



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Identificación de variedades modificadas
genéticamente en café nacional e importado
mediante la técnica de PCR”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

INGENIERA EN ALIMENTOS

P R E S E N T A:

CLAUDIA ESTEFANÍA HUICOCHEA PÉREZ

ASESORES: DR. JOSÉ FRANCISCO MONTIEL SOSA

M EN C. JOSEFINA MORENO LARA



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUELLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Identificación de variedades modificadas genéticamente en café nacional e importado mediante la técnica de PCR

Que presenta la pasante: Claudia Estefanía Huicochea Pérez
Con número de cuenta: 409087868 para obtener el Título de: Ingeniera en Alimentos

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 21 de Abril de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. José Francisco Montiel Sosa	
VOCAL	Q.F.B. Martha Patricia Zúñiga Cruz	
SECRETARIO	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
1er. SUPLENTE	I.A. Miriam Álvarez Velasco	
2do. SUPLENTE	Dra. María Andrea Trejo Márquez	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

HMI/iac

DEDICATORIA

Doris, por tu apoyo infinito y paciencia interminable.

Rafael, porque el esfuerzo fue tuyo también.

Puky, por ser mi compañero en la vida.

Doralin, por esa sonrisa esperando para contarme tus aventuras cada fin de semana.

A ti Manuel por aparecer en mi vida.

Amigos de la vida, por compartir esta etapa, la mejor de mi vida que sin ustedes no lo hubiera sido. Casita.

AGRADECIMIENTOS.

A mis asesores, Doctor Montiel y Maestra Jose que durante este proyecto fueron pacientes y me permitieron ser parte de su equipo de trabajo depositando su confianza en mi, espero haber hecho un buen trabajo. A todos en el laboratorio 8, mis compañeros.

Doctora Ángeles Cornejo, por su gran ayuda en la obtención de muestras para completar este proyecto.

A la UNAM, mi casa, mi semilla.

Este proyecto se pudo realizar gracias a los proyectos PAPIME con clave PE202513 y PAPIIT con clave IN211413.

ÍNDICE

INDICE II

INDICE DE FIGURAS V

INDICE DE TABLAS VIII

RESUMEN 10

INTRODUCCIÓN 12

CAPÍTULO I: Antecedentes 15

- 1.1 HISTORIA DEL CAFÉ EN MÉXICO Y EN EL MUNDO 16**
 - 1.1.1 Origen del café 16
 - 1.1.2 Llegada del café a América y a México 17
- 1.2 GENERALIDADES DEL CAFETO 18**
 - 1.2.1 Taxonomía del cafeto 18
 - 1.2.2 Morfología del café 19
 - 1.2.3 Especies de café 20
 - 1.2.3.1 Otras especies económicas 22
 - 1.2.4 Variedades 22
 - 1.2.5 Plagas y enfermedades más frecuentes 24
- 1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y APORTE NUTRIMENTAL 27**
 - 1.3.1 Composición media 27
 - 1.3.1.1 Cafeína 28
 - 1.3.1.2 Trigonelina 29
 - 1.3.1.3 Ácidos 29
 - 1.3.1.4 Compuestos volátiles 29
 - 1.3.2 Algunos efectos benéficos a la salud 29
- 1.4 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL CAFÉ 30**
 - 1.4.1 Recolección 31
 - 1.4.2 Procesado por vía seca 31
 - 1.4.3 Procesado por vía húmeda 32
 - 1.4.4 Tostado 33
 - 1.4.5 Molienda 34
- 1.5 PRODUCCIÓN DE CAFÉ 34**
 - 1.5.1 Países productores de café 34
 - 1.5.2 Producción de café en México 35
 - 1.5.3 Consumo de café nacional e importado en México 36
 - 1.5.4 México como exportador de café 37
- 1.1 PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE 37**
 - 1.1.1 Origen 37
 - 1.1.1.1 Mejora vegetal 38
 - 1.1.1.2 Mejora clásica 38
 - 1.1.2 Biotecnología vegetal 38
 - 1.1.2.1 Aplicaciones de la biotecnología vegetal 39
 - 1.1.2.2 Híbridos y transgénicos 40
 - 1.1.2.2.1 Híbridos 40
 - 1.1.2.2.2 Transgénicos (OGM) 40

- 1.1.3 Métodos de transformación 41
 - 1.1.3.1 Biológicos 41
 - 1.1.3.2 Físicos 42
- 1.1.4 Promotores y terminadores 44
 - 1.1.4.1 Evento transgénico de maíz 45
- 1.2 CAFÉ MODIFICADO GENÉTICAMENTE 45**
 - 1.2.1 Causas 45
 - 1.2.2 Modificaciones genéticas hechas en café 46
- 1.3 LEGISLACIÓN 48**
- 1.4 AUTENTIFICACIÓN DE ESPECIES 49**
 - 1.4.1 Identificación de un transgénico 50
 - 1.4.2 PCR 51
 - 1.4.2.1 Análisis del producto de PCR 52
 - 1.4.2.2 RFLP 52

CAPÍTULO II: Metodología experimental 53

- 2.1 CUADRO METODOLÓGICO 54**
- 2.2 OBJETIVOS 55**
- 2.3 MATERIALES Y MÉTODOS 56**
 - 2.3.1 Material biológico 56
 - 2.3.2 Extracción de ADN 58
 - 2.3.3 Cuantificación de la concentración y pureza de ADN 60
 - 2.3.4 PCR 61
 - 2.3.4.1 Programas de PCR 63
 - 2.3.4.1.1 Café 63
 - 2.3.4.1.2 CaMV y T-NOS 64
 - 2.3.4.2 RFLP 65
 - 2.3.4.3 PCR directo 65
 - 2.3.4.3.1 Programa para PCR directo 66
 - 2.3.5 Electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de PCR 67

CAPÍTULO III: Resultados y discusión 69

- 3.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS DE CAFÉ 70**
- 3.2 ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS Y OBTENCIÓN DE CONTROLES POSITIVOS PARA EVENTOS TRANSGÉNICOS 71**
 - 3.2.1 Especificidad de primers de café 71
 - 3.2.2 Control positivo para eventos transgénicos. 72
- 3.3 Diferenciación entre especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora* 74**
 - 3.3.1 Identificación del género *Coffea* 73
 - 3.3.1.1 PCR-RFLP. Control positivo para diferenciación entre especies de *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. 77
 - 3.3.2 PCR directo 78
 - 3.3.2.1 PCR-RFLP. Identificación de posibles híbridos 79
- 3.4 PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES EVENTOS TRANSGÉNICOS 83**

3.4.1	CaMV	83
3.4.2	T-NOS	86

CAPÍTULO IV: Conclusiones 88

RECOMENDACIONES 90

ANEXO 92

BIBLIOGRAFÍA 99

GLOSARIO DE TÉRMINOS 105

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Visir bebiendo café en una taza de porcelana, tradicional en medio oriente. 16
- Figura 2.** Llegada del café a América. 17
- Figura 3.** Planta del cafeto. 18
- Figura 4.** Diferencia entre granos de *C. arabica* (arabica) y *C. canephora* (robusta). 21
- Figura 5.** Efectos de Broca del café en frutos. 26
- Figura 6.** Efectos de la roya de café en la hoja de cafeto. 26
- Figura 7.** Diagrama de proceso de elaboración de café por vía seca y vía húmeda. 30
- Figura 8.** Recolección manual (izq.) y transporte de cerezas de café (der.). 31
- Figura 9.** Secado de la cereza de café por vía seca. 31
- Figura 10.** Granos de café en fermentación. 32
- Figura 11.** Evolución del tostado de café. 33
- Figura 12.** Transformación del grano de café en su procesamiento. 34
- Figura 13.** Áreas de cultivo de café en el mundo, también llamado cinturón del grano. 34
- Figura 14.** Distribución de la producción de café convencional 2011/2012 por estado. 35
- Figura 15.** Las dos técnicas principales de transferir genes a las células vegetales. 43
- Figura 16.** Esquema de representación de la secuencia del gen insertado, que consiste en el promotor (P), un gen estructural (región codificante) y un terminador (T). 45
- Figura 17.** Remojo de los granos de café. 60
- Figura 18.** Obtención de embriones. 60

- Figura 19.** Nanodrop ND-1000 A113. **61**
- Figura 20.** Programa de PCR para *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. **63**
- Figura 21.** Programa de PCR para la identificación de un OGM que contiene CaMV y T-NOS. **65**
- Figura 22.** Patrón de corte de la endonucleasa *Pvu I*, donde “R” representa adenina ó guanina y “Y” una citosina ó timina. **65**
- Figura 23.** Programa de PCR empleado en la PCR directa. **66**
- Figura 24.** Dirección de la migración del ADN en la cámara de electroforesis. **67**
- Figura 25.** Especificidad de los primers de café. **71**
- Figura 26.** Granos del evento transgénico de maíz empleados para la extracción. **72**
- Figura 27.** Especificidad de los primers que identifican un OGM. **73**
- Figura 28.** PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde 1. **73**
- Figura 29.** PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde 2. **74**
- Figura 30.** PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde 3. **74**
- Figura 31.** PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde importado. **75**
- Figura 32.** PCR que identifica el género *Coffea* en hoja de cafeto. **75**
- Figura 33.** Controles positivos para *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. **76**
- Figura 34.** PCR directo que identifica el género *Coffea* en granos de café verde. **77**
- Figura 35.** RFLP en granos de café verde 1. **78**
- Figura 36.** RFLP en granos de café verde 2. **79**
- Figura 37.** RFLP en granos de café verde 3. **79**
- Figura 38.** RFLP en hoja de cafeto. **80**

Figura 39. RFLP de los productos de la PCR directa. **80**

Figura 40. RFLP de muestra híbrida. **81**

Figura 41. PCR que identifica la posible presencia del gen CaMV 35S en granos de café verde 1. **82**

Figura 42. PCR que identifica la posible presencia del gen CaMV 35S en granos de café verde 2. **83**

Figura 43. PCR que identifica la posible presencia del gen CaMV 35S en granos de café verde 3. **83**

Figura 44. PCR que identifica la posible presencia del gen CaMV 35S en la hoja de cafeto. **84**

Figura 45. PCR que identifica la posible presencia del gen nos (T-NOS) en granos de café verde 1. **85**

Figura 46. PCR que identifica la posible presencia del gen nos (T-NOS) en granos de café verde 2. **85**

Figura 47. PCR que identifica la posible presencia del gen nos (T-NOS) en granos de café verde 3. **86**

Figura 48. PCR que identifica la posible presencia del gen nos (T-NOS) en la hoja de cafeto. **86**

ÍNDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Clasificación taxonómica del cafeto. **18**
- Tabla 2.** Descripción de la morfología del cafeto. **19**
- Tabla 3.** Plagas y enfermedades más frecuentes en el cafeto. **25**
- Tabla 4.** Composición media del café verde, tostado y en infusión. **27**
- Tabla 5.** Efectos de la cafeína en el organismo. **28**
- Tabla 6.** Datos básicos del cultivo de café. **36**
- Tabla 7.** Aplicaciones de la biotecnología vegetal. **39**
- Tabla 8.** Modificaciones genéticas realizadas en café y resultados obtenidos. **47**
- Tabla 9.** Muestras de material biológico para especificidad. **56**
- Tabla 10.** Especificaciones de los granos de café verde nacionales empleados en la experimentación. **56**
- Tabla 11.** Especificaciones de los granos de café verde importados empleados en la experimentación. **58**
- Tabla 12.** Especificaciones de la planta de café empleada en la experimentación. **58**
- Tabla13.** Lista de reactivos, material y equipos empleados en la extracción de ADN. **59**
- Tabla14.** Lista de reactivos, material y equipos empleados en la cuantificación de ADN. **60**
- Tabla15.** Lista de reactivos, material y equipos empleados en la PCR. **61**
- Tabla 16.** Pareja de primers empleada para la diferenciación entre especies de café. **62**
- Tabla 17.** Pareja de primers empleados para la identificación de eventos transgénicos. **62**

Tabla 18. Componentes necesarios para la reacción de PCR. **63**

Tabla 19. Ciclos, temperaturas y tiempos del programa de PCR para *C. arabica* y *C. canephora*. **63**

Tabla 20. Ciclos, temperaturas y tiempos del programa de PCR para CaMV y T-NOS. **64**

Tabla 21. Reactivos empleados en la reacción de RFLP. **65**

Tabla 22. Reactivos empleados en la reacción PCR directa. **66**

Tabla 23. Ciclos, temperaturas y tiempos del programa de PCR directo. **66**

Tabla 24. Reactivos, material y equipo para la electroforesis y visualización del gel. **67**

Tabla 25. Cuantificación de Concentración de ADN y relaciones de absorbancia en muestras de café verde en grano y la hoja. **69**

Tabla 26. Cuantificación de concentración de ADN de material biológico para especificidad. **70**

Tabla 27. Cuantificación de Concentración de ADN del evento transgénico de maíz por absorbancia. **72**

RESUMEN

“Yo creo que las buenas combinaciones ya fueron inventadas y que nada podrá superar al café con leche (su inventor debe haber sido un ser excepcional) que es riquísimo y que es la combinación por excelencia.”

Jorge Luis Borges

En el presente trabajo el objetivo principal fue establecer una metodología experimental que nos permita identificar las variedades modificadas genéticamente en granos de café verde nacional e importado, empleando la reacción en cadena de la polimerasa. Realizando una investigación teórica de las generalidades del cafeto en sus especies comerciales *Coffea arabica* y *Coffea canephora* y del empleo de la biotecnología vegetal hoy en día y con el fin de mejorar este cultivo que para muchos países de Asia, América Latina y África representa una importante fuente de ingresos, debido a la percepción que se tiene hoy en día de los OGMs es polémica, es necesario enfatizar la clara distinción entre lo que en biotecnología vegetal se refiere a un híbrido y a un transgénico, considerando ambas como modificaciones genéticas. Se incluye una parte experimental con su respectiva metodología, fundamentos de los distintos métodos experimentales empleados como extracción de ADN con solventes orgánicos, PCR, PCR-RFLP así como el análisis de los productos de PCR con electroforesis en gel de agarosa, los equipos, reactivos y condiciones de trabajo empleadas.

Logrando demostrar como resultado que la técnica de PCR-RFLP fue útil para la identificación de organismos híbridos entre las especies *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Y que a pesar de que la técnica de PCR si es funcional para la identificación de transgénicos identificando secuencias promotoras y terminadoras en el ADN de un evento transgénico, para el café en este caso resultaron ausentes, con lo cual se puede concluir que el café transgénico es realizado a nivel experimental en invernadero y este aún no está aprobado para su propagación y comercialización.

