gfp*. Se ha determinado que la clorofila presente en cianobacterias y plantas fotosintéticas emiten fluorescencia. Este fenómeno se presencia aún mas en hojas jóvenes de plantas (de Souza et al., 2020) y se ha descrito en plantas de café (Toniutti et al., 2019; Cheroni et al., 2021). Al comparar la fluorescencia obtenida con el control negativo (AGL1 cepa silvestre) con los discos transformados con vectores CRISPR, se observa que en regiones donde se realizaron perforaciones con las microagujas se presencia puntos y pequeños fragmentos de las hojas con fluorescencia (Figura 11). Esto sugiere que las heridas realizadas al permitir el ingreso de la bacteria al tejido permiten la introducción del ADN foráneo (Subramanyam et al., 2011), dado que se da la presencia de fluorescencia por medio de la proteína GFP, indicando así una posible introducción del gen reportero *turbo-gfp* en el genoma del café.

Las concentraciones de ADN obtenidas presentan rangos muy variables y son pocas las muestras que presentan una pureza óptima tomando en cuenta la relación 260/280 y 260/230 (Cuadro 10), dado que un rango aceptable para considerar la concentración del ADN obtenido de buena calidad es entre 1.8 y 2.0 con respecto a la relación 260/280 y una relación  $A_{260}/280 > 1.6$  indica un ADN de pureza aceptable, mientras que proporciones menores a 1.6 indican la presencia de proteínas y compuestos aromáticos como fenoles. Y una proporción 260/280 mayor a 2.1 podría indicar la presencia de ARN en la muestra (Luebbehusen, 2006; Velázquez et al., 2014).

En cuanto a la relación 260/230, las muestras de ADN extraído presentaron valores a 1.0 indicando contaminación (Cuadro 10). Los valores aceptados para esta proporción se encuentran en el rango de 2.0 a 2.2, una proporción menor a 1.8 indica la presencia de contaminantes en las muestras de ADN. Si esta relación muestra valores menores a 1.5, indica una impureza significativa que podría repercutir en la funcionalidad, tales impurezas podrían ser sales caotrópicas, fenoles y carbohidratos (Velázquez et al., 2014; Ubieta et al., 2020). Sin embargo, se ha determinado es este parámetro muestra variaciones dependiendo de la concentración del ADN o de la composición del tampón de resuspensión de la muestra (Luebbehusen, 2006; Banco Nacional de ADN Carlos III, 2020).

#### **b. Determinación por métodos moleculares de la presencia del gen *turbo-gfp* y el gen *hptII* en el genoma del café**

Por medio de la amplificación del gen de la subunidad ribosomal 18S (ADNr 18S) en muestras de ADN de discos de hojas de café se confirmó la calidad del ADN extraído (Figura 12). Además, las muestras de ADN presentan un tamaño de fragmento esperado según lo propuesto por Gatica et al., (2012b), las muestras 6-20 presentan bandas débiles lo que podría indicar una baja concentración de ADN. En cuanto a la amplificación del gen *virG*, se obtuvo la amplificación de los controles positivos (muestras 4-5, Figura 13), las cuales corresponden a ADN de LBA4404 y ATHV. Pero no amplificaron fragmentos en las muestras de ADN extraído proveniente de los discos de hojas de café transformados con *A. tumefaciens* AGL1 (muestras 6-20, Figura 13). Esto permite descartar la contaminación de las muestras con ADN de *A. tumefaciens*, al utilizar el protocolo definido por Gatica (2013a). Las muestras de ADN de los plásmidos LBA4404 y ATHV (controles positivos), presentan un tamaño de fragmentos entre 390 y 400 pb, lo cual coincide con lo propuesto por Gatica (2013a), en donde se esperaba amplificación de aproximadamente 390 pb.

En cuanto a la amplificación del gen *turbo-gfp* en discos de hojas de *C. arabica* transformados mediante *A. tumefaciens* AGL1 con plásmidos CRISPR que poseen ARNg correspondientes a los

genes *NSH1*, *XMPasa* y *XMPasa* + *GDSA*, no amplificaron el gen reportero (muestras 6-20, Figura 14), cuyo tamaño correspondía a aproximadamente a 500pb (Gatica et al., 2012a). Estos resultados comprueban que los discos de hoja no tenían incorporado en su genoma el gen reportero *turbo-gfp*. También, se realizó la amplificación del gen *hptII* en las muestras de hoja (muestras 6-20, Figura 15), para comprobar la incorporación del gen en el genoma de café, sin embargo, no se obtuvo amplificación, cuyo tamaño debía ser de aproximadamente 500 pb (Gatica, 2013). Esto indica que el protocolo optimizado mediante *A. tumefaciens* ATHV::pCAMBIA 1303 con hojas de *C. arabica* y luego comprobado para la inserción del gen reportero *turbo-gfp* mediante el sistema CRISPR/Cas9 requiere ser optimizado para una adecuada transformación y edición genética de los explantes.

Debido que las pruebas moleculares indican que no se logró la inserción del gen reportero en el genoma del café, es importante resaltar que las muestras analizadas con el microscopio empleando un filtro de GFP, indicaban una posible inserción debido a la presencia de fluorescencia. Sin embargo, la calidad e integridad del ADN obtenido de las muestras indicaban baja pureza e integridad por lo que estos factores podrían ser determinantes e influir en los resultados de pruebas moleculares, impidiendo comprobar o descartar una integración estable del gen reportero *turbo-gfp* en el genoma de los genes de interés.