INTRODUCCIÓN

“Frente a una taza de café se piensa, pero también se discute, se recuerda o se argumenta. frente a la taza de café se columbra, se reflexiona, se sueña, se imagina, se escribe, se conversa, se enamora, se seduce, se rompe, se reconcilia, se halaga, se sugiere, se invita... Y el café, el misterioso café escucha, profetiza, atestigua, aconseja, da fe...”

Gustavo Máñez Tenorio.

El café es uno de los cultivos de mayor importancia económica en el mundo. Aproximadamente 2.25 millones de tazas de café se consumen diariamente. En los últimos años para muchos países en desarrollo este cultivo ha sido la segunda fuente de divisas más importante sólo después del petróleo. A nivel mundial, se estima que 15 mil millones de plantas están cultivadas en 100 000 km² de tierra. El café es miembro de las *Rubiaceas*, la cuarta familia más grande de las angiospermas. Las variedades más importantes comercialmente provienen de dos especies: *Coffea arabica* (arábica) y *Coffea canephora* (Robusta). Se considera que *C. arabica* tiene la mejor calidad y aroma, pero esta especie es altamente susceptible a muchos patógenos, incluyendo el hongo *Fusarium oxysporum*, nematodos, la roya del café y barrenadores del tallo de café. *C. canephora* es resistente a la mayoría de estas plagas, pero la calidad de los granos es pobre. Una necesidad importante es mejorar la resistencia de *C. arabica* a las plagas, que causan severos daños y mortalidad sustancial a los cafetos en África, Asia y América Latina (Samson *et al.*, 2007).

Los esfuerzos en el mejoramiento convencional han sido capaces de cumplir la mayoría de las necesidades agrícolas para la producción de café, con un éxito notable en la selección y producción de cultivares resistentes a la oxidación a causa de los cambios en el periodo de maduración o bien en cuanto a la arquitectura de las plantas. Sin embargo, la introducción de un nuevo rasgo en una variedad de café, utilizando técnicas tradicionales de mejoramiento, es un proceso largo que pudiera tardar de 20 a 35 años antes del lanzamiento de un nuevo cultivar. El período para el desarrollo del fruto y el tiempo de generación de la cereza es bastante largo. Un ciclo de cultivo de plantas de café tarda cuatro años, desde las semillas de una planta a la floración y de nuevo a la generación de las semillas. Todos estos inconvenientes hacen tales enfoques tradicionales costosos y consumen mucho tiempo (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006 ; Ferreira *et al.*, 2006).

Las últimas décadas han sido testigo del desarrollo de nuevas herramientas tecnológicas que introducen un enorme potencial en la mejora del crecimiento vegetal. Además de la mejora del crecimiento convencional, estas técnicas pueden acelerar la liberación de variedades con características nuevas. La biotecnología vegetal ofrece varias posibilidades para aumentar la productividad, la diversificación y la producción. Esta tecnología incluye técnicas de cultivo de tejido tisular de plantas, técnicas avanzadas de biología molecular para la transformación de

plantas así como el análisis genómico junto con diagnósticos de reproducción y de enfermedades de plantas (De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

El uso de la ingeniería genética para introducir nuevos rasgos en los genotipos de café puede reducir el tiempo necesario para la obtención de nuevos cultivares con rasgos deseables, tales como resistencia a enfermedades y mejoramiento en la calidad. Por otra parte, la transformación en plantas abre paso a la oportunidad de introducir rasgos de diferentes especies, añadiendo características que serían difíciles o incluso imposibles de adquirir con el uso de las técnicas convencionales de cultivo, tales como la resistencia a insectos, resistencia a herbicidas, calidad de taza y de la tolerancia al estrés abiótico como la sequías o heladas. El objetivo sigue siendo el mismo que para los cultivos tradicionales: mejorar los rasgos de una manera que las plantas resultantes puedan alcanzar rasgos agronómicos superiores, pero en una forma más rápida y eficiente (Ferreira *et al.*, 2006 ; De Los Santos-Briones & Hernández-Sotomayor, 2006).

El uso potencial de la transformación genética del café, sus perspectivas, beneficios y riesgos potenciales, están dirigidos así como considerados, hacia el mercado y la aceptación del consumidor hacia los productos de café genéticamente modificados (Ferreira *et al.*, 2006).

Debido a la percepción pública de los organismos genéticamente modificados (OGMs) como polémico, la legislación requiere la trazabilidad y detección de OGMs en algunos países. En más de 15 países, el etiquetado obligatorio es necesario para productos que contienen OGMs o productos derivados por encima de un determinado umbral. La lista de los organismos modificados genéticamente difiere de país a país (aprobación asincrónica) y es necesario controlar la presencia de los OGMs no aprobados. Varios lanzamientos recientes no intencionales de OGMs no autorizados indican claramente la necesidad de un método de detección de éstos en el ambiente. En la Unión Europea (UE), la legislación impone estrictamente un nivel de tolerancia cero para los OGMs que no han sido autorizados. Este problema no se limita a la UE ya que la aparición de los OGMs autorizados en otras partes de los suministros de alimentos se puede esperar debido al comercio mundial (Cankar *et al.*, 2008).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

“Lo más interesante en la historia del café es que en todas partes donde fue introducido públicamente, engendró libertades y revoluciones: Es quizá la bebida más radical, cuya función parece haber sido la de incitar al pueblo a pensar. Y cuando el pueblo empieza a pensar, este ejercicio es peligroso para los tiranos y los enemigos de la libertad”

W.H. Uckrs

1.1 HISTORIA DEL CAFÉ EN MÉXICO Y EN EL MUNDO

1.1.1 Origen del café

La palabra "café" se deriva probablemente del antiguo Reino de Kaffa (hoy parte de Etiopía) una región montañosa, que alcanza alturas hasta de 3500 metros, de clima suave y vegetación tropical exuberante. Allí nació la planta del café (*Coffea arabica*), en forma silvestre. Sus habitantes usaron el grano desde tiempos inmemorables (Wagner, 2001; Souza, 2008).

Antiguos manuscritos mencionan que el inicio de la cultura del café data del año 575 d.C. en Yemen, pero fue hasta el siglo XVI que en Persia, los primeros granos de café se tostaron para convertirse en la bebida como la conocemos hoy (**Figura 1**). Para proteger el nuevo y lucrativo producto y prevenir su cultivo en otros países, en Arabia se prohibió la exportación del grano, a menos que fuera tostado o pasado por agua hirviendo para destruir su potencial germinativo. El café ha tenido varios usos, primero como alimento, luego como vino, después como medicina y finalmente, como bebida. Alrededor del año 800, los miembros de la tribu Óromo, en Absinia (Etiopía), preparaban una vianda con la cereza madura. Trituraban el grano seco, lo moldeaban como bola y lo mezclaban con grasa o mantequilla salada. Todavía a principios del siglo XX los Galla, una tribu nómada africana, usaban a diario una ración de café del tamaño de una bola de billar para soportar sus largas jornadas (Wagner, 2001; Mussatto *et al.*, 2011).

La bebida surgió primero del fermento que despiden la cáscara y la pulpa de la cereza madura, con el cual se elaboró una especie de vino aromático. Luego, mediante cocción de los granos secos en agua, se usó como medicina. Hacia el año 1200 se inició la práctica de hacer una bebida de la cáscara con agua hirviendo. Más adelante se tostó la cáscara y, alrededor del 1300, nació la costumbre de descascarar, tostar y triturar los granos en mortero, echar el polvo en agua hirviendo y beber la mezcla resultante. La



Figura 1. Visir bebiendo café en una taza de porcelana, tradicional en medio oriente (Wagner, 2001).

propagación del café en el mundo oriental se produjo entre los siglos XIII y XVI. Comerciantes venecianos lo llevaron de Constantinopla a Italia en el siglo XVII. Posteriormente, la bebida se conoció en Holanda, Inglaterra, Francia, Alemania y Austria (Wagner, 2001).

1.1.2 Llegada del café a América y a México

En cuanto al nuevo mundo, el café llegó primero a Norteamérica, en donde se difundió durante la revolución norteamericana a raíz del boicot al té (**Figura 2**). Exploradores holandeses llevaron la planta a Surinam, en América del sur, y los franceses a sus dominios antillanos, de donde se propagó a la colonia francesa de Cayenne, Venezuela, Brasil, el Caribe español, México y Centroamérica (Wagner, 2001).

A México se introdujo en 1795, por el español Don Juan Antonio Gómez de Guevara, a través de semillas obtenidas en La Habana, Cuba, que posteriormente fueron propagadas y plantadas en “La Hacienda de Guadalupe”, 10 km al suroeste de Córdoba, Veracruz (Prado, 1993).

Hoy en día, el café se cultiva en decenas de países tropicales, dando soporte a economías regionales o nacionales (Souza, 2008).



Figura 2. Llegada del café a América (EL BABLE, 2013).

1.2 GENERALIDADES DEL CAFETO

"Café" es como se designa a la bebida preparada por extracción, en agua hirviendo, del material soluble de las semillas obtenidas del cafeto (Mussatto *et al.*, 2011).

1.2.1 Taxonomía del cafeto

El café pertenece al género *Coffea* con aproximadamente 100 especies (**Tabla 1**). No obstante, únicamente tres de estas se mencionan como cultivadas comercialmente, destacándose las dos primeras según el orden siguiente: *Coffea arabica*, *Coffea canephora* y *Coffea liberica* (Alvarado & Rojas, 2007).

Tabla 1. Clasificación taxonómica del cafeto (Alvarado & Rojas,2007).

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

El cafeto pertenece a la familia de las rubiáceas (**Figura 3**). Ésta familia tiene características fáciles de reconocer: las hojas salen en pares, no tienen divisiones y los bordes son lisos, en las flores están los órganos de los dos sexos, son flores hermafroditas, generalmente cada fruto tiene dos semillas (Ramírez, 2011).



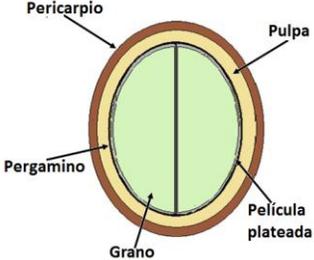
Figura 3. Planta del cafeto (Souza, 2008).

1.2.2 Morfología del café

Tabla 2. Descripción de la morfología del cafeto (Colín, 1990; Ramírez, 2011).

Parte de la planta	Descripción
<p>Tallo</p> 	<p>Leñoso, erecto, de longitud variable en función al clima y al suelo; en las variedades comerciales varía de 2 a 5 m de altura. Su función es repartir las ramas y las hojas, para que todas reciban luz y aire, y la de conducir la savia. Este junto con las ramas primarias forman el esqueleto del cafeto.</p>
<p>Ramas</p> 	<p>El tallo da origen a dos tipos de ramificaciones: la primera que forma un ángulo abierto, que tiene un crecimiento horizontal y que en ella se manifiesta la producción, se le conoce como ramificación plagiotrópica. El segundo tipo de ramificación da origen a los tallos ortotrópicos y surgen del tallo principal cuando éste ha sido recortado o dañado por plagas o enfermedades.</p>
<p>Hojas</p> 	<p>Son opuestas y alternas en el tallo ortotrópico de los cafetos jóvenes y en las ramas plagiotrópicas simplemente opuestas. Son de color verde oscuro y brillante en la superficie superior y verde claro mate en el interior. Presentan una forma oval y terminan en punta, sus bordes son ondulados. Son órganos fundamentales porque en ella se realizan los procesos fotosintéticos, transpiración y respiración.</p>
<p>Flores</p> 	<p>Se les encuentra formando grupos en las axilas de las hojas de las ramas. La corola es blanca y formada por cinco pétalos fusionados en su base, dando origen al tubo de la corola; el cual se encuentra inserto en la parte superior del ovario. El ovario, normalmente con dos lóculos, contiene un óvulo por lóculo. Presentan cinco estambres con anteras lineales que se abren longitudinalmente. El estilo es largo, de color blanco y bifurcado en el estigma. La primera floración se da hasta el tercero o cuarto año.</p>

Tabla 2. Descripción de la morfología del cafeto (Continuación).

<p>Fruto</p> 	<p>Después de la fecundación el ovario se transforma en fruto y sus dos óvulos en semillas. El fruto es una drupa de superficie lisa y brillante y de pulpa delgada fácilmente desprendible del pergamino. Cuando madura es rojo o amarillo.</p>
<p>Semillas</p> 	<p>Presentan un endocarpio o pergamino fibroso. Son oblongas, plano-convexas cubiertas de una película plateada o perisperma que corresponde a vestigios del tegumento del óvulo. El endospermo es córneo constituido de hemicelulosa, proteínas, cafeína, aceite, azúcares, dextrina, celulosa, ácido clorigénico y otros compuestos minerales. El embrión es pequeño de 1 a 2 mm, localizado en la base del endospermo.</p>

1.2.3 Especies de café

Las especies de café pertenecen a la familia de las *Rubiaceae*, una de las familias de angiospermas tropicales más grandes. Para el género *Coffea* todas las especies son arbustos leñosos perennes o árboles en los bosques intertropicales. Aproximadamente 100 especies de café han sido identificadas hasta el momento y nuevos taxones aún se están descubriendo. Los cafetos más ampliamente cultivados se colocan en cuatro especies, en orden de importancia comercial (Kole, 2007):

Coffea arabica Linn: Antoine de Jussieu consideró en 1713 al cafeto árabe como un jazmín llamándolo *Jasminum arabicum laurifolia*. Fue hasta 1753, después de que Linneo estableció el género *Coffea* dentro de su clasificación, que la especie llegó a ser conocida como *Coffea arabica*. Es un arbusto pequeño o árbol con hojas lustrosas desprovisto de vellosidades. Hojas relativamente pequeñas, que varían en anchura, de 12 a 15 cm de largo y alrededor de 6 cm de ancho como promedio, ovales o elípticas y siempre verdes. Flores fragantes, blancas o cremosas, varias en cada axila 2-9 o más. La cereza de forma oblonga elipsoidal aproximadamente de 1.5 cm de longitud, primero verde, después roja y finalmente negra azulosa. La semilla varía en tamaño de 8.5 a 12.7 mm (Haarer, 1982).

Coffea canephora Pierre ex Froehner (Robusta): Árbol o arbusto sin vellosidades, con hojas anchas que presentan a menudo una apariencia ondulada o corrugada, oblongo elípticas, poco acuminadas, redondeadas en la base, de 15 a 30 cm de largo y de 5 a 15 cm de ancho. Flores blancas a veces ligeramente rosadas y en dos racimos axilares. Cerezas marcadamente elipsoidales de 8 a 16 mm, estriadas cuando están secas. La planta es muy variable en su estado silvestre (Haarer, 1982).