## 9. CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo efectivo para la transformación *ex vitro* a partir de explantes de discos de hojas de *C. arabica*. Por medio de la tinción GUS se determinó la expresión del gen reportero mediante *A. tumefaciens* ATHV, la cual cuentan con el vector binario pCAMBIA 1303, que contiene el gen reportero *uidA*, el cuál codifica para la proteína GUS, bajo el control del promotor CAMV35S. En la optimización de la concentración de la bacteria (DO600), se determinó que la mayor área transformada se obtuvo con una densidad óptica de 0.8, siendo el promedio de área transformado de  $51.9 (\pm 25,1) \text{ mm}^2$ . En cuanto al tiempo de agitación, se analizó el nivel de expresión del gen reportero por medio de la prueba histoquímica GUS ante 60, 120 y 180 minutos de agitación, siendo el tiempo de 120 minutos el parámetro que mostró un mayor promedio en el área de transformación en los discos de hoja ( $51.7 \pm 24.3 \text{ mm}^2$ ). De igual manera, el periodo de cocultivo con mayores valores de área de tinción fue el de 2 días ( $50.8 \pm 24.8 \text{ mm}^2$ ), siendo este tiempo el que presentó mayor expresión transitoria del gen *uidA* para la optimización. En la estandarización de dicho protocolo, se obtuvo que para la densidad óptica de 0.8, el tiempo de agitación y periodo de cocultivo 100% de porcentaje de explantes transformados en cada parámetro.

En la optimización de la densidad óptica, tiempo de agitación y periodo de cocultivo, se evidenció la influencia de aspectos tales como la presencia de perforaciones en los explantes por medio de un dermaroller y el uso de acetosiringona durante el proceso de transformación genética, ya que se ha descrito que estas características propician una mayor eficacia en la transformación. En el caso del uso de microagujas, estas heridas facilitan el ingreso de la bacteria en el tejido foliar de las hojas; y con la acetosiringona se presentan tasas de transformación mas eficientes. Además se determinó en cuando a la concentración de la bacteria, que concentraciones muy bajas propician que la transferencia del ADN-T sea ineficiente, mientras que concentraciones elevadas repercuten en la eliminación de la bacteria, generando así contaminación y daños a los explantes como coloración amarillenta y tejidos necróticos. Con relación al tiempo de agitación y periodo de cocultivo, estos parámetros benefician la introducción del ADN foráneo al explante. La duración

de la agitación y cocultivo será proporcional al grado de infección de la bacteria y por lo tanto a la tinción mediante la prueba histoquímica GUS. Sin embargo, por periodos prolongados se pueden presentar dificultades ya que los antibióticos no resultan tan eficientes para suprimir la bacteria y se pueden presentar daños en los explantes.

Con respecto a la evaluación del protocolo optimizado y la comprobación de la inserción del gen reportero en la transformación genética con *A. tumefaciens* AGL1 mediada por el sistema CRISPR/Cas9, requiere mejoras y continua optimización, ya que no se logró la inserción del gen reportero al emplear los plásmidos CRISPR que poseen los ARN guías respectivos para los genes *NSH1*, *XMPasa* y *XMPasa + GDSA*. En las muestras empleadas, se lograron resultados deseados en cuanto a la amplificación de la subunidad ribosomal 18S (ADNr 18S), ya que esto confirmó la calidad del ADN extraído de las muestras de hojas de café. Al igual que en la amplificación del gen *virG*, en esta no se obtuvieron fragmentos lo cual permitió descartar contaminación de las muestras con ADN con *A. tumefaciens*. No obstante, en cuanto a la amplificación del gen reportero *turbo-gfp* y el gen de selección en plantas *hptII*, que presenta resistencia a la higromicina no se obtuvieron fragmentos, por lo que no se puede confirmar la inserción y edición genética para las muestras empleadas.

Se logró visualizar pequeños fragmentos cercanos a heridas en los discos de hoja que presentaban fluorescencia, lo que indica una posible inserción del gen reportero en el genoma del café. Sin embargo, la baja calidad e integridad del ADN, además de la contaminación por compuestos fenólicos son factores que afectan durante la ejecución de las pruebas moleculares para la amplificación del gen reportero *turbo-gfp* y el gen *hptII*, por lo que esto repercute en los resultados obtenidos con las PCR y el análisis de la integración del gen reportero *turbo-gfp* en el genoma de los genes de interés.

## 10. RECOMENDACIONES

En cuanto a la optimización de parámetros para llevar a cabo la transformación genética mediante *A. tumefaciens*, se sugiere para el factor de tiempo de agitación incluir tratamientos donde no se aplique agitación. Además de incluir y considerar otros parámetros como tiempos y presión a la hora de aplicar vacío, ya que en este trabajo solo se evaluó el protocolo con 30 minutos de vacío a una presión de 500 mmHg. También evaluar diferentes concentraciones de acetosiringona para la transformación con la cepa ATHV. En cuanto al tiempo de cocultivo, se sugiere la evaluación de diferentes temperaturas de incubación.

Las transformaciones realizadas para optimizar parámetros se llevaron a cabo con la cepa ATVH, sin embargo, las transformaciones relacionadas a la edición de genes mediante la inserción del gen reportero se ejecutaron con la cepa AGL1, por lo que se sugiere homogeneizar la cepa con la que se va a trabajar a lo largo de las transformaciones genéticas, ya que la virulencia que estas presentan puede influir en la optimización de los factores empleados.

Se sugiere para futuros trabajos, la incorporación de pruebas moleculares como Southern blot, con la finalidad de determinar la presencia de copias de ADN-T en el genoma de la planta que se desee transformar o editar genéticamente.



## 11. REFERENCIAS

- Alagoz, Y., Gurkok, T., Zhang, B., & Unver, T. (2016). Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. *Scientific reports*, 6(1), 1-9.
- Albuquerque, E. V., Cunha, W. G., Barbosa, A. E., Costa, P. M., Teixeira, J. B., Vianna, G. R., ... & Grossi-de-Sa, M. F. (2009). Transgenic coffee fruits from *Coffea arabica* genetically modified by bombardment. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 45(5), 532-539.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Espeout, S., Royer, M., Lecouls, A. C., Nicole, M., ... & Etienne, H. (2006). Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports*, 25(9), 959-967.
- Alpizar, E., Dechamp, E., Lapeyre-Montes, F., Guilhaumon, C., Bertrand, B., Jourdan, C., ... & Etienne, H. (2008). *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Annals of Botany*, 101(7), 929-940.
- Amoah, B. K., Wu, H., Sparks, C., & Jones, H. D. (2001). Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transient expression of *uid A* in wheat inflorescence tissue. *Journal of Experimental Botany*, 52(358), 1135-1142.
- Andersson, M., Turesson, H., Nicolia, A., Fält, A. S., Samuelsson, M., & Hofvander, P. (2017). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR-Cas9 expression in protoplasts. *Plant cell reports*, 36(1), 117-128.
- Ashihara, H., & Crozier, A. (1999). Biosynthesis and metabolism of caffeine and related purine alkaloids in plants. *Advances in Botanical Research*, 30, 117-205.