Figura 4. Diferencia física entre granos de *C. arabica* (arabica) y *C. canephora* (robusta). (nescafe.com, 2013)

Coffea liberica Bull ex Hiern: Árbol o arbusto sin vellosidades, hojas más bien grandes, brillantes, elípticas trasovadas, poco acuminadas, algo onduladas, alrededor de 20 cm de largo por 10 cm de ancho. Flores blancas, de 7 a 6 partes, subsésiles, varias agrupadas en ramillete, axilares, de alrededor de 3.5 cm de largo. Cerezas ovales de aproximadamente 2.5 cm de largo, al principio rojas, volviéndose negras cuando maduran, arrugadas al secarse. Semillas de 1.27 cm o más (Haarer, 1982).

Coffea excelsa: Árbol de grandes hojas, de 6 a 15 m de altura y algunas veces hasta 20 m; corteza grisácea con fisuras longitudinales. Las hojas varían en forma, pero son más o menos trasovadas lanceoladas, de 18 a 28 cm de largo y de 9 a 12 cm de ancho. Flores pequeñas, blancas rosadas, fragantes, arregladas en grupos de 1 a 5 racimos en cada nudo y en cada racimo de 2 a 4 flores que persisten largo tiempo después de marchitarse. Cerezas ovoides y un poco comprimidas de 17 a 18 mm de ancho (Haarer, 1982).

Aunque los cafés “árabes” y “robusta” proveen la mayor parte del comercio mundial de este producto (**Figura 4**), el “liberiano” y el “excelsa” han sido llevados a muchos países en los trópicos, donde se cultivan en jardines botánicos o en pequeñas áreas. Estos dos cafés de menor importancia económica se han usado también para hibridaciones e injertos. El café liberiano tiene frutos y granos muy grandes; los árboles crecen vigorosamente en las regiones más calientes y húmedas de los trópicos, en las cuales el café árabe no prosperaría bien y sufriría probablemente toda clase de enfermedades y plagas. El *Coffea excelsa* es un árbol grande y fuerte que, en forma exclusiva entre todos los cafés económicos, se adapta a los países calientes y semiáridos del interior de África Occidental. Estos atributos pueden ser valiosos con vistas al futuro, puesto que el café excelsa necesita poco cuidado una vez que ha alcanzado el tamaño de un árbol regular (Haarer, 1982).

1.2.3.1 Otras especies económicas

Además de las especies ya mencionadas existen un número de otras con cierta importancia económica. Son raramente cultivadas excepto en los poblados de los lugares donde crecen silvestres puesto que las cerezas son recolectadas comunmente en el monte. Por mencionar algunas son (Haarer, 1982):

-Café Senegal: nombre para el producto de *Coffea stenophylla* G.

-Café Ibo: nombre del producto de *Coffea ibo* Froehner.

-Café Chirinda: nombre del producto de *Coffea Lungustroides* S. Moore.

1.2.4 Variedades

La producción de café en la mayoría de los países que lo cultivan se sustenta en el cultivo de la especie *C. arabica*, la cual está representada, a nivel mundial, por un gran número de variedades comerciales; en nuestro país se tienen las siguientes: Typica, Bourbon, Caturra, Mondo Novo, Pluma Hidalgo, Maragogipe, Garnica, Catuaí y Catimor (Prado, 1993).

Descripción de las variedades más sobresalientes de *Coffea arabica*.

- **Typica:** a esta variedad se le conoce también con los nombres de criollo o café arábico; fue el primero en introducirse al continente americano. Se la ha tomado como punto de referencia cuando se describen otras variedades pues se le considera la variedad patrón o tipo. Los cafetos de esta variedad pueden alcanzar hasta 4 m de altura, su ramificación no es abundante y sus hojas nuevas son de color bronceado. La variedad Typica puede exhibir frutos de color rojo o amarillo cuando están maduros, sin embargo, su producción es muy baja (2.8 a 4.6 kg de cereza por planta), se localiza principalmente en cafetales viejos y la tendencia es que disminuya su cultivo (Prado, 1993 ; Colín, 1990).
- **Bourbon:** Esta variedad manifiesta en las hojas nuevas unas coloraciones verde claro a diferencia de la variedad Typica que son bronceadas; adicionalmente los arbustos tienen una forma más cilíndrica, sus ramas primarias más nuevas forman con el tallo un ángulo de inserción más cerrado y su ramificación es más profusa. Sin embargo, la variedad Typica posee frutos y semillas de un tamaño ligeramente mayor (Colín, 1990).
- **Caturra:** Es una variedad originada en Minas Gerais Brasil, se le considera una mutación de la variedad Bourbon y se caracteriza por su tamaño reducido, de forma redondeada y entrenudos cortos, tanto del tallo como de las ramas. Su capacidad de producción aceptable y su porte pequeño favorecen altos rendimientos por unidad de superficie bajo un manejo intensivo. Las hojas de la variedad Caturra son más anchas y de coloración más oscura que la variedad Bourbon, pero sus frutos y semillas son similares. Se conocen selecciones con frutos maduros de color rojo y amarillo (Colín, 1990).
- **Mundo Novo:** Variedad originada en Brasil, probablemente por el cruzamiento natural entre una selección de la variedad Typica denominada "Sumatra" y la variedad Bourbon. Aparentemente las selecciones Mundo Novo actuales

constituyen generaciones avanzadas de aquel híbrido; pues las primeras progenies estaban formadas por plantas heterogéneas en cuanto a vigor, producción y porcentaje de frutos vanos. A través de la selección aplicada por los fitomejoradores se logró eliminar los defectos de la variedad. Las principales características de esta variedad son gran rusticidad, vigor y alta producción (Colín, 1990).

Con frecuencia los productores plantan más de una variedad en sus parcelas. Poco difundidas están las variedades como Garnica, Catuaí y Catimor, esta última presenta resistencia a ciertas razas de roya. El comportamiento de las variedades es similar en todo el país, aunque, existen ciertas tendencias a nivel regional y estatal (Prado, 1993).

Para *Coffea canephora* Pierre ex Froehner se han descrito siete variedades. Estas son: kouilouensis, hiernii, hinaultii, muniensis, oligoneura, trillesii y wildemannii. Pero todas las variedades de *Coffea canephora* se identifican bajo el nombre común de “robusta” (Haarer, 1982; Belitz, 2009).

1.2.5 Plagas y enfermedades más frecuentes

Los agroecosistemas cafetaleros están influenciados por diversos factores bióticos y abióticos que son los encargados de regular la fauna entomológica. En el interior de ella, se desarrolla una amplia gama de organismos poiquiloterms que incluyen los insectos polinizadores, fitófagos (dañinos) y benéficos (predadores y parasitoides). En base al conocimiento actual que se tiene sobre las plagas del cafeto (**Tabla 3**) y sobre los factores naturales que regulan el crecimiento de las poblaciones, se recomienda el manejo integrado de plagas (MIP). A través de este sistema se pretende racionalizar el uso de insecticidas y hacer más rentable la producción de café. El MIP tiene como finalidad mantener la plaga a niveles que no causen daños económicos. Para lograr esto se utilizan varias técnicas, siendo las más utilizadas el control cultural, biológico y químico (Herrera, 1993).

Tabla 3. Plagas y enfermedades más frecuentes en el cafeto (Rogg, 2001).

Plagas
<p>1.- Plagas del suelo</p> <ul style="list-style-type: none"> Homoptera: <ul style="list-style-type: none"> <i>Dysmicoccus cryptus</i> (Pseudococcidae): Cochinilla de las raíces.
<p>2.-Plagas de la parte vegetativa:</p> <p>a. Defoliadores</p> <p><u>Defoliadores lepidópteros:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Lepidóptera <ul style="list-style-type: none"> <i>Eacles imperialis magnifica</i> (Saturniidae) <i>Oiketicus kirbyi</i> (Psychidae) <i>Automeris sp.</i> (Saturniidae) Hymenoptera: <ul style="list-style-type: none"> <i>Atta cephalotes</i> (Formicidae) <p>b. Chupadores</p> <p><u>Cochinillas y escamas del cafeto:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> Homoptera: <ul style="list-style-type: none"> <i>Coccus viridis</i> (Coccidae): Escama verde de cítricos. <i>Saissetia coffeae</i> (Coccidae): Escama parda. <i>Plamococcus citrii</i> (Pseudococcidae): Cochinilla blanca de cítricos. <i>Pinnaspis aspidistrae</i> (Diaspididae): Cochinilla harinosa de cítricos. <i>Selenaspidus articulatus</i> (Diaspididae): Escama negra. <p>Todas estas cochinillas, pulgones y escamas chupan la sabia, debilitando la planta, perjudicando el rendimiento directo o indirectamente. Sin embargo, tienen muchos predadores y parasitoides, con la excepción de la cochinilla de las raíces.</p> <p>c. Barrenadores</p> <ul style="list-style-type: none"> Coleóptera: <ul style="list-style-type: none"> <i>Hypothenemus hampei</i> (Scolytidae): Broca del café <i>Hypothenemus obscurus</i> (Scolytidae): Falsa broca del café <i>Xylosandrus morigerus</i> (Scolytidae): Taladrador de ramas <i>Cnesius sp.</i> (Scolytidae): Perforador de ramas del cafeto Lepidóptera: <ul style="list-style-type: none"> <i>Perileucoptera coffeella</i> (Lyonetiidae): Minador de la hoja Diptera: <ul style="list-style-type: none"> <i>Ceratitis capitata</i> (Tephritidae): Las larvas barren los frutos. <p>d. Plagas almacenadas</p> <ul style="list-style-type: none"> Coleóptera: <ul style="list-style-type: none"> <i>Araecerus fasciculatus</i> (Anthribidae)
<p>3.- Vectores de enfermedades</p> <p>Todas las cochinillas y escamas pueden funcionar como plagas vectores.</p>
<p>4.- Nemátodos</p> <ul style="list-style-type: none"> <i>Pratylenchus coffeae</i> <i>Helicotylenchus sp.</i> <i>Meloidogyne sp.</i> <i>Radopholus similis</i> <i>Xiphinema sp.</i>
Enfermedades
<ul style="list-style-type: none"> Roya: <i>Hemileia vastatrix</i> Pudrición o mancha de hierro: <i>Cercospora coffeicola</i> Antracnosis de cerezas: <i>Glomerella cingulata</i> Mal de hilachas: <i>Corticium (=Pellicularia) koleroga</i> Ojo de gallo del cafeto: <i>Mycaena citricolor (=Omphalia flavida)</i> Forma imperfecta: <i>Stilbum flavidum</i>

La broca del café (*Hypothenemus hampei*), es la plaga más importante en plantaciones comerciales de café en prácticamente todos los países productores del mundo (**Figura 5**). Todas las variedades y especies comerciales de café son atacadas por este insecto (Silverio, 2013).



Figura 5. Efectos de la broca del café en frutos (Silverio, 2013).

Uno de los problemas fitosanitarios más comunes en los países productores de café es la roya, la cual es ocasionada por el hongo *Hemileia vastatrix*. Este hongo ataca a las hojas de los cafetos de todas las variedades comerciales pertenecientes a *Coffea arabica* L. (**Figura 6**). Existen numerosas razas del hongo que ocasiona la enfermedad, pero la predominante es la raza 2. Cuando se registran altas infestaciones provoca defoliaciones severas que pueden reducir el rendimiento si se presentan en fases tempranas de formación o maduración de los frutos (Silverio, 2013).



Figura 6. Efectos de la roya de café en la hoja de cafeto (Silverio, 2013).

1.3 COMPOSICIÓN QUÍMICA Y APORTE NUTRIMENTAL

La composición química del café está condicionada por la variedad, la altitud de la plantación, los factores edafológicos, climáticos y agronómicos, así como por el proceso tecnológico, especialmente el tostado (Hernández, 2010).

1.3.1 Composición media

Tabla 4. Composición media del café verde, tostado y en infusión (Hernández, 2010).

Componente	<i>Coffea arabica</i>		<i>Coffea canephora</i>		Infusión*
	Verde	Tostado	Verde	Tostado	
Cafeína	1.2	1.3	2.2	2.4	4.8
Trigonelina	1.0	1.0	0.7	0.7	1.6
Proteínas	9,8	7.5	9.5	7.5	6.0
Sacarosa	8.0	0.0	4.0	0.0	0.8
Otros azúcares	1.0	-	2.0	-	0.4
Polisacáridos	49.8	38.0	54.4	42.0	24.0
Ácidos	1.5	2.4	1.6	2.6	3.0
Ácido clorogénico y sus derivados	6.5	2.5	10.0	3.8	-
Lípidos	16.2	17.0	10.0	3.8	-
Minerales	4.2	4.5	4.4	4.7	14.0
Componente aromático	Trazas	0.1	Trazas	0.1	-

* *Coffea arabica*, tueste normal, preparado en 50g/L
 Cantidades expresadas en porcentaje de materia seca.

En el café verde, gran parte de las proteínas se encuentran como enzimas, libres en el citoplasma o unidas a los polisacáridos de las paredes celulares. Su contenido puede oscilar entre 8-15%, referido a materia seca. Los principales aminoácidos son arginina, ácido aspártico, histidina y cisteína; en el café tostado las proteínas son sujeto de diversos cambios cuando son calentadas en presencia de carbohidratos, dando lugar a la reacción de Maillard con formación de tiofenoles, tiazoles, alquilpirazinas, pirroles, etc., que ejercen gran influencia en las propiedades sensoriales. En el café pueden encontrarse polisacáridos y azúcares simples. La mayor parte de los hidratos de carbono presentes, son insolubles. Durante el tostado una proporción de los polisacáridos son degradados en fragmentos que son solubles. La sacarosa presente en el café verde se descompone en el café tostado y los monosacáridos también apenas se producen. La fracción de lípidos es muy estable y sobrevive a los procesos de tostado con cambios mínimos. El contenido de minerales es

mayor en *C. canephora* que en *C. arabica*, así como en los cafés procesados por vía seca. Como en todas las plantas, el potasio es predominante en las cenizas del café (1.1%), seguido por el calcio (0.2%) y magnesio (0.2%) (Belitz, 2009 ; Hernández, 2010).

1.3.1.1 Cafeína

La cafeína, que es la 1,3,7-trimetilxantina, es la base xántica responsable de las principales acciones fisiológicas causadas por el café. Causando estimulación en el sistema nervioso central, incrementa la circulación de la sangre y la respiración (**Tabla 5**). Siendo también la responsable en parte, del sabor amargo. Su contenido en café verde está condicionado por la especie, siendo mayor en *C. canephora* que en *C. arabica*. De todas las sustancias presentes en la composición química del café, sólo la cafeína es termoestable, es decir que no es destruída por el tostado (Belitz, 2009; Hernández, 2010 ; Mussatto *et al.*, 2011).

Tabla 5. Efectos de la cafeína en el organismo (Hernández, 2010)

Sitio de efecto	Efecto
Sistema nervioso central	En dosis moderadas: Provoca estimulación, inhibe el sueño, disminuye la sensación de fatiga, favorece la concentración aumentando el rendimiento intelectual etc. En dosis elevadas: Puede inducir nerviosismo, ansiedad, insomnio, temblor y palpitaciones.
Sistema cardiovascular	La cafeína es un estimulante cardiaco, produciendo un aumento de la fuerza de contracción muscular y del gasto cardiaco, mientras que en la circulación sanguínea cerebral se da una disminución del caudal, que se asocia a un descenso en la presión, que justifica el alivio del dolor de las cefales. En dosis elevadas puede producir taquicardia.
Sistema gastrointestinal	Incremento de la secreción gástrica y también es cierto que en dosis elevadas puede llegar a irritar la mucosa gástrica.
Sistema respiratorio	La cafeína ejerce una suave relajación en los bronquios, desde hace más de 100 años se conoce el efecto positivo del café sobre procesos asmáticos.
Sistema excretor	Fundamentalmente en el riñón, tiene una acción diurética.

Tabla 5. Efectos de la cafeína en el organismo (Continuación)

Musculatura esquelética	Aumenta la capacidad funcional muscular disminuyendo la fatiga, mejorando el rendimiento físico. La cafeína se considera como agente dopante cuando la concentración en orina supera los 12 µg/ml.
-------------------------	--

1.3.1.2 Trigonelina

Es una piridina que también aporta parte del sabor amargo. Está presente en el café verde y cerca del 50% se degrada en el tostado en ácido nicotínico y otras sustancias de naturaleza pirrólica y piridínica que tienen notable influencia sobre el aroma. El café tostado tiene entre 10 y 40 mg de ácido nicotínico por 100g de café lo que significa que en una taza podría haber de 2-3 mg (Belitz, 2009; Hernández, 2010).

1.3.1.3 Ácidos

Destaca la presencia del ácido clorogénico y sus derivados. Una taza de *C. arabica* contiene entre 70 y 200mg de ácido clorogénico y en una taza de *C. canephora* entre 70 y 300 mg. Además de su demostrada actividad antioxidante, estos ácidos son responsables del sabor amargo y astringente. En el café también se encuentran otros ácidos, como el fórmico, acético, succínico, tartárico, málico, oxálico, cítrico y fosfórico; los cuales presentan una notable influencia sobre su calidad sensorial (Hernández, 2010).

1.3.1.4 Compuestos volátiles

En el café verde aparecen alcanos y alquenos, piridinas, quinolinas, pirroles, etc. en el café tostado las fracciones volátiles tienen una composición compleja, de los 850 componentes volátiles identificados hasta ahora, sólo 40 contribuyen al aroma característico (Hernández, 2010).

1.3.2 Algunos efectos benéficos en la salud.

El consumo de café per cápita ha aumentado, impulsada por su propiedad de aumentar el estado de alerta de los que beben y el agradable ambiente que fomenta cuando se bebe socialmente. Existen muchos informes sobre sus beneficios para la salud cuando se consume con moderación (Souza, 2008).

Estudios recientes atribuyen al café una amplia serie de acciones, entre las que destacan las siguientes (Hernández, 2010):

- Actividad antioxidante.
- Disminución del riesgo de sufrir diabetes mellitus tipo 2.
- Prevención de enfermedades de Parkinson y de Alzheimer.
- Reducción de la formación de cálculos biliares.
- Acción antimicrobiana.

1.4 PROCESO DE ELABORACIÓN DEL CAFÉ

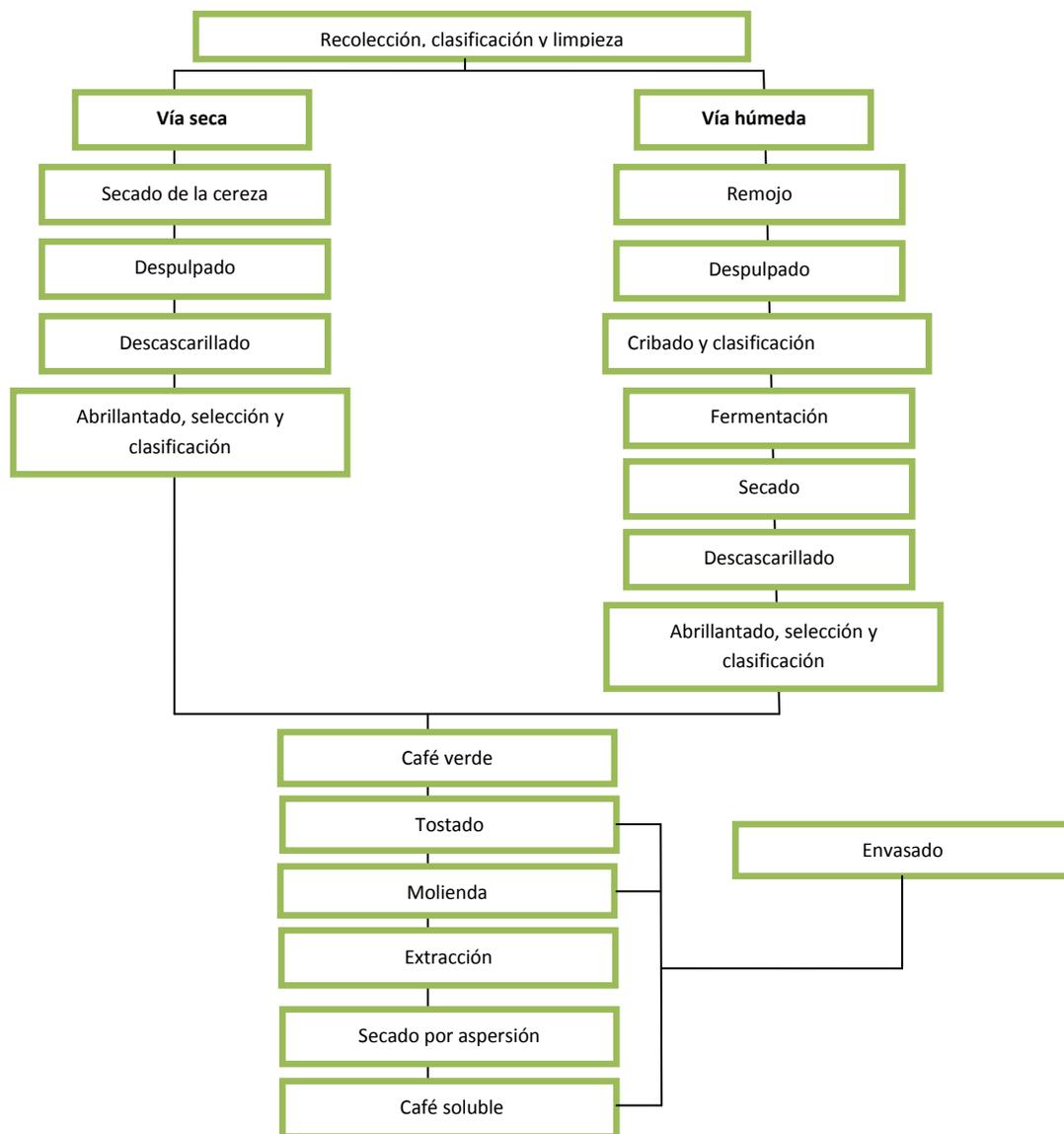


Figura 7. Diagrama de proceso de elaboración de café por vía seca y vía húmeda (Hernández, 2010).

1.4.1 Recolección

Esta se realiza mediante recolección manual de cada cereza una vez madura (**Figura 8**), o bien tirando las cerezas de las ramas y posteriormente recogiendo las cerezas tiradas debajo del árbol, para posteriormente comenzar el procesamiento con la eliminación de la pulpa con uno de los dos siguientes procesos (Belitz, 2009).



Figura 8. Recolección manual (izq.) y transporte de cerezas de café (der.) (Eduardo Taylor Coffee, 2013).

1.4.2 Procesado por vía seca

El procesado por vía seca, comúnmente usado para robusta, es tecnológicamente más simple comparado con el procesamiento húmedo, que es más comúnmente empleado en granos de café arábica. Este es el método más antiguo y mas empleado en Brasil y África occidental, aporta cafés que se consideran, en general, de peor calidad que los obtenidos por vía húmeda. Ya que si el proceso de secado no se desarrolla adecuadamente, el café puede enmohecerse y enranciarse con



Figura 9. Secado de la cereza de café por vía seca (Eduardo Taylor Coffee, 2013).

facilidad. Este método consiste en secar la cereza entera. Estas se clasifican y limpian, para separar las cerezas que no están maduras de las que están demasiado maduras y de las que están dañadas, y para quitar la suciedad, la tierra, las ramas y las hojas. Las cerezas de café se extienden al sol, se rastrillan o se les da vuelta a mano para que sequen por igual (**Figura 9**). Puede llevar hasta cuatro semanas secar las cerezas al nivel máximo de un contenido de humedad del 12,5%, dependiendo de las condiciones atmosféricas. En zonas muy húmedas o en condiciones ambientales no idóneas, el secado puede prolongarse

considerablemente (es fácil la proliferación de microorganismos no benéficos). En la actualidad, se recurre al secado con aire caliente (siempre a una temperatura inferior a 30 °C), con lo que el proceso se completa en 3 o 4 días. Una vez que se han secado, se realiza el descascarillado () (Hernández, 2010; International Coffee Organization, 2013; Mussatto *et al.*, 2011).

1.4.3 Procesado por vía húmeda

Con este tipo de tratamiento se obtiene café de elevada calidad. Los frutos se introducen en agua y al hincharse, se procede al despulpado, eliminando piel y pulpa mediante máquinas despulpadoras, esta operación es la principal diferencia entre el método por vía seca y el método por vía húmeda, dado que en el método por vía húmeda la pulpa del fruto se separa del grano antes de ponerlo a secar. Esta etapa debe realizarse lo antes posible (entre 12 y 24 horas después de la recolección), a fin de evitar una fermentación incontrolada y la aparición de aromas defectuosos. Después se realiza un nuevo lavado y reclasificación, quedando los granos listos para pasar a la fase de fermentación, que es la operación en la que se aprovecha la acción enzimática (hidrolasas y enzimas proteolíticas) y el desarrollo de ciertos microorganismos (*Enterococcus*) para eliminar los restos de pulpa y la capa mucilaginosa que rodea la semilla, quedando sólo la cubierta apergaminada (**Figura 10**). Este proceso se efectúa de modo discontinuo, en depósitos de cemento, en los que se introducen los granos de café sin pulpa durante 24 horas aproximadamente, tras lo cual se lavarán en un tambor rotatorio. Tras la fermentación se practica el secado, al sol o en secadores de aire; la humedad se reduce hasta el 10-12%. El producto de esta operación es el denominado café apergaminado. Por último se elimina la cutícula apergaminada mediante el empleo de descascarilladoras. El producto obtenido por una u otra vía es el denominado café verde (International Coffee Organization, 2013; Hernández, 2010).

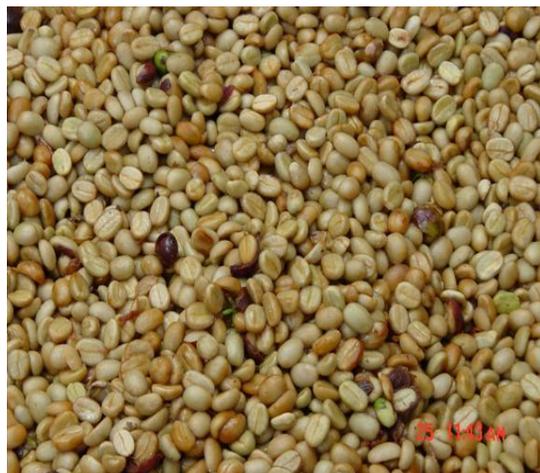


Figura 10. Granos de café en fermentación (Segura, 2004).

1.4.4 Tostado

El tostado de los granos de café es otro paso muy importante en el procesamiento de café, desde que sus propiedades organolépticas (sabores, aromas y color) son desarrolladas y afectan la calidad del café y la excelencia del café como bebida. Este es un proceso dependiente del tiempo



Figura 11. Evolución del tostado de café (Infusionistas, 2013).

y de la temperatura dando paso a múltiples cambios en la composición química y actividad biológica del café. El café verde es sometido a un proceso térmico que se lleva a cabo en los tostadores a temperaturas entre 200 y 260 °C, durante 5-15 min. En este proceso se lleva a cabo una serie de transformaciones con respecto al café verde (Figura 11), como son un aumento de volumen, modificaciones estructurales, cambios de color, pérdida de peso, así como generación de compuestos sápidos y aromáticos. Los primeros cambios se

producen a partir de los 50 °C, que provoca la coagulación de proteínas y evaporación del agua. A unos 100 °C se inicia el pardeamiento y la pirolisis de los granos; a unos 150 °C se generan compuestos gaseosos (H₂O, CO₂ y CO), responsables del aumento de tamaño; entre 180 y 200 °C se produce la caramelización completa de azúcares. Una modificación del proceso de tostado consiste en incorporar sacarosa o glucosa anhidra en una proporción máxima de 15 kg por cada 100 kg de café verde, lo que permitirá obtener el denominado “café torrefacto”. Por acción del calor el azúcar se carameliza y proporciona al café un color negro y brillante, aunque también es cierto que implica la pérdida de finura, aroma y un aumento del sabor amargo. Tras el tostado, el café se somete a un enfriamiento rápido para evitar que se queme en exceso y pierda los aromas adquiridos; después, ya está listo para su envasado y venta al consumidor directamente “en grano” o “molido”. El denominado “café soluble” se obtiene mediante tratamientos de atomización o de liofilización; este último no requiere calentamiento, no provoca pérdidas de compuestos volátiles implicados en el aroma (Hernández, 2010; Mussatto *et al.*, 2011).

1.4.5 Molienda

La molienda tiene por objeto triturar los granos de café para obtener un tamaño de partícula adecuado y, así poder realizar el proceso de extracción con agua caliente a una velocidad satisfactoria y con unos rendimientos óptimos (Figura 12) (Hernández, 2010).



Figura 12. Transformación del grano de café en su procesamiento.