- Ashihara H, Sano H, & Crozier A (2008). Caffeine and related purine alkaloids: biosynthesis, catabolism, function and genetic engineering, *Phytochemistry* 69, 841–856.
- Baccolini, C., & Witte, C. P. (2019). AMP and GMP catabolism in *Arabidopsis* converge on xanthosine, which is degraded by a nucleoside hydrolase heterocomplex. *The Plant Cell*, 31(3), 734-751.
- Banco Nacional de ADN Carlos III. (2020). *Programa control de calidad de ácidos nucleicos*. Universidad de Salamanca. Recuperado el 7 de setiembre del 2020 de [www.bancoadn.org](http://www.bancoadn.org)
- Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., ... & Horvath, P. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315(5819), 1709-1712.
- Barrangou, R. (2013). CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 4(3), 267-278.
- Barrangou, R., Birmingham, A., Wiemann, S., Beijersbergen, R. L., Hornung, V., and Smith, A. (2015). Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic Acids Research*, 43, 3407–3419. doi: 10.1093/nar/gkv226
- Barton, C.R., Adams, T.L. & Zarowitz, M.A. (1991) Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants. In: Proceedings of 14th Colloquium of International Coffee Science Association (ASIC), San Francisco, USA. pp. 460-464.
- Baskaran, P., Soós, V., Balázs, E., & Van Staden, J. (2016). Shoot apical meristem injection: a novel and efficient method to obtain transformed cucumber plants. *South African Journal of Botany*, 103, 210-215.
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Borrell, B. (2012). Plant biotechnology: Make it a decaf. *Nature News*, 483(7389), 264-266.

- Borrelli, V. M., Brambilla, V., Rogowsky, P., Marocco, A., & Lanubile, A. (2018). The enhancement of plant disease resistance using CRISPR/Cas9 technology. *Frontiers in plant science*, 9, 1245-1260. doi: 10.3389/fpls.2018.01245
- Bortesi, L., & Fischer, R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology advances*, 33(1), 41-52.
- Breitler, J. C., Dechamp, E., Campa, C., Rodrigues, L. A. Z., Guyot, R., Marraccini, P., & Etienne, H. (2018). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis has the potential to accelerate the domestication of *Coffea canephora*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(3), 383-394.
- Brinkman, E. K., Chen, T., de Haas, M., Holland, H. A., Akhtar, W., & van Steensel, B. (2018). Kinetics and fidelity of the repair of Cas9-induced double-strand DNA breaks. *Molecular cell*, 70(5), 801-813.
- Carneiro, M. F. (1999). Advances in coffee biotechnology. *AgBiotechNet*, 1, 1-7.
- Campa, C., Noirot, M., Bourgeois, M., Pervent, M., Ky, C. L., Chrestin, H., ... & De Kochko, A. (2003). Genetic mapping of a caffeoyl-coenzyme A 3-O-methyltransferase gene in coffee trees. Impact on chlorogenic acid content. *Theoretical and Applied Genetics*, 107(4), 751-756.
- Cazzonelli, C. I., & Velten, J. (2006). An *in vivo*, luciferase-based, *Agrobacterium*-infiltration assay system: implications for post-transcriptional gene silencing. *Planta*, 224(3), 582-597.
- Chen, L., Li, W., Katin-Grazzini, L., Ding, J., Gu, X., Li, Y., ... & Li, Y. (2018). A method for the production and expedient screening of CRISPR/Cas9-mediated non-transgenic mutant plants. *Horticulture research*, 5(1), 1-12.
- Cherono, S., Ntini, C., Wassie, M., Mollah, M. D., Belal, M. A., Ogutu, C., & Han, Y. (2021). Exogenous application of melatonin improves drought tolerance in coffee by regulating

- photosynthetic efficiency and oxidative damage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 146(1), 24-32.
- Chylinski, K., Makarova, K. S., Charpentier, E., & Koonin, E. V. (2014). Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic acids research*, 42(10), 6091-6105.
- Concepción-Hernández, M. (2018). CRISPR/Cas: aplicaciones y perspectivas para el mejoramiento genético de plantas. *Bioctecnología Vegetal*, 18(3), 135-149.
- Curtis, I. S. (2010). Genetic Transformation—Agrobacterium. *Plant Cell Culture, Essential Methods*, 199-215.
- da Silva, R. F., & Menéndez-Yuffá, A. (2003). Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 6(1), 11-12.
- Das, D.K., Reddy, M.K., Upadhyaya, K.C., & Sopory, S.K. (2002). An efficient leaf-disk culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). *Plant Cell Reports*, 20, 999-1005.
- Dahncke, K., & Witte, C. P. (2013). Plant purine nucleoside catabolism employs a guanosine deaminase required for the generation of xanthosine in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25(10), 4101-4109.
- Davis, A. P., Gole, T. W., Baena, S., & Moat, J. (2012). The impact of climate change on indigenous arabica coffee (*Coffea arabica*): predicting future trends and identifying priorities. *PloS one*, 7(11), 1-13.
- de Souza, B. P., Martinez, H. E. P., de Carvalho, F. P., Loureiro, M. E., & Sturião, W. P. (2020). Gas exchanges and chlorophyll fluorescence of young coffee plants submitted to water and nitrogen stresses. *Journal of Plant Nutrition*, 43(16), 2455-2465.

- De Kathen, A., & Jacobsen, H. J. (1990). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Pisum sativum* L. using binary and cointegrate vectors. *Plant Cell Reports*, 9(5), 276-279. doi:10.1007/bf00232301
- De Maria, C. A. B., Trugo, L. C., Neto, F. A., Moreira, R. F. A., & Alviano, C. S. (1996). Composition of green coffee water-soluble fractions and identification of volatiles formed during roasting. *Food Chemistry*, 55(3), 203-207.
- Déchamp, E., Breitler, J. C., Leroy, T., & Etienne, H. (2015). Coffee (*Coffea arabica* L.). In *Agrobacterium protocols* (pp. 275-291). Springer, New York, NY.
- Demirci, Y., Zhang, B., & Unver, T. (2018). CRISPR/Cas9: an RNA-guided highly precise synthetic tool for plant genome editing. *Journal of cellular physiology*, 233(3), 1844-1859.
- Farooq, R., Hussain, K., Nazir, S., Javed, M. R., & Masood, N. (2018). CRISPR/Cas9; A robust technology for producing genetically engineered plants. *Cellular and Molecular Biology*, 64(14), 31-38.
- Fernández, R., de Guglielmo Cróquer, Z., & Yuffá, A. M. (2010). Cultivo de tejidos y transformación genética del café. *Revista de investigación*, 34(71), 57-84.
- Feng, S., Xue, L., Liu, H., & Lu, P. (2009). Improvement of efficiency of genetic transformation for *Dunaliella salina* by glass beads method. *Molecular biology reports*, 36(6), 1433-1439.
- Fook, C. W. K., Lai, K. S., Wong, M. Y., & Mahmood, M. (2015). Efficient regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 27, 837-848.
- Canche-Moo, R. L. R., Ku-Gonzalez, A., Burgeff, C., Loyola-Vargas, V. M., Rodríguez-Zapata, L. C., & Castaño, E. (2006). Genetic transformation of *Coffea canephora* by vacuum infiltration. *Plant cell, tissue and organ culture*, 84(3), 373-377.

- Gatica-Arias AM, Amma N, Stanke M, Weber G (2012a) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettninger): establishment of a system for functional evaluation of genes. *Brewing Science* 65: 91-95.
- Gatica-Arias AM, Farag MA, Stanke M, Matoušek J, Wessjohann L, Weber G. (2012b) Flavonoid production in transgenic hop (*Humulus lupulus* L.) altered by PAP1/MYB75 from *Arabidopsis thaliana* L. *Plant Cell Reports*, 31: 111-119.
- Gatica, A. (2013a). SOP 13: Amplificación del gen *virG*. Modificado de Gatica, A., Amma, N., Stanke, M. y Weber, G. (2012). *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L. cv. Tettninger): establishment of a system for functional evaluation of genes. *Brewing Science*, 65, 91-95.
- Gatica, A. (2013b). SOP 8: Amplificación del gen *hpt*. Modificado de Aguilar, C. (2013). Amplificación del gen *hpt*. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, UCR, Costa Rica.
- Gatica, A. (2013c). SOP 26: Test *GUS*. Modificado del protocolo definido por Horlemann, C. (s.f). SOP 21: Test *GUS*. Universidad de Hohenheim, Alemania.
- Gelvin, S. B. (2003). *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(1), 16-37.
- Gimenez, C., Menendez-Yuffa, A., & Garcia, E. (1994). Preliminary studies for genetic improvement of coffee (*Coffea arabica*) by methods of genetic engineering. In *VIIIth international congress of plant tissue and cell culture, Florence, Italy*, pp. 12-17.
- González, R. G., Sánchez, D. S., Guerra, Z. Z., Quesada, A. L., Valdivia, R. M., Arencibia, A. D., ... & Caligari, P. D. (2008). Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) cultivars. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology & Biotechnology*, 16(2), 25-33.

- Goodman, R. N., & Novacky, A. J. (1994). *The hypersensitive reaction in plants to pathogens: a resistance phenomenon*. American Phytopathological Society (APS).
- Hada, A., Krishnan, V., Jaabir, M., Kumari, A., Jolly, M., Praveen, S., & Sachdev, A. (2018). Improved *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] following optimization of culture conditions and mechanical techniques. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 54(6), 672-688.
- Harayama T, Riezman H (2017) Detection of genome-edited mutant clones by a simple competition-based PCR method. *PLoS one*, 12(6): e0179165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179165>.
- Hatanaka, T., Choi, Y. E., Kusano, T., & Sano, H. (1999). Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Reports*, 19(2), 106-110.
- Heinemann, K. J., Yang, S. Y., Straube, H., Medina-Escobar, N., Varbanova-Herde, M., Herde, M., ... & Witte, C. P. (2021). Initiation of cytosolic plant purine nucleotide catabolism involves a monospecific xanthosine monophosphate phosphatase. *Nature communications*, 12(1), 1-9.
- Hu, T., Metz, S., Chay, C., Zhou, H. P., Biest, N., Chen, G., ... & Fry, J. (2003). *Agrobacterium*-mediated large-scale transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.) using glyphosate selection. *Plant Cell Reports*, 21(10), 1010-1019.
- Ishino, Y., Krupovic, M., & Forterre, P. (2018). History of CRISPR-Cas from encounter with a mysterious repeated sequence to genome editing technology. *Journal of bacteriology*, 200(7), e00580-17. doi: 10.1128/JB.00580-17
- Ivamoto, S. T., Sakuray, L. M., Ferreira, L. P., Kitzberger, C. S., Scholz, M. B., Pot, D., ... & Pereira, L. F. (2017). Diterpenes biochemical profile and transcriptional analysis of