1.5 PRODUCCIÓN DE CAFÉ

1.5.1 Países productores de café

La producción mundial de café creció más del 100% de 1950 a 1960, hoy en día es producido en numerosos países alrededor del mundo, sin embargo, los diez países productores de café más grandes son responsables de aproximadamente el 80% de la producción mundial (Figura 13). De este porcentaje Sudamérica participa con alrededor del 43%, Asia con el 24%, América central con el 18% y África con el 16%. Brasil, Vietnam, Colombia e Indonesia son los países más productores del mundo, responsables con más de la mitad del suministro mundial de café. De acuerdo a la organización mundial del café (ICO) en 2009 Brasil produjo aproximadamente 400 millones de sacos de café (Mussatto *et al.*, 2011).

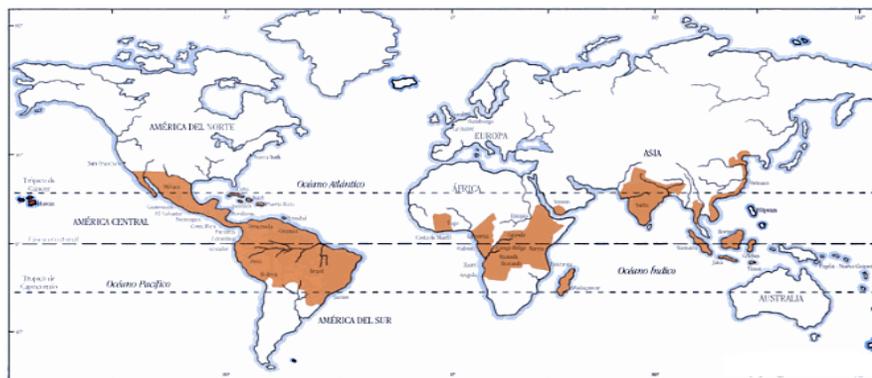
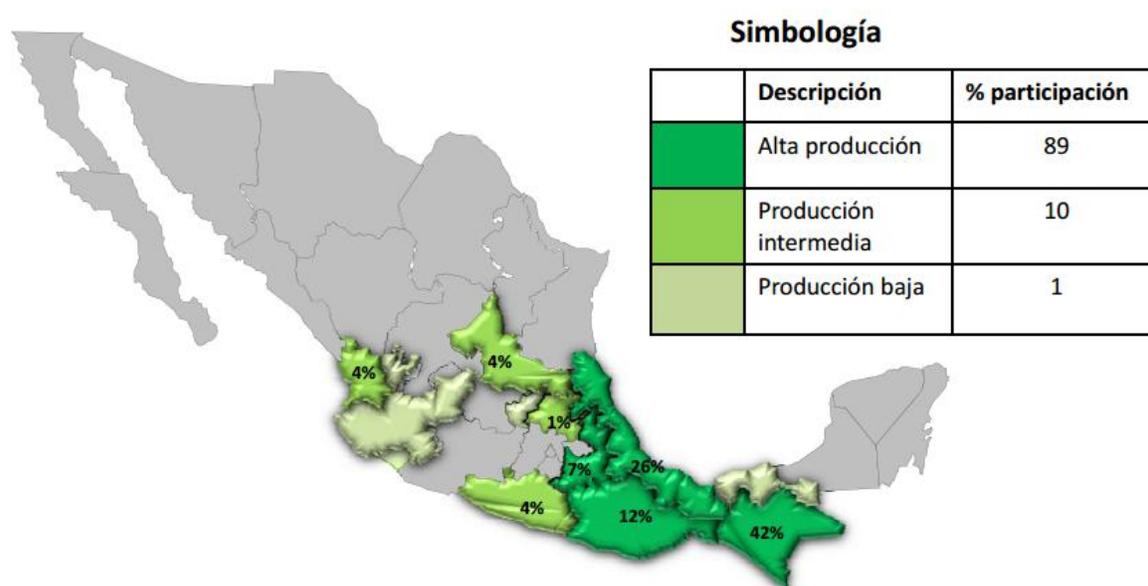


Figura 13. Áreas de cultivo de café en el mundo, también llamado cinturón del grano (Wagner, 2001).

1.5.2 Producción de café en México

El cafeto se cultiva desde la frontera con Guatemala hasta el estado de Nayarit, para México, el café representa una actividad estratégica; emplea a más de 500 mil productores, en cerca de 690 mil hectáreas de 12 entidades federativas y 391 municipios (**Figura 14**); involucra exportaciones por 897 millones de dólares/año y es el principal productor de café orgánico del mundo, destinando a esta el 10% de la superficie (**Tabla 6**); además, vincula directa e indirectamente a cerca de 3 millones de personas y genera un valor en el mercado de alrededor de 20 mil millones de pesos por año (Colín, 1990 ; SAGARPA, 2012).



De la superficie sembrada:

- El 84% está en Chiapas, Veracruz, Oaxaca y Puebla.
- El 15% en Guerrero, San Luis Potosí, Nayarit e Hidalgo.
- El 1% en Jalisco, Querétaro, Colima Y Tabasco.

Fuente: Elaborado con datos del SIAP

Figura 14. Distribución de la producción de café convencional 2011/2012 por estado (SAGARPA, 2012).

Tabla 6. Datos básico del cultivo de café (SAGARPA, 2012)

Concepto		Unidad de medida	Cantidad	
Producción nacional 2011/12	Superficie sembrada en 12 estados (miles)	Ha	760.4	
	Superficie cosechada	Ha	687.7	
	Composición de la superficie	%	97% arábica 3% robusta	
	Rendimiento (café cereza)	Ton/Ha	1.86	
	Producción anual de café cereza (miles)	Ton	1,285.8	
	Sacos de café oro, beneficiado ó verde de 60kg	Miles	4,286.1	
	Quintales de café oro, beneficiado ó verde de 45kg	Miles	5,590.5	
	Valor de la producción	\$	6,806.9	
	Número de productores(80% zonas marginales, 66% zonas indígenas)	Miles	542.2	
	Productores de café orgánico	%	7	
	Estacionalidad de la producción	%	El 66% se obtiene de enero a marzo	
Comercio	Quintales comercializados ciclo 2011/2012	Miles	2,524.8	
	Exportación ciclo 2011/2012 (Miles)	Sacos de 60kg	3,375.0	
	Valor de exportación (millones)	Dólar/pesos	875.9/11,647.2	
	Consumo per cápita	Kg anuales	1.43	
	La composición porcentual de la exportación en:	Café verde		76
		Industrializado		23
Tostado y molido			1	

Nota: el ciclo cafetalero es de octubre de un año a septiembre del siguiente.
Elaborado con datos del SIAP, PNC, OIC y AMECAFE

1.5.3 Consumo de café nacional e importado en México

Un estudio sobre hábitos de consumo de bebidas, encargado por la Asociación Nacional de la Industria del Café (ANACAFE), revela que entre 2010 y 2011 la demanda del aromático creció alrededor de 13 por ciento a nivel nacional. De las personas que se declararon como consumidoras

de café, 62 % lo toma de manera habitual y 48% lo hace a diario. Además, alrededor de la tercera parte de la población consume café en grano, debido a su sabor y por considerarlo como un producto natural. Destaca también que los consumidores consideran que el café mexicano se encuentra al nivel de los mejores del mundo, principalmente por sus características como aroma, color y sabor. De la mayoría de los consumidores del aromático, el 53% conocen el origen del café que adquieren, de ellos, más del 86% prefieren el grano mexicano. Cabe señalar que el café mexicano cuenta con dos denominaciones de origen, una para Chiapas, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 2 de noviembre del 2006, y la otra para Veracruz con fecha del 12 de agosto del 2003; ambas entidades aportan 49 por ciento de la producción total nacional (SAGARPA, 2011).

1.5.4 México como exportador de café

El café mexicano ha ido a la alza cada vez más como producto de exportación. Aunque ya se tiene presencia del café mexicano en más de 40 países, los tres destinos principales de las exportaciones cafetaleras mexicanas son Estados Unidos con el 57% de las ventas, Bélgica 22% e Italia 3% de los embarques (El informador, 2012). En la **Tabla 6** se observan los datos de las exportaciones cafetaleras en el ciclo 2011-2012.

1.6 PLANTAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

1.6.1 Origen

Hace unos doce mil años comenzaron a aparecer las primeras comunidades sedentarias capaces de procurarse gran parte de su alimento mediante el cultivo de diversas gramíneas silvestres. De la aparición de la agricultura en la época neolítica se ha producido un incremento cada vez mayor de la diversidad de las especies cultivadas por el ser humano. El paso del régimen de vida cazador-recolector al agrícola pudo estar motivado por diferentes circunstancias, aunque predominara la necesidad, esto sólo pudo realizarse porque algunas plantas (hasta entonces silvestre) y animales (hasta entonces salvajes) se modificaron fuertemente en su contacto permanente con el hombre. La agricultura existió porque estas modificaciones se transmitieron de generación en generación aunque el hombre no supiera la razón. No es posible cultivar sin que automáticamente se realicen cambios en la información hereditaria del material que se cultiva. Planta cultivada es pues un

sinónimo de *planta modificada genéticamente* a favor de las necesidades del hombre. La domesticación causa un cambio drástico en la arquitectura de la planta; en realidad, produce el mayor cambio posible que no tiene comparación ni con los cambios posteriores mediante selección ni mucho menos, con las minúsculas modificaciones ocasionadas por la introducción de un simple gen mediante técnicas de ingeniería genética (Benítez, 2005 ; Cubero, 2002).

1.6.1.1 Mejora vegetal

El objetivo de cualquier programa de mejora es siempre la obtención de cultivares que muestren un buen comportamiento en una amplia variedad de ambientes.

1.6.1.2 Mejora clásica.

La combinación de selección, cruzamiento, mutagénesis, manejo cromosómico, etc. es lo que hoy denominamos *mejora clásica* o tradicional, aunque algunos de dichos métodos, sean recientes. Puede decirse que en la obtención de todas las variedades actuales figuran todas las técnicas convencionales mencionadas. Lo que en definitiva, se ha logrado con ellas ha sido transferir trozos de material hereditario entre variedades y en ocasiones entre especies, formando así nuevas combinaciones inexistentes hasta entonces en la naturaleza. La única condición impuesta a los métodos tradicionales es la de que entre los materiales elegidos como parentales sea posible el cruzamiento. Si no es así, la única posibilidad de producir con dichos métodos algo inexistente en la naturaleza es la mutación artificial: pero esta ocurre, totalmente al azar, sin que podamos predecir, con los procedimientos actuales, si vamos a conseguir el carácter deseado o no (Cubero, 2002).

1.6.2 Biotecnología vegetal

En el sentido amplio la biotecnología vegetal constituye el empleo de plantas para la producción de bienes y servicios, esto incluye todas las técnicas agronómicas y hortícolas tradicionales que se han empleado desde hace miles de años. Su objetivo principal es la producción de cultivos de mayor calidad y más rendimiento. Ésta representa un conjunto de herramientas que permitirán continuar desarrollando las variedades más convenientes para las condiciones del campo, el procesamiento industrial y las exigencias de los diferentes mercados. Los beneficios pueden ser en forma de (García *et al.*, 2004):

- a) Mayores rendimientos por hectárea.
- b) Incremento de las superficies cultivables sobre todo por incorporación de tierras en las que las condiciones ambientales son desfavorables.
- c) mayor calidad de los productos.

Se fundamenta en la posibilidad de cultivar *in vitro* células, tejidos u órganos vegetales y de regenerar, a partir de ellos, plantas completas (**Tabla 7**). Si el proceso de cultivo es muy eficiente obtendremos miles de individuos clonales; si éstos se derivan de células sanas que no albergan ningún microorganismo patógeno las nuevas plantas estarán completamente libres de enfermedades. Si las clonas provienen de materiales parentales seleccionados o de células que han sufrido algún cambio genético y poseen nuevas características, las plantas que se deriven expresarán también esas nuevas características (García *et al.*, 2004).

1.6.2.1 Aplicaciones de la biotecnología vegetal

Tabla 7. Aplicaciones de la biotecnología vegetal (García, *et al.*, 2004)

Estrategias	Metodologías	Aplicaciones
Multiplicación masiva de líneas clonales	Cultivos de meristemos. Organogénesis: inducción de brotes adventicios. Embriogénesis somática.	Propagación de nuevas variedades. Propagación de cultivadores de élite. Propagación de especies en peligro de extinción. Producción de semillas artificiales
Producción de plantas libres de patógenos	Termoterapia Quimioterapia Cultivo de meristemos	Producción de material parental libre de enfermedades para la horticultura y agricultura, especialmente ornamentales, verduras, hortalizas y frutales.
Generación de nueva variabilidad genética	Cultivo de haploides	Producción de dobles haploides para programas de fitomejoramiento
	Selección de variantes inducidas <i>in vitro</i> de callos Células en suspensión y protoplastos	Resistencia a hongos, virus, sequías, salinidad, etc. Variantes morfológicas.
	Producción de híbridos somáticos por fusión de protoplastos	Cruzamientos interespecíficos
	Incorporación de características específicas por medio de transformación genética	Producción de cultivares resistentes a: virus, insectos insecticidas, temperaturas extremas, etc.
	Rescate de embriones cultivo <i>in vitro</i> de embriones cigóticos	Facilita el entrecruzamientos distantes
Conservación de germoplasma	Cultivos de meristemos, brotes y embriones bajo condiciones limitantes	Preservación en bancos de germoplasmas

1.6.2.2 Híbridos y transgénicos.

Es necesario enfatizar la clara distinción que hay entre la generación de un transgénico y la de un híbrido. En los transgénicos, lo único que se hace es introducir uno o pocos genes en el organismo que se quiere modificar. En cambio, en la generación de un híbrido, una práctica agronómica muy antigua, se cruzan dos variedades de una misma especie o dos especies diferentes, que son siempre genéticamente y evolutivamente muy cercanas, para obtener una nueva variedad o una especie nueva, cuyo genoma es el resultado de la combinación de los genomas de las dos variedades o especies iniciales. Por otra parte, en la generación de transgénicos los genes implicados pueden provenir de especies muy diversas y evolutivamente alejadas (Torrens, 2011).

1.6.2.2.1 Híbridos

Una hibridación es un entrecruzamiento entre dos individuos que presentan diferencias genéticas, y se puede aplicar tanto en cruces entre especies diferentes, como también cruces entre cepas o variedades diferentes de una misma especie. Una cepa es un grupo de individuos de una especie que presentan una serie de características genéticas comunes, lo que en agricultura se denomina variedad. Generalmente los híbridos entre especies son completamente estériles debido al desequilibrio genético entre cromosomas implicados, pero en algunas circunstancias la esterilidad no es total. En este caso si el híbrido muestra claras ventajas adaptativas, se puede formar una especie nueva que tenga garantizada su continuidad (Torrens, 2011).

1.6.2.2.2 Transgénicos (OGM)

Un OGM es referido a un organismo vivo cuyo genoma ha sido modificada por la introducción de un gen exógeno capaz de expresar una proteína recombinante o mediante la supresión o modificación de un gen propio mediante técnicas de ingeniería genética; confiriendo nuevas características como tolerancia a herbicidas, resistencia a virus, antibióticos, insectos, etc. (Karamollaoglu *et al.*, 2009; Torrens, 2011).

1.6.3 Métodos de transformación

1.6.3.1 Biológicos

- Infección con *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria transmitida del suelo que causa la enfermedad de agalla de la corona en las plantas. Las plantas infectadas muestran un biliar en el vástago que se compone de células vegetales proliferando que se inducen gracias a la presencia en el citoplasma bacteriano de un plásmido, denominado Ti, parte del cual se transfiere a la célula vegetal infectada debido a la presencia de un conjunto de genes infectivos (*vir*), localizados tanto en el propio plásmido como en el cromosoma de la planta. El fragmento de ADN transferido (ADN-T) contiene varios oncogenes, que se transcriben tras su inserción en el genoma de la planta y que codifican distintas proteínas involucradas en la biosíntesis de auxinas y citoquininas, que son los compuestos con actividad hormonal que inducen la proliferación tisular (**Figura 15, (b)**). En el ADN-T se localiza, asimismo, un gen que codifica una enzima involucrada en la síntesis de opinas, que son las sustancias exudadas por la planta de las que se alimenta la bacteria. El ADN-T puede sustituirse por un ADN quimérico, que contenga el transgen deseado sometido al control transcripcional de un promotor diseñado al efecto (Benítez, 2005; Kempken & Jung, 2010).

- Infección con *Agrobacterium rhizogenes*

Este patógeno vegetal da lugar a una proliferación radicular anormal en las plantas infectadas. Se basa en un principio semejante al descrito en el caso de *A. tumefaciens*, pero este cuenta con mayores ventajas (Benítez, 2005).

- Utilización de vectores víricos

En los vectores víricos el transgen viaja protegido por la cápsida de un virus vegetal específicamente seleccionado. Mediante este método sólo se consiguen transformaciones transitorias (Benítez, 2005).

1.6.3.2 Físicos

- Biobalística

El ADN desnudo viaja adsorbido sobre microesferas de tungsteno o de oro, que son proyectadas gracias a un sistema propulsor que utiliza helio. Las partículas se aceleran a alta velocidad hacia el tejido de la planta diana y penetran a través de la pared celular o directamente en el núcleo. El ADN, que se precipitó inicialmente sobre las partículas, se libera en la célula, encuentra su camino al ADN nuclear y se integra en el genoma (**Figura 15 (b)**) (Benítez, 2005; Kempken & Jung, 2010).

- Protoplastos

Los protoplastos son células vegetales a las cuales se les ha eliminado su pared celular la cual representa la barrera más formidable para la introducción de grandes moléculas, al remover la pared celular se incrementan las posibilidades para la inserción del ADN. Para remover esta pared los tejidos son incubados con mezclas comerciales de celulosas y pectinasas. Los protoplastos son suspendidos en soluciones salinas que contienen una cantidad suficiente de estabilizantes osmóticos para prevenir la ruptura. Una vez que los protoplastos se encuentran desprovistos de su pared celular, todavía requieren que el ADN atraviese la membrana. La entrada del ADN exógeno en el protoplasto puede conseguirse fácilmente utilizando diversos métodos:

(Kempken & Jung, 2010).

-La electroporación, es decir, la apertura transitoria de orificios en las membranas plasmáticas de los protoplastos que permiten la entrada de moléculas de ADN en suspensión. La integración del ADN en el genoma de la planta se produce por recombinación heteróloga (Benítez, 2005).

- El tratamiento con polietilenglicol, un agente fusagénico que modifica químicamente las membranas al interactuar con los fosfolípidos que las componen, permite la entrada del ADN exógeno en suspensión presente en el medio.

-La transformación con liposomas, en la que se emplean liposomas artificiales en cuyo interior viaja la suspensión de moléculas de ADN (Benítez, 2005).

- Abrasión con fibras

Consiste en la apertura de entradas permanentes en las paredes y membranas celulares mediante la mezcla a alta velocidad de células vegetales y fibras abrasivas, generalmente de carburo de silicón, recubiertas de ADN.

- Otras técnicas: Microinyección de ADN en cigotos, transformación mediada por láser y femtoinyección (Benítez, 2005).

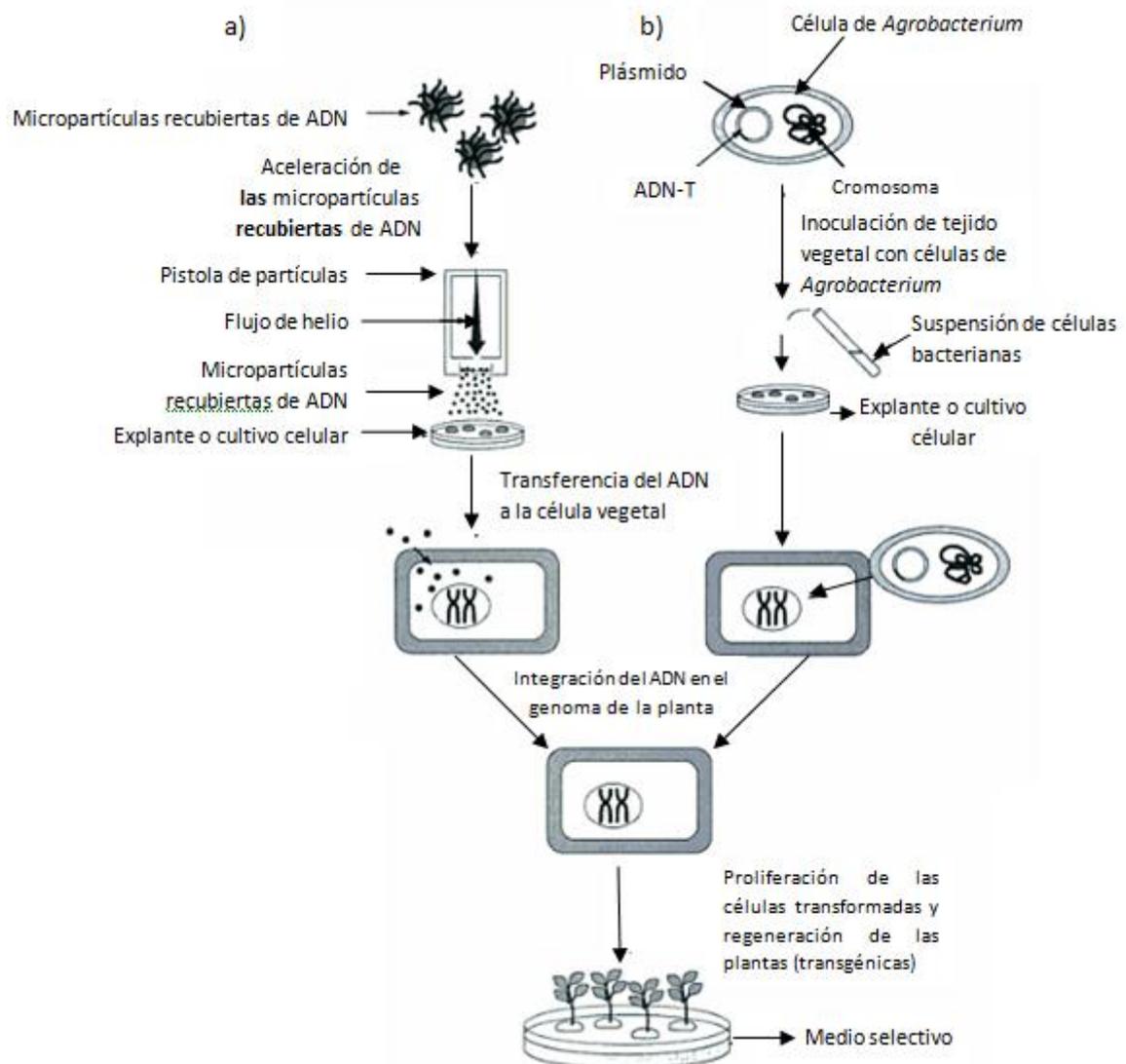


Figura 15. Las dos técnicas principales de transferir genes a las células vegetales (Benítez, 2005)
 a) Transformación directa, en la que el ADN se integra directamente en el genoma nuclear o plastidial; la técnica más empleada para ello es la biobalística.
 b) Transferencia indirecta, que hace uso de sistemas de transferencia genética de *Agrobacterium*.

1.6.4 Promotores y terminadores

Los vectores construidos para la transformación de plantas contienen secuencias de ADN destinadas a ser insertadas en el organismo objetivo y además de estas secuencias, la construcción de un vector incluye unas secuencias llamadas promotoras y terminadoras las cuales permiten a la planta expresar el gen de interés que será introducido y llevar a cabo la transcripción de proteínas (Figura 16) (Holden *et al.*, 2010).

- Promotor: Fragmento de ADN que regula en qué tipo de célula, en qué momento y en qué cantidad se sintetiza una cadena de ARN, tomando como molde parte de la secuencia del gen (región codificante), estas secuencias están generalmente localizadas en la región 5' del gen (Duce, 2005).
- Región codificante: Región donde se encuentran las secuencias que se van a transcribir y formar cadenas de ARN. La región codificante de los genes se encuentra localizada entre la región promotora y la región terminadora del gen (Duce, 2005).
- Terminador: Fragmento de ADN dentro del gen que contiene las señales que determinan el final del proceso de transcripción, evitando que continúe hacia otros genes que se encuentren más adelante. La región terminal está localizada en la parte 3' del gen (Duce, 2005).

El promotor de la subunidad 35S del ARN ribosomal del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S) y el terminador *nos* (T-NOS) de *Agrobacterium tumefaciens* son extensamente empleados para la producción de vegetales transgénicos entre ellos la soya Roundup Ready, maíz MaisGard y el tomate flavr Savr. Ejemplos de Transgénicos autorizados en diversos países (Mariotti *et al.*, 2001).



Figura 16. Esquema de representación de la secuencia del gen insertado, que consiste en el promotor (P), un gen estructural (región codificante) y un terminador (T), (Mariotti *et al.*, 2001)

1.6.4.1 Evento transgénico de maíz.

Un ejemplo de evento transgénico de maíz que contiene la secuencia promotora CaMV 35S y el terminador T-NOS podría ser el evento MON810.

- Característica: Maíz resistente a insectos y lepidópteros
- Genes y elementos genéticos introducidos: La resistencia se obtuvo por la introducción del gen *cry1A(b)* en el genoma del maíz para la síntesis de la toxina *Bt* de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*, que impide el desarrollo de las larvas de insectos lepidópteros. Para el evento MON810 se realizó la transformación con el plásmido PVZMBK07, que contiene al gen *cry1A(b)* bajo el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor y la secuencia 3' no codificante para la poliadenilación del gen *nos* (T-NOS nopalina sintasa) de *A. tumefaciens* (ArgenBio,2014) .
- Método de transformación: Bombardeamiento de micropartículas.
- Empresa desarrolladora: Monsanto
- Año de autorización en México: 2006 (COFEPRIS,2013)

1.7 CAFÉ MODIFICADO GENÉTICAMENTE

1.7.1 Causas

El cultivo tradicional en la planta del café consume demasiado tiempo, debido al ciclo biológico de este árbol. Se necesitan al menos 3 años para cosechar los primeros frutos de una progenie y 2

años más para la evaluación del rendimiento. En realidad, los programas de mejoramiento del café comenzaron en el siglo XX y el primer híbrido interespecífico artificial, llamado Arabusta se obtuvo durante la década de 1960 en Costa de Marfil. La introgresión de nuevos rasgos de la reproducción tradicional implica la hibridación y la segregación de los caracteres mendelianos, los objetivos del mejoramiento tradicional están orientados principalmente hacia la introducción de genes de resistencia a plagas como la roya y la broca del café principalmente. En general, la estrategia principal de reproducción sigue siendo la creación de nuevos clones portadores de genes de resistencia a enfermedades y buen comportamiento agronómico (Spiral *et al.*,2000).

En conclusión, la introducción de nuevos rasgos por la mejora clásica, en particular la variedad de café y el proceso de selección apropiado tarda entre 25 y 35 años para que una nueva variedad mejorada sea liberada. Por lo tanto el uso de la ingeniería genética para introducir un rasgo seleccionado en este cultivo perenne es de gran importancia para reducir el tiempo para la creación de nuevos cultivares y se espera que los métodos que implican la ingeniería genética sean de gran interés en el futuro para la rápida introducción de rasgos seleccionados. Por ejemplo, debe ser posible para introducción de genes para mejorar la resistencia a los insectos , tales como resistencia a la broca del café o genes que confieren mejoras en la calidad , tales como secuencias genéticas que conducen a una reducción en el contenido de cafeína (Spiral *et al.*,2000).

1.7.2 Modificaciones genéticas hechas en café

Han sido producidas plantas modificadas genéticamente de café por diferentes grupos de investigación en el mundo (**Tabla 8**). A pesar de los avances significativos en los últimos 15 años, la transformación del café sigue siendo una metodología muy laboriosa, que está muy lejos de ser una técnica de laboratorio de rutina (Ferreira *et al.*, 2006).