- cytochrome P450s genes in leaves, roots, flowers, and during *Coffea arabica* L. fruit development. *Plant Physiology and Biochemistry*, 111, 340-347.
- Jefferson, R. A. (1989). The *GUS* reporter gene system. *Nature*, 342(6251), 837-838.
- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A., & Bevan, M. W. (1987). *GUS* fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO journal*, 6(13), 3901-3907.
- Jia, Q., Zeng, H., Li, H., Xiao, N., Tang, J., Gao, S., ... & Xie, W. (2021). The C-terminal loop of *Arabidopsis thaliana* guanosine deaminase is essential to catalysis. *Chemical Communications*, 57(76), 9748-9751.
- Jin, J.Q., Yao, Z., Ma, C.L., Ma, J.Q. & Chen, L. (2016). Association mapping of caffeine content with *TCSI* in tea plant and its related species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 251-259.
- Johnson, R. A., Gurevich, V., Filler, S., Samach, A., & Levy, A. A. (2015). Comparative assessments of CRISPR-Cas nucleases cleavage efficiency in planta. *Plant molecular biology*, 87(1-2), 143-156.
- Jung, B., Florchinger, M., Kunz, H.H., Traub, M., Wartenberg, R., Jeblick, W., Neuhaus, H.E. and Mohlmann, T. (2009) Uridine-ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 876–891.
- Jung, B., Hoffmann, C., & Möhlmann, T. (2011). *Arabidopsis* nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. *The Plant Journal*, 65(5), 703-711.
- Kamburova, V. S., Nikitina, E. V., Shermatov, S. E., Buriev, Z. T., Kumpatla, S. P., Emani, C., & Abdurakhmonov, I. Y. (2017). Genome editing in plants: an overview of tools and applications. *International Journal of Agronomy*, 2017, 1-15.
- Katahira, R., and Ashihara, H. (2006). Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta*, 225, 115–126.



- Kato, M., & Mizuno, K. (2004). Caffeine synthase and related methyltransferases in plants. *Frontiers in Bioscience*, 9(1-3), 1833-1842.
- Kato, M., Mizuno, K., Crozier, A., Fujimura, T. & Ashihara, H. (2000) Caffeine synthase gene from tea leaves. *Nature*, 406, 956–957.
- Ke, X. Y., McCormac, A. C., Harvey, A., Lonsdale, D., Chen, D. F., & Elliott, M. C. (2002). Manipulation of discriminatory T-DNA delivery by *Agrobacterium* into cells of immature embryos of barley and wheat. *Euphytica*, 126(3), 333-343.
- Keya, C. A., Crozier, A., & Ashihara, H. (2003). Inhibition of caffeine biosynthesis in tea (*Camellia sinensis*) and coffee (*Coffea arabica*) plants by ribavirin. *FEBS letters*, 554(3), 473-477.
- Koshiishi, C., Kato, A., Yama, S., Crozier, A., & Ashihara, H. (2001). A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. *FEBS letters*, 499(1-2), 50-54.
- Koyama, Y., Tomoda, Y., Kato, M., & Ashihara, H. (2003). Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41(11-12), 977-984.
- Kui, L., Chen, H., Zhang, W., He, S., Xiong, Z., Zhang, Y., ... & Cai, J. (2017). Building a genetic manipulation tool box for orchid biology: identification of constitutive promoters and application of CRISPR/Cas9 in the orchid, *Dendrobium officinale*. *Frontiers in plant science*, 7, 2036-2049.
- Kumar, V., Satyanarayana, K. V., Sarala Itty, S., Indu, E. P., Giridhar, P., Chandrashekar, A., & Ravishankar, G. A. (2006). Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. by *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. *Plant Cell Reports*, 25(3), 214-222.

- Kumria, R., Waie, B., & Rajam, M.V. (2001). Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite Indica rice via *Agrobacterium*. *Plant Cell Tissue Organ Cult*, 67, 63-71.
- Kuta, D.D., & Tripathi, L. (2005) *Agrobacterium*-induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium* mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology*. 4, 752–757.
- Lammoglia-Cobo, M. F., Lozano-Reyes, R., García-Sandoval, C. D., Avilez-Bahena, C. M., Trejo-Reveles, V., Muñoz-Soto, R. B., & López-Camacho, C. (2016). The revolution in genetic engineering: CRISPR/Cas system. *Investigación en Discapacidad*, 5(2), 116-128.
- Leroy, T., & Dufour, M. (2004). *Coffea* spp. Genetic transformation. In *Transgenic Crops of the World* (pp. 159-169). Springer, Dordrecht.
- Leelavathi, S., Sunnichan, V. G., Kumria, R., Vijaykanth, G. P., Bhatnagar, R. K., & Reddy, V. S. (2004). A simple and rapid *Agrobacterium*-mediated transformation protocol for cotton (*Gossypium hirsutum* L.): embryogenic calli as a source to generate large numbers of transgenic plants. *Plant cell reports*, 22(7), 465-470.
- Li, B., Cui, G., Shen, G., Zhan, Z., Huang, L., Chen, J., & Qi, X. (2017). Targeted mutagenesis in the medicinal plant *Salvia miltiorrhiza*. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Liang, Z., Chen, K., & Gao, C. (2019). Biolistic Delivery of CRISPR/Cas9 with Ribonucleoprotein Complex in wheat. En: *Plant Genome Editing with CRISPR Systems* (pp. 327-335). Humana Press, New York, United States.
- Liang, Z., Chen, K., Li, T., Zhang, Y., Wang, Y., Zhao, Q., ... & Gao, C. (2017). Efficient DNA-free genome editing of bread wheat using CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 8(1), 1-5.
- Liaw, S. H., Chang, Y. J., Lai, C. T., Chang, H. C., & Chang, G. G. (2004). Crystal structure of *Bacillus subtilis* guanine deaminase: the first domain-swapped structure in the cytidine deaminase superfamily. *Journal of Biological Chemistry*, 279(34), 35479-35485.

- Li, P., Ye, Z., Fu, J., Xu, Y., Shen, Y., Zhang, Y., ... & Zhao, J. (2022). *CsMYB184* regulates caffeine biosynthesis in tea plants. *Plant Biotechnology Journal*, 20(6), 1012-1014.
- Liu, D., Hu, R., Palla, K. J., Tuskan, G. A., & Yang, X. (2016). Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research. *Current Opinion in Plant Biology*, 30, 70-77. doi: 10.1016/j.pbi.2016.01.007
- Lorz, L. R. (2018). *Evaluación de los factores que afectan la regeneración in vitro y la transformación genética en café (Coffea arabica L.) mediada por Agrobacterium tumefaciens*. [Tesis de licenciatura]. Universidad de Costa Rica.
- Luebbehusen, H. (2006). The significance of the 260/230 ratio in determining nucleic acid purity. *Genomic and RNA Profiling Core [online]; Baylor College of Medicine: Houston, TX, USA*.
- Luo, M., Gilbert, B., & Ayliffe, M. (2016). Applications of CRISPR/Cas9 technology for targeted mutagenesis, gene replacement and stacking of genes in higher plants. *Plant Cell Reports*, 35(7), 1439-1450.
- Ma, W., Kang, X., Liu, P., Zhang, Y., Lin, X., Li, B., & Chen, Z. (2021). The analysis of transcription factor *CsHBI* effects on caffeine accumulation in tea callus through CRISPR/Cas9 mediated gene editing. *Process Biochemistry*, 101, 304-311.
- Malzahn, A., Lowder, L., & Qi, Y. (2017) Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell and Bioscience*, 2017, 7-21. doi: 10.1186/s13578-017-0148-4
- Manickavasagam, M., Ganapathi, A., Anbazhagan, V. R., Sudhakar, B., Selvaraj, N., Vasudevan, A., & Kasthuriengan, S. (2004). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation and development of herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum* species hybrids) using axillary buds. *Plant cell reports*, 23(3), 134-143.
- Mazzafera, P. (2012). Which is the by-product: caffeine or decaf coffee?. *Food and Energy Security*, 1(1), 70-75.

- McCormac, A. C., Wu, H., Bao, M., Wang, Y., Xu, R., Elliott, M. C., & Chen, D. F. (1998). The use of visual marker genes as cell-specific reporters of *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery to wheat (*Triticum aestivum* L.) and barley (*Hordeum vulgare* L.). *Euphytica*, 99(1), 17-25.
- Mehrotra, S., Kumar Kukreja, A., Singh Khanuja, S. P., & Nath Mishra, B. (2008). Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11(2), 69-75.
- Melese, K. (2016). The role of biotechnology on coffee plant propagation: A current topics paper. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 6 (5), 13-19.
- Mishra, M. K., & Sreenath, H. L. (2004). High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of coffee (*Coffea canephora* Pierre ex. Frohner) using hypocotyl explants. In *Proceedings of the 19th ASIC Colloquium. Bangalore, India* (pp. 792-796).
- Mishra, M. K., Sreenath, H. L., & Srinivasan, C. S. (2002). *Agrobacterium*-mediated transformation of coffee: an assessment of factors affecting gene transfer efficiency. In *Proceedings of the 15th Plantation Crops Symposium Placrosym XV, Mysore, India, 10-13 December, 2002* (pp. 251-255). Central Coffee Research Institute, Coffee Research Station.
- Mishra, M. K., & Slater, A. (2012). Recent advances in the genetic transformation of coffee. *Biotechnology research international*, 2012, 1-17. doi:10.1155/2012/580857
- Mishra, M. K. (2019). Genetic Resources and Breeding of Coffee (*Coffea* spp.). En: Jain, S. M., Johnson, D. V., & Al-Khayri, J. M. (Ed). *Advances in Plant Breeding Strategies: Nut and Beverage Crops*, Vol. 4. (pp. 475-515). Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland.
- Mizuno, K., Kato, M., Irino, F., Yoneyama, N., Fujimura, T., Ashihara, H., (2003<sup>a</sup>). The first committed step reaction of caffeine biosynthesis: 7- methylxanthosine synthase is closely

- homologous to caffeine synthases in coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Letters*, 547, 56–60.
- Mizuno, K., Okuda, A., Kato, M., Yoneyama, N., Tanaka, H., Ashihara, H., Fujimura, T., (2003b). Isolation of a new dual-functional caffeine synthase gene encoding an enzyme for the conversion of 7-methylxanthine to caffeine from coffee (*Coffea arabica* L.). *FEBS Letters*, 534, 75–81.
- Mofatto, L. S., de Araújo Carneiro, F., Vieira, N. G., Duarte, K. E., Vidal, R. O., Alekcevetch, J. C., ... & Leroy, T. (2016). Identification of candidate genes for drought tolerance in coffee by high-throughput sequencing in the shoot apex of different *Coffea arabica* cultivars. *BMC plant biology*, 16(1), 94.
- Mohanpuria, P., Kumar, V., Ahuja, P. S., & Yadav, S. K. (2011). *Agrobacterium*-mediated silencing of caffeine synthesis through root transformation in *Camellia sinensis* L. *Molecular biotechnology*, 48(3), 235-243.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Negishi, O., Ozawa, T., & Imagawa, H. (1988). N-methyl nucleosidase from tea leaves. *Agricultural and biological chemistry*, 52(1), 169-175.
- Negishi, O., Ozawa, T., & Imagawa, H. (1994). Guanosine deaminase and guanine deaminase from tea leaves. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 58(7), 1277-1281.
- Nussenzweig, P. M., & Marraffini, L. A. (2020). Molecular mechanisms of CRISPR-Cas immunity in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 54, 93-120.
- Ocampo, C. A., & Manzanera, L. M. (1992). Advances in genetic manipulation of the coffee plant. In 14. *Colloque Scientifique International sur le Cafe, San Francisco (Etats Unis)*, 14-19.