Tabla 8. Modificaciones genéticas realizadas en café y resultados obtenidos (Ferreira *et al.*, 2006)

Especies <i>Coffea</i>	Explante usado	Método de transformación	Resultados	Referencia
<i>C. arabica</i>	Protoplastos	<i>A. tumefaciens</i>	Expresión del gen GUS	Spiral and Pétiard (1991)
	Los embriones somáticos, cotiledones	<i>A. tumefaciens</i>	Integración de Kanamicina, sin regeneración	Feng et al. (1992)
	Protoplastos	Electroporación	Integración de Kanamicina, sin regeneración	Barton et al. (1991)
	Embriogénesis somática-arabica y arabusta	<i>A. rhizogenes</i>	Integración del gen GUS, regeneración de la planta	Spiral and Pétiard (1993)
	Embriogénesis somática-arabica y arabusta	<i>A. rhizogenes</i> y <i>A. tumefaciens</i>	Transformación putativa de callos, amplificación del T-ADN	Freire et al. (1994)
	Embriogénesis somática de hojas	Biobalística, ADN plasmidal	Expresión del gen GUS	Van Boxtel et al. (1995)
	Cotiledones, hojas	<i>A. rhizogenes</i>	Regeneración de la raíz de las plantas	Sugiyama et al. (1995)
	Embriogénesis somática	<i>A. tumefaciens</i>	Integración del gen Cry1AC y <i>csr1-1</i> , regeneración de la planta	Leroy et al. (2000)
	Hojas, tejido embriogenético	Suministro biobalístico	Expresión del gen GUS	Rosillo et al. (2003)
	Tejido embriogenético, embriogénesis somática	Electroporación	Expresión del gen GUS, formación de embriones secundarios	Da Silva & Yuffá, (2003)
	Tejido embriogenético, embriogénesis somática	<i>A. tumefaciens</i>	Expresión del gen GFP, integración de CaMxMt1, tejido de la planta transformado embriogenéticamente	Ogita et al. (2004)
	Tejido embriogenético	Suministro biobalístico	Integración de los genes GUS y BAR, regeneración de la planta	Cunha et al. (2004)
	tejido embriogenético	<i>A. tumefaciens</i>	Antisentido ACC e integración del gen BAR, regeneración de la planta	Ribas et al. (2006)
<i>C. canephora</i>	Embriogénesis somática	<i>A. rhizogenes</i>	Integración del gen GUS, regeneración de la planta	Spiral et al. (1991)
	Embriogénesis somática	<i>A. rhizogenes</i>	Integración del gen GUS, regeneración de la planta	Spiral and Pétiard (1993)
	Embriogénesis somática	<i>A. tumefaciens</i>	Integración Bt, regeneración de la planta	Leroy et al. (1997)
	Tejido embriogenético	<i>A. tumefaciens</i>	Integración del gen GUS y HPT, regeneración de la planta	Hatanaka et al. (1999)
	Embriogénesis	<i>A. tumefaciens</i>	Integración de los genes Cry1AC y	Leroy et al. (2000),

Tabla 8. Modificaciones genéticas realizadas en café y resultados obtenidos (Continuación)

	somática		csr1-1, regeneración de la planta, con pruebas de campo	Perthuis et al. (2005)
	Tejido embriogénico, embriogénesis somática	<i>A. tumefaciens</i>	Expresión del gen GFP con integración de CaMxMT1, regeneración de la planta	Ogita et al. (2004)
	Tejido embriogénico	<i>A. tumefaciens</i>	Integración de los genes GUS y BAR	Cruz et al. (2004)
	Hipocótilo	<i>A. tumefaciens</i>	Integración de los genes GUS y HPT, regeneración de la planta	Mishra and Sreenath (2004)
	Tejido embriogénico	Suministro biobalístico	Integración de los genes GUS y BAR, regeneración de la planta	Ribas et al. (2001,2005)
	Tejido embriogénico	<i>A. tumefaciens</i>	Integración de los genes GUS y BAR, regeneración de la planta	Ribas et al., (2003,2006)
	Explantos de la hoja y tejido embriogénico	<i>A. tumefaciens</i>	Integración de los genes DsRFP y NTPII, regeneración de la planta	Canche-Moo et al., (2006)

La transformación del café, sus perspectivas, sus potenciales beneficios y riesgos están dirigidos a consideración del mercado y la aceptación del consumidor acerca de productos de café genéticamente modificado.

1.8 Legislación

- **Los transgénicos en México**

De acuerdo a la Ley General de Salud, en sus artículos 282 bis, 282 bis-1 y 282 bis-2; se deberá notificar a la Secretaría de Salud (SALUD) de todos aquellos productos biotecnológicos que se destinen para el uso y consumo humano. Asimismo, el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios establece, en sus artículos 164, 165, 166 y 167; que los responsables del proceso de los productos biotecnológicos deberán presentar ante SALUD la información técnica de los resultados de estudios que sustenten su inocuidad y estabilidad, estando su comercialización sujeta a la evaluación que se realice. La Ley General de Salud, el Reglamento de Control Sanitario de Productos y Servicios y el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Publicidad, establecen las condiciones de etiquetado y publicidad para los productos biotecnológicos destinados al uso y consumo humano (COFEPRIS, 2008).

La Ley de Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados (LBOGM) en su Art. 16 establece la competencia que tiene SALUD al respecto; y en las Fracciones II y V, del citado

Artículo, se establece el evaluar caso por caso los estudios que elaboren y presenten los interesados sobre la inocuidad y los posibles riesgos de los OGMs sujetos a autorización en los términos del Título Quinto de dicha Ley. El Título Quinto de la LBOGM, dentro de su articulado, enlista a los OGMs objeto de autorización, establece los requisitos para la solicitud de autorización de un OGM, el plazo máximo de expedición de autorizaciones, los casos por los que se niega la autorización, entre otros (COFEPRIS, 2008).

Con respecto a los transgénicos muchos países han desarrollado leyes para controlar su mercado. En Estados Unidos el gobierno regula la aprobación y el desarrollo de los OGMs mientras que su etiquetado aún no es obligatorio, pero en Europa el reglamento sobre nuevos alimentos exige el etiquetado de los productos modificados genéticamente. En la actualidad, en la UE, el etiquetado es obligatorio para los productos alimenticios que contengan ingredientes derivados de OGMs en porcentaje superior al 1% (Mariotti *et al.*, 2001).

1.9 AUTENTIFICACIÓN DE ALIMENTOS.

¿Cuál es el significado de la autenticidad de los alimentos? La palabra “auténtica” se define generalmente como “fiable, de confianza digna, de origen indiscutible, genuino”. Los alimentos son generalmente de origen vegetal o animal. Por lo tanto, la identificación fiable de las especies es un tema clave para la autenticidad de los alimentos y que se basen en parámetros que no sean objeto de alteraciones en el procesamiento de alimentos (Luthy, 1999).

Para estudiar la diversidad y variación genética, se emplean marcadores genéticos, que son variaciones heredadas que pueden ser utilizadas para comprender eventos genéticos. Estas variaciones deben ser polimórficas, es decir, deben existir dos o más variantes de las formas comunes (sitios o genes) en la población bajo estudio, que puede ser o no un gen funcional. Los marcadores genéticos pueden ser fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) de función desconocida o sin función que sea transmitido de acuerdo con las reglas mendelianas para alelos codominantes (Pimentel *et al.*, 2006).

La identificación clara de la especie de la cual provienen los alimentos es muy importante y existen al menos tres razones para su justificación:

- Evitar el fraude económico por sustitución o adulteración del producto.
- Requerimientos especiales, relacionados con aspectos de salud o de orden sanitario, tales como problemas de alergias alimentarias en individuos susceptibles o que reaccionan ante ciertas proteínas de origen animal.
- Por razones culturales.

Para identificar la especie de la que proceden determinados productos de origen animal, tradicionalmente se han venido estudiando proteínas, ya fuese mediante la electroforesis de proteínas solubles, la separación mediante HPLC, y/o métodos inmunoenzimáticos. Sin embargo, con los tratamientos culinarios de rutina empleados en la preparación de los alimentos, las proteínas se desnaturalizan, lo que no ocurre con la molécula de ADN, dado que es más estable a tales tratamientos (calor, salado, ahumado, etc.), ya que no es degradada en la cadena de producción de los alimentos y más termoestable que las proteínas. En la actualidad, estas técnicas convencionales han sido desplazadas por el uso de metodologías mediante el estudio de ADN, la cual permite determinar de manera más exacta el origen y la identificación de todos los productos que llegan al consumidor aunque ya estén procesados (Aranguren-Méndez *et al.*, 2009).

1.9.1 Identificación de un transgénico

En una década donde el uso de organismos modificados genéticamente y la siembra de cultivos transgénicos han aumentado consistentemente, las superficies sembradas con cultivos transgénicos superaron los 100 millones de hectáreas en 21 países durante el 2005. Cerca de 100 plantas modificadas genéticamente ya han sido aprobadas por las agencias reguladoras de diferentes países. Debido a la percepción pública de los OGMs como controversial, la legislación requiere la trazabilidad y detección de OGMs en algunos países. En más de 15 países, se requiere el etiquetado obligatorio de productos que contienen OGMs o productos derivados que superen un determinado umbral. La lista de los OGMs aprobada difiere de un país a otro (aprobación asincrónica) y es necesario el control de los OGMs no aprobados para controlar la presencia de los que no hayan sido autorizados. Hay algunos métodos de análisis ya disponibles para la detección de organismos modificados genéticamente basados en la detección de ADN exógeno y en las proteínas respectivamente. Un método para la detección de transgénicos significativos en el contexto de ADN ya ha sido validado por estudios colaborativos realizados entre diferentes

laboratorios y se refiere a la detección de promotor CaMV 35S y el terminador T-NOS en diferentes muestras. Este método asocia la amplificación por PCR con gel de electroforesis. Más recientemente métodos cuantitativos para la detección de ADN transgénico están en estudio, y algunos resultados han sido reportados utilizando el enfoque de "PCR en tiempo real" (Cankar *et al.*, 2008).

1.9.2 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica que facilita la ampliación *in vitro* de un fragmento específico de ADN. Utiliza el mismo principio de la ADN polimerasa en la síntesis de una cadena complementaria del ADN en la dirección 5'-3', pero emplea dos primers (secuencia de nucleótidos de 20-25pb) cada uno complementario a las cadenas de la región del ADN de los extremos, que se ubicarán una vez se ha desnaturalizado el ADN por calor, y dirigen la síntesis del ADN hacia el otro primer. Los requerimientos de la reacción son simples: desoxinucleótidos para proveer energía y nucleótidos para la síntesis de ADN, ADN polimerasas, primers, ADN molde y buffer con magnesio. Para permitir la amplificación selectiva es necesario obtener información de la secuencia del ADN y así diseñar los dos primers que son específicos para la secuencia del ADN a flanquear.

La PCR consiste en una serie de ciclos constituidos por tres reacciones sucesivas:

- 1.- Desnaturalización: 92-95°C, separación de las cadenas de ADN.
- 2.- Alineación: 50-70°C, ubicación de los primers en el ADN por complementariedad.
- 3.- Elongación: 70-75°C, la ADN polimerasa sintetiza la cadena (Gutiérrez *et al.*, 2006).

La orientación de los primers es escogida a propósito, de tal suerte que la dirección de la síntesis de la nueva cadena sucede a partir de un primer hacia el sitio de unión del otro primer. Por tanto, las cadenas sintetizadas pueden servir de molde para la síntesis de ADN nuevo, causando una reacción en cadena con un aumento exponencial en el producto. La ADN polimerasa de mayor uso en los laboratorios es la Taq ADN polimerasa, enzima obtenida a partir del microorganismo *Thermus aquaticus*, la cual se caracteriza por ser termo-estable hasta los 95°C y una temperatura óptima de trabajo de 80°C (Gutiérrez *et al.*, 2006).

1.9.2.1 Análisis del producto de la PCR

Electroforesis en gel

Por mucho el procedimiento más común para el análisis de ácidos nucleicos es la electroforesis en gel. Este es un enfoque muy flexible que proporciona información sobre el tamaño de la molécula de ADN y bajo ciertas condiciones puede ser utilizado para discriminar diferentes secuencias del mismo tamaño. La electroforesis también puede utilizarse para separar y purificar fragmentos de ácidos nucleicos, para cuantificar desequilibrios alélicos, etc. Para la electroforesis de ADN, los soportes más comúnmente utilizados son los de agarosa y poliacrilamida. En general, los geles de poliacrilamida son más útiles para la separación de fragmentos de ADN (por debajo 300-500 pares de bases) y para aplicaciones donde se requiere una alta resolución (por ejemplo, análisis de microsatélites) porque son capaces de resolver las diferencias de tamaño de tan sólo 1 pb. Los geles de poliacrilamida se pueden ejecutar más rápidamente y en mayor temperatura de geles de agarosa. Sin embargo, la poliacrilamida es una neurotoxina y presenta un riesgo de seguridad (Bartlett, 2003).

1.9.2.2 RFLP

Son variaciones en la longitud de la cadena de las moléculas de ADN después de haber sido sometidas a la digestión con enzimas de restricción. El RFLP y su análisis son un buen método para la caracterización del ADN genómico y es usado para conocer el origen y evolución sistemática de un genoma.

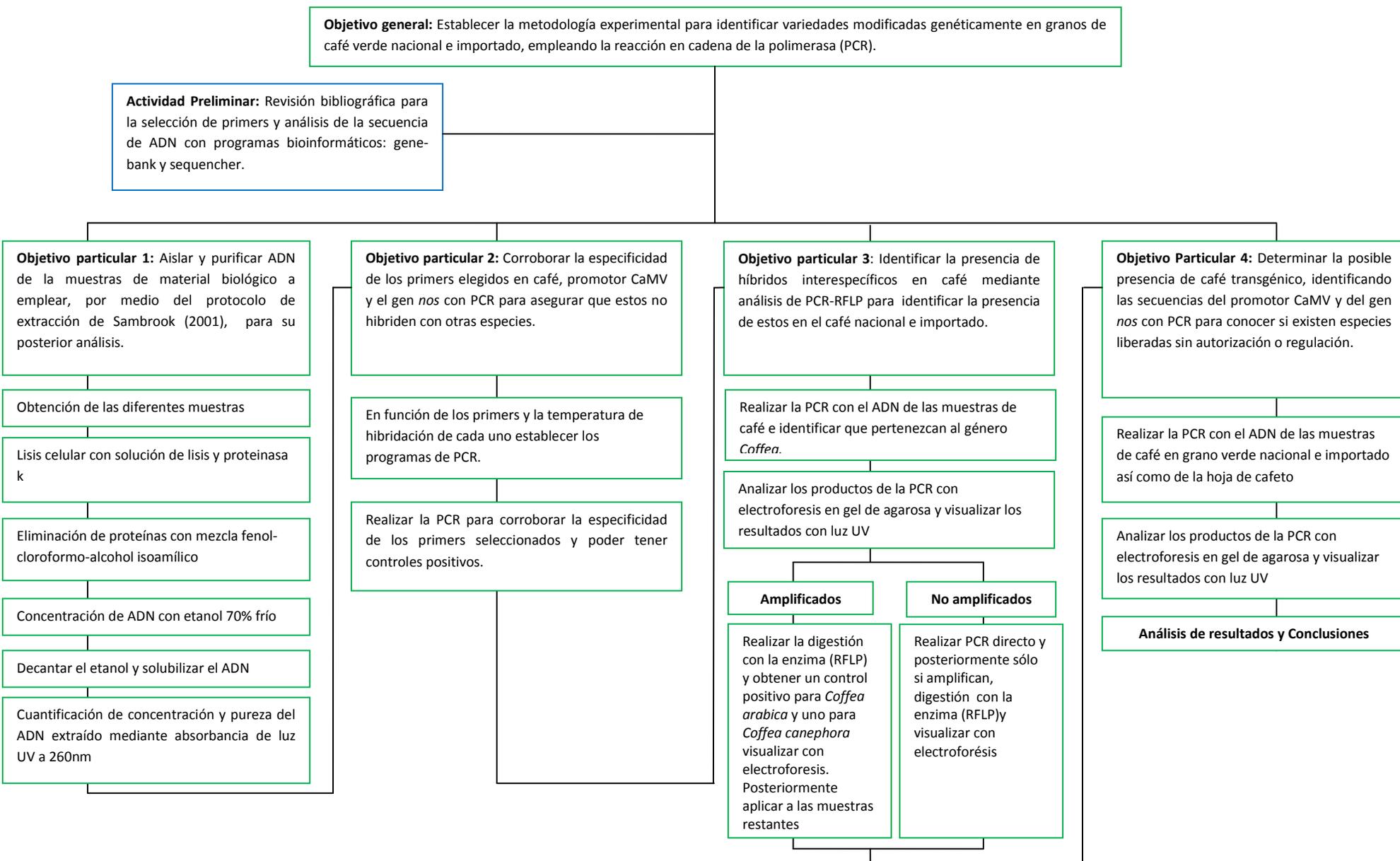
Las cadenas de especies pueden también ser identificadas por mapeos de RFLP. Estos cambios ocurren por la inserción o delección de bases en sitios particulares de restricción que efectúan las longitudes de las secuencias entre los sitios de restricción. En un ensayo común de RFLP el ADN es aislado y digerido con endonucleasas de restricción. El resultado es separado por geles de electroforesis de agarosa y después visualizados con luz UV- Estos ensayos han sido empleados para evaluar la diversidad genética de las poblaciones (Hui & Khachatourians, 1995).