- Ogawa, M., Herai, Y., Koizumi, N., Kusano, T., & Sano, H. (2001). 7-Methylxanthine methyltransferase of coffee plants: gene isolation and enzymatic properties. *Journal of Biological Chemistry*, 276(11), 8213-8218.
- Ogita, S., Uefuji, H., Morimoto, M., & Sano, H. (2004). Application of RNAi to confirm theobromine as the major intermediate for caffeine biosynthesis in coffee plants with potential for construction of decaffeinated varieties. *Plant molecular biology*, 54(6), 931-941.
- Ortega, G. M., Rubio, E. C., & López, J. L. G. (2013). *Biotechnología y alimentación*. Editorial UNED, San Jose, Costa Rica.
- Pacurar, D. I., Thordal-Christensen, H., Păcurar, M. L., Pamfil, D., Botez, C., & Bellini, C. (2011). *Agrobacterium tumefaciens*: From crown gall tumors to genetic transformation. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 76(2), 76-81.
- Phlaetita, W., Chin, D. P., Tokuhara, K., Nakamura, I., & Mii, M. (2015). Agrobacterium-mediated transformation of protocorm-like bodies in *Dendrobium* Formidible 'Ugusu'. *Plant Biotechnology*, 15, 604-619.
- Potrykus, I. (1990). Gene transfer to cereals: an assessment. *Nat. Biotechnol.*, 8, 535-542.
- Pua, E. C., & Davey, M. R. (Eds.). (2007). *Transgenic crops V* (Vol. 60). Springer Science & Business Media. Berlin, Alemania, pp 476.
- Rashid, H., Afzal, A., Khan, M. H., Chaudhry, Z., & Malik, S. A. (2010). Effect of bacterial culture density and acetosyringone concentration on *Agrobacterium* mediated transformation in wheat. *Pakistan Journal of Botany*, 42(6), 4183-4189.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Lin, C. Y., Gootenberg, J. S., Konermann, S., Trevino, A. E., ... & Zhang, F. (2013). Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 154(6), 1380-1389.

- Ricroch, A., Clairand, P., & Harwood, W. (2017). Use of CRISPR systems in plant genome editing: toward new opportunities in agriculture. *Emerging Topics in Life Sciences*, 1(2), 169-182.
- Riegler, H., Geserick, C., & Zrenner, R. (2011). *Arabidopsis thaliana* nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. *New Phytologist*, 191(2), 349-359.
- Ribas, A. F., Galvão, R. M., Pereira, L. F. P., & Vieira, L. G. E. (2005). Transformação de *Coffea arabica* com o gene da ACC-oxidase em orientação antisense. In *Proceedings of the 50th Congresso Brasileiro de Genética* (p. 492).
- Ribas, A. F., Dechamp, E., Champion, A., Bertrand, B., Combes, M. C., Verdeil, J. L., ... & Etienne, H. (2011). *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of *Coffea arabica* (L.) is greatly enhanced by using established embryogenic callus cultures. *BMC Plant Biology*, 11(1), 92.
- Ribas, A. F., Pereira, L. F. P., & Vieira, L. G. E. (2006). Genetic transformation of coffee. *Brazilian Journal of Plant Physiology*, 18(1), 83-94.
- Royo, S. M., Martínez-García, N., & Martín, M. L. C. (2020). Edición genética por CRISPR-Cas y sus aplicaciones en la mejora de cultivos. *Ambiociencias*, 17(1), 14-31.
- RStudio Team (2020). RStudio: integrated development for R. RStudio, PBC, Boston.
- Sander, J.D., & Joung, J.K. (2014). CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nature biotechnology*, 32(4), 347-355.
- Sangwan, R. S., Ducrocq, C., & Sangwan-Norreel, B. S. (1991). Effect of culture conditions on *Agrobacterium*-mediated transformation in datura. *Plant cell reports*, 10(2), 90-93. doi:10.1007/bf00236464

- Sant'Ana, G. C., Pereira, L. F., Pot, D., Ivamoto, S. T., Domingues, D. S., Ferreira, R. V., ... & Scholz, M. B. (2018). Genome-wide association study reveals candidate genes influencing lipids and diterpenes contents in *Coffea arabica* L. *Scientific reports*, 8(1), 1-12.
- Santoso, T. J., & Sisharmini, A. (2022). Application of CRISPR/Cas9 technology to improve the important traits in coffee. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 974, No. 1, p. 012082). IOP Publishing.
- Sarker, R.H. & Biswas, A. (2002). *In vitro* plantlet regeneration and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Culture*, 12(2), 155-165.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. doi:10.1038/nmeth.2089
- Schrammeijer, B., Dulk-Ras, A. D., Vergunst, A. C., Jurado Jácome, E., & Hooykaas, P. J. (2003). Analysis of Vir protein translocation from *Agrobacterium tumefaciens* using *Saccharomyces cerevisiae* as a model: evidence for transport of a novel effector protein VirE3. *Nucleic Acids Research*, 31(3), 860-868.
- Shi, J., Gao, H., Wang, H., Lafitte, H. R., Archibald, R. L., Yang, M. & Habben, J. E. (2017). ARGOS 8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant biotechnology journal*, 15(2), 207-216.
- Silvarolla, M. B., Mazzafera, P., & Fazuoli, L. C. (2004). A naturally decaffeinated arabica coffee. *Nature*, 429(6994), 826-826.
- Spiral, J. & Petiard, V. (1991) Protoplast culture and regeneration in coffee species. In: *Proceedings of the 14th Colloquium of the International Coffee Science Association (ASIC)*, San Francisco, USA, pp. 383-391.



- Spiral, J., Thierry, C.; Paillard, M. & Petiard, V. (1993). Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformés par *Agrobacterium rhizogenes*. *Comptes Rendus d'Académie des Sciences*, 3 (16), 1-6.
- Stasolla, C., Katahira, R., Thorpe, T.A., & Ashihara, H. (2003). Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology*, 160, 1271–1295.
- Subramanyam, K., Subramanyam, K., Sailaja, K. V., Srinivasulu, M., & Lakshmidēvi, K. (2011). Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of banana cv. Rasthali (AAB) via sonication and vacuum infiltration. *Plant Cell Reports*, 30(3), 425-436.
- Sugiyama, M., Matsuoka, C. & Takagi, T. (1995). Transformation of coffee with *Agrobacterium rhizogenes*. *Proceedings of 16th Colloquium of International Coffee Science Association (ASIC), Kyoto, Japan*, pp. 853-859.
- Sun, Y., Jiao, G., Liu, Z., Zhang, X., Li, J., Guo, X., ... & Xia, L. (2017). Generation of high-amylose rice through CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis of starch branching enzymes. *Frontiers in plant science*, 8, 298.
- Svitashev, S., Schwartz, C., Lenderts, B., Young, J. K., & Cigan, A. M. (2016). Genome editing in maize directed by CRISPR–Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 7(1), 1-7.
- Tang, L., Mao, B., Li, Y., Lv, Q., Zhang, L., Chen, C., ... & Zhao, B. (2017). Knockout of *OsNramp5* using the CRISPR/Cas9 system produces low Cd-accumulating indica rice without compromising yield. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.
- Thomas, J. C., Gultinan, M. J., Bustos, S., Thomas, T., & Nessler, C. (1989). Carrot (*Daucus carota*) hypocotyl transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 8(6), 354-357. doi:10.1016/0168-9452(93)90110-1.
- Toniutti, L., Breitler, J. C., Guittin, C., Doulebeau, S., Etienne, H., Campa, C., ... & Bertrand, B. (2019). An altered circadian clock coupled with a higher photosynthesis efficiency could

- explain the better agronomic performance of a new coffee clone when compared with a standard variety. *International journal of molecular sciences*, 20(3), 736.
- Tzfira, T., Vaidya, M., & Citovsky, V. (2002). Increasing plant susceptibility to *Agrobacterium* infection by overexpression of the *Arabidopsis* nuclear protein VIP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16), 10435-10440.
- Ubieta, T. S., Calero, S. M., Carcache, E. R., Romero, M. L., & Juárez, D. T. (2020). Evaluación de metodologías de extracción de ADN de plantas recalcitrantes. *Revista Torreón Universitario*, 9(24), 45-57.
- Uefuji, H., Ogita, S., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., & Sano, H. (2003). Molecular cloning and functional characterization of three distinct N-methyltransferases involved in the caffeine biosynthetic pathway in coffee plants. *Plant physiology*, 132(1), 372-380.
- Uefuji, H., Tatsumi, Y., Morimoto, M., Kaothien-Nakayama, P., Ogita, S., & Sano, H. (2005). Caffeine production in tobacco plants by simultaneous expression of three coffee N-methyltransferases and its potential as a pest repellent. *Plant molecular biology*, 59(2), 221-227.
- Valderrama, A. M. (2005). Transformación de plantas mediada por *Agrobacterium*: “Ingeniería genética natural aplicada”. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 58(1), 2569-2585.
- Vargas-Guevara, C., Vargas-Segura, C., Villalta-Villalobos, J., Pereira, L. F., & Gatica-Arias, A. (2018). A simple and efficient agroinfiltration method in coffee leaves (*Coffea arabica* L.): assessment of factors affecting transgene expression. *3 Biotech*, 8(11), 471-481. doi:10.1007/s13205-018-1495-5
- Vats, S., Kumawat, S., Kumar, V., Patil, G. B., Joshi, T., Sonah, H., ... & Deshmukh, R. (2019). Genome Editing in Plants: Exploration of Technological Advancements and Challenges. *Cells*, 8(11), 1386-1425.

- Velázquez, L. P. A., Martínez, M. D. C. A., & Romero, A. C. (2014). Extracción y purificación de ADN. *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos, 1*.
- Venial, L. R., Mendonça, M. A. C., Amaral-Silva, P. M., Canal, G. B., Passos, A. B. R. D. J., Ferreira, A., ... & Clarindo, W. R. (2020). Autotetraploid *Coffea canephora* and autoalloctaploid *Coffea arabica* from *in vitro* chromosome set doubling: new germplasms for Coffea. *Frontiers in plant science, 11*, 154.
- Versées, W., Decanniere, K., Pellé, R., Depoorter, J., Brosens, E., Parkin, D. W., & Steyaert, J. (2001). Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *Journal of molecular biology, 307*(5), 1363-1379.
- Versées, W., & Steyaert, J. (2003). Catalysis by nucleoside hydrolases. *Current opinion in structural biology, 13*(6), 731-738.
- Villalta-Villalobos, J., & Gatica-Arias, A. (2019). A look back in time: genetic improvement of coffee through the application of biotechnology. *Agronomía Mesoamericana, 30*(2), 577-599.
- Voß, L., Heinemann, K. J., Herde, M., Medina-Escobar, N., & Witte, C. P. (2022). Enzymes and cellular interplay required for flux of fixed nitrogen to ureides in bean nodules. *Nature communications, 13*(1), 1-13.
- Wang, Y.Q., Xiao, X.G., & Zhang, AM. (2002). Factors affecting Agrobacterium-mediated transformation of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Yi Chuan Xue Bao, 29*(3), 260-265.
- Werner, A. K., Sparkes, I. A., Romeis, T., & Witte, C. P. (2008). Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean. *Plant Physiology, 146*(2), 418.

- Xia, E., Tong, W., Hou, Y., An, Y., Chen, L., Wu, Q., Liu, Y. et al. (2020) The Reference genome of tea plant and resequencing of 81 diverse accessions provide insights into its genome evolution and adaptation. *Mol. Plant*, 13, 1013–1026.
- Xie, K. & Yang, Y. 2013. RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular Plant*, 6(6), 1975–1983.
- Xu, P., Zhang, Y., Kang, L., Roossinck, M. J., and Mysore, K. S. (2006). Computational estimation and experimental verification of off-target silencing during posttranscriptional gene silencing in plants. *Plant Physiology*, 142, 429–440. doi: 10.1104/pp.106.083295
- Yin, Y., Katahira, R., & Ashihara, H. (2014). Metabolism of purine nucleosides and bases in suspension-cultured *Arabidopsis thaliana* cells. *European Chemical Bulletin*, 3(9), 925-934.
- Yuyama, P. M., Júnior, O. R., Ivamoto, S. T., Domingues, D. S., Carazzolle, M. F., Pereira, G. A. G., ... & Pereira, L. F. P. (2016). Transcriptome analysis in *Coffea eugenioides*, an Arabica coffee ancestor, reveals differentially expressed genes in leaves and fruits. *Molecular Genetics and Genomics*, 291(1), 323-336.
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U, & Boldt R (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review of Plant Biology* 57, 805–836.
- Zuo, E., Cai, Y. J., Li, K., Wei, Y., Wang, B. A., Sun, Y., ... & Huo, X. (2017). One-step generation of complete gene knockout mice and monkeys by CRISPR/Cas9-mediated gene editing with multiple sgRNAs. *Cell research*, 27(7), 933-945.