CAPÍTULO II

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

“Si no hay café para todos, no habrá café para nadie”
Ernesto Guevara

2.1 CUADRO METODOLÓGICO



2.2 OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer la metodología experimental para identificar variedades modificadas genéticamente en granos de café verde nacional e importado, empleando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Actividad preliminar: Revisión bibliográfica para la selección de primers y análisis de la secuencia de ADN con programas bioinformáticos: gene-bank y sequencher.

Objetivo particular 1: Aislar y purificar ADN de las diferentes muestras de material biológico a emplear, por medio del protocolo de extracción de Sambrook 2001 para su posterior análisis.

Objetivo particular 2: Corroborar la especificidad de los primers elegidos para café, promotor CaMV y para el gen *nos* con PCR para asegurar que estos no hibriden con otras especies.

Objetivo particular 3: Identificar la presencia de híbridos interespecíficos en café mediante análisis de PCR-RFLP para identificar la presencia de estos en el café nacional e importado.

Objetivo Particular 4: Determinar la posible presencia de café transgénico, identificando las secuencias del promotor CaMV y del gen *nos* con PCR para conocer si existen especies liberadas sin autorización o regulación.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Material biológico

Muestras de tejidos vegetales y animales empleados en las pruebas de especificidad (**Tabla 9**).

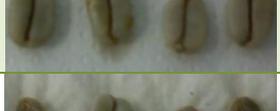
Tabla 9. Muestras de material biológico para especificidad.

Número	Nombre de la muestra	Origen	Imagen
1	Soya	S/e	
2	Tomate verde	S/e	
3	Chile verde	S/e	
4	Papaya	S/e	
5	Bovino	S/e	

Los granos de café verde nacional (**Tabla 10**), importado (**Tabla 11**) y el tejido vegetal de la planta de cafeto (**Tabla 12**) empleados en la experimentación fueron los siguientes:

Tabla 10. Especificaciones de los granos de café verde nacionales empleados en la experimentación

Número	Nombre de la muestra	Origen	Especie reportada	Variedad	Imagen
1	Chiapas 1	S/e	<i>C. arabica</i>	S/e	
2	Oaxaca 1	S/e	<i>C. arabica</i>	S/e	

3	Puebla 1	S/e	<i>C. canephora</i>	S/e	
4	Veracruz 1	S/e	<i>C. arabica</i>	S/e	
5	Hidalgo 1	Tulancingo, Hgo.	<i>C. canephora</i>	S/e	
6	Chiapas 2	S/e	<i>C. arabica</i>	S/e	
7	Oaxaca 2	S/e	<i>C. arabica</i>	S/e	
8	Chiapas 3	Sierra Cerro brujo, Chis.	<i>C. arabica</i>	Maragogipe	
9	Chiapas 4	Sierra Madre, Chis.	<i>C. arabica</i>	Typica	
10	Puebla 2	Santa Fe, Pue.	<i>C. arabica</i>	Typica y Caturra	
11	Puebla 3	Sierra Norte, Pue.	<i>C. arabica</i>	Typica	
12	Oaxaca 3	Villa alta, Oax.	<i>C. arabica</i>	S/e	
13	Oaxaca 4	Zona del Bule, Oax.	<i>C. arabica</i>	S/e	
14	Veracruz 2	Orizaba, Ver.	<i>C. arabica</i>	Typica	
15	Veracruz 3	Coatepec, Ver.	<i>C. arabica</i>	S/e	
16	Veracruz 4	Coatepec, Ver.	<i>C. arabica</i>	S/e	

S/e: Sin especificar.

Tabla 11. Especificaciones de los granos de café verde importados empleados en la experimentación.

Número	Nombre de la muestra	Origen	Especie reportada	Variedad	Imagen
17	Bra.	Brasil	<i>C. canephora</i>	S/e	
18	Per.	Perú	<i>C. canephora</i>	S/e	
19	Ind.	Indonesia	<i>C. canephora</i>	S/e	
20	Viet.	Vietnam	<i>C. canephora</i>	S/e	

S/e: Sin especificar

Tabla 12. Especificaciones de la planta de café empleada en la experimentación

Abrev.	Nombre de la muestra	Origen	Especie	Variedad	Imagen
Oro	Hoja de cafeto	Sierra Norte, Puebla	S/e	S/e	

S/e: Sin especificar

2.3.2 Extracción de ADN

Para extraer el ADN según el protocolo descrito por Sambrook, (2001) primero se tienen que lisar las células en presencia de detergentes (SDS). Posteriormente se trata con proteinasa k y se procede a la purificación del ADN a través de extracción con la mezcla fenol-cloroformo-álcohol isoamílico de las proteínas y los polisacáridos, precipitando posteriormente el ADN con etanol (Tabla 13).

Tabla13. Lista de reactivos, material y equipos empleados en la extracción de ADN.

Reactivos:	Materiales y equipos:
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Agua desionizada con pH 7 ❖ Solución de lisis (Tris base 50nM, EDTA 0.1M pH=8, SDS 0.5%) ❖ Enzima proteinasa K concentrada a 20mg/ml ❖ Mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico 25:24:1 ❖ Etanol al 70% frío 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Agitador vortex, Genie K-55-G ❖ Balanza analítica electrónica cole parmer PR410 Equipar 500mg ❖ Calentador para tubos eppendorf Termoblock ❖ Espátulas ❖ Juego de Micropipetas ❖ Microcentrífuga, Mminispin plus eppendorf 1400rpm ❖ Mortero ❖ Vaso de precipitados 100 ml ❖ Papel filtro

Los granos de café verde se remojaron 24 hrs antes de la extracción (**Figura 17**), retirando el embrión del grano una vez que este se suavizó tras el remojo (**Figura 18**), se maceraron los embriones con el mortero añadiendo 100µL de agua libre de nucleasas, toda la muestra macerada se colocó en un tubo eppendorf para añadirle posteriormente 1250 µL de solución de lisis y se agitó con el vortex para facilitar el rompimiento celular, se añadieron 7 µL de enzima proteinasa K y se incubaron los tubos a 50°C en el termoblock durante 2 horas, una vez transcurrido este tiempo se elevó la temperatura a 60°C por 1 hora para la inactivación de la enzima. Luego se adicionaron al tubo con la muestra 250 µL de la mezcla fenol-cloroformo-alcohol isoamílico agitando suavemente el tubo, se centrifugó después a una velocidad de 10 000 rpm, durante un tiempo de 10 minutos y a temperatura ambiente. Una vez centrifugado, se separaron las fases, recuperando la fase acuosa que se encontraba en la parte superior del tubo eppendorf que es la que contenía el ADN. Se trasladó la fase recuperada a un tubo eppendorf nuevo donde se añadieron 1000 µl de etanol frío y se mezcló suavemente. Se centrifugó nuevamente a 10 000 rpm durante 10 min, se decantó el etanol y se dejaron secar los restos en el termoblock a 37°C. Una vez que el etanol fue eliminado, se añadieron 50 µL de agua libre de nucleasas para

resuspender el ADN y se agitó suavemente hasta su completa disolución. Mientras dichas muestras no se emplearon estas se mantuvieron en congelación a -20°C.



Figura 17. Remojo de los granos de café.

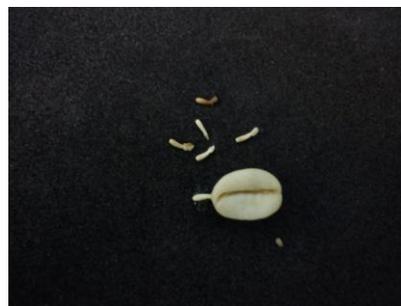


Figura 18. Obtención de embriones.

2.3.3 Cuantificación de la concentración y pureza de ADN

La concentración del ADN se puede estimar utilizando un espectrofotómetro de luz ultravioleta (UV) a una longitud de onda de 260 nm, debido a que las bases púricas y pirimidínicas del ADN tienen la propiedad de absorber la luz UV a esta longitud de onda. La determinación de la pureza del ADN se establece mediante la relación de las lecturas de absorbancia a 260 y 280 nm. Es así como una unidad (u) de densidad óptica (DO) a 260 nm equivale a 50 µg/mL de ADN de doble cadena, a 40 µg/ml de ARN y ADN de cadena simple, y a 20 mg de oligonucleótidos. Las preparaciones puras de ADN y ARN tienen una relación de DO 260/280 nm de 1.8 a 2.0. La relación de absorbancia a 260 nm se utiliza como prueba de contaminación de una preparación de ADN y ARN con proteínas puesto que los aminoácidos aromáticos absorben luz a 280 nm (Puerta & Ureña, 2005).

Tabla14. Lista de reactivos, material y equipos empleados en la cuantificación de ADN

Reactivos	Materiales y equipos
❖ Muestras de ADN del material biológico extraídas	❖ Espectrofotómetro, Abccesolab NanoDrop ND-1000 A113
❖ Agua libre de nucleasas	❖ Micropipeta
	❖ Tubos eppendorf

Para la calibración del equipo se colocaron 2 μl de agua libre de nucleasas en el brazo del equipo. Se utilizó el programa "Nanodrop", seleccionando la opción de ácidos nucleicos, colocando nuevamente 2 μl de agua libre de nucleasas y se tomó el registro como blanco. Se corrió el programa, secando el brazo del equipo cuando terminó de correr. Luego para la cuantificación de ADN se colocaron 2 μl del ADN a cuantificar y se corrió el programa. Se registró la relación 260/280 y la concentración en $\text{ng}/\mu\text{L}$ que nos otorgó el equipo al hacer la lectura. Se limpió nuevamente el equipo para poder proceder a la siguiente lectura de ADN.



Figura 19. Nanodrop ND-1000 A113.

2.3.4 PCR

Como ya fue mencionado la PCR es una estrategia de amplificación "in vitro" de moléculas específicas de DNA. Una reacción de PCR consta típicamente de 20 a 30 ciclos idénticos, y cada ciclo consta a su vez de tres fases: desnaturalización, alineamiento y elongación.

Tabla15. Lista de reactivos, material y equipos empleados en la PCR.

Reactivos	Materiales y equipos
<ul style="list-style-type: none"> ❖ Kit Promega para PCR que contiene: <ul style="list-style-type: none"> -Agua libre de nucleasas -PCR Master Mix (50 unidades de Taq DNA polimerasa, 400μM de cada dNTP y 3n de MgCl_2) ❖ Primers 	<ul style="list-style-type: none"> ❖ Termociclador <i>Apollo</i> ATC401 CLP ❖ Micropipetas ❖ Tubos eppendorf

Todos los primers empleados se solubilizaron a una concentración de 25mM.

- Primers para café

Los primers empleados para conocer la presencia de *Coffea arabica* o *Coffea canephora* se obtuvieron de Spaniolas *et al.*,(2006) (**Tabla 16**). Estos primers están diseñados de modo que la región intragenica tmL-tmF del ADN de cloroplasto que contiene el sitio de restricción de la endonucleasa *Psu I* se encuentre localizado en este sitio de amplificación (ANEXO 1).

Tabla 16. Pareja de primers empleada para La diferenciación entre especies de café.

Primer	Secuencia	Amplificado esperado
Frontal (5' a 3')	AATCGATCTGGACGAAAAGC	251 pb
Reverso (5' a 3')	AGCATCCTCATTATGAGAAAAGG	

- Primers para CaMV y T-NOS

Los primers seleccionados para la amplificación de estos fragmentos fueron obtenidos de Karamollaoglu *et al.*,(2009).

Tabla 17. Pareja de primers empleados para la identificación de eventos transgénicos.

Primer	Secuencia	Amplificado esperado
CaMV Frontal (5' a 3')	GCTCCTACAAATGCCATCA	195 pb
CaMV Reverso (5' a 3')	GGATAGTGGGATTGTGCGTC	
T-NOS Frontal (5' a 3')	GAATCCTGTTGCCGGTCTTG	180 pb
T-NOS Reverso (5' a 3')	TTATCCTAGTTGCGCGCTA	

En un tubo para PCR se colocaron los reactivos siguiendo el protocolo que indica Promega para el uso del kit para PCR (**Tabla 18**). Una vez que se prepararon los tubos con los reactivos necesarios se llevó a cabo la reacción de PCR en el Termociclador, programado en función de los primers empleados y de las diferentes muestras.

Tabla 18. Componentes necesarios para la reacción de PCR.

Reactivo	Cantidad (µL)
PCR Master Mix	12.5
Primer Frontal	0.5
Primers Reverso	0.5
ADN	1
Agua libre de nucleasas	La necesaria para completar 25 µL
Total	25µL

2.3.4.1 Programas de PCR

2.3.4.1.1 Café

La programación del termociclador se realizó de acuerdo a la revisión bibliográfica (Spaniolas *et al.*, 2006) y se modificó de acuerdo a los resultados obtenidos (Tabla 19 y Figura 20), quedando de la siguiente manera:

Tabla 19. Ciclos, temperaturas y tiempos del programa de PCR para *C. arabica* y *C. canephora*.

Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	Desnaturalización inicial	95	4:00
40	Desnaturalización	94	0:45
	Hibridación	58	0:45
	Elongación	72	2:00
1	Elongación final	72	10:00
	Hold	4	∞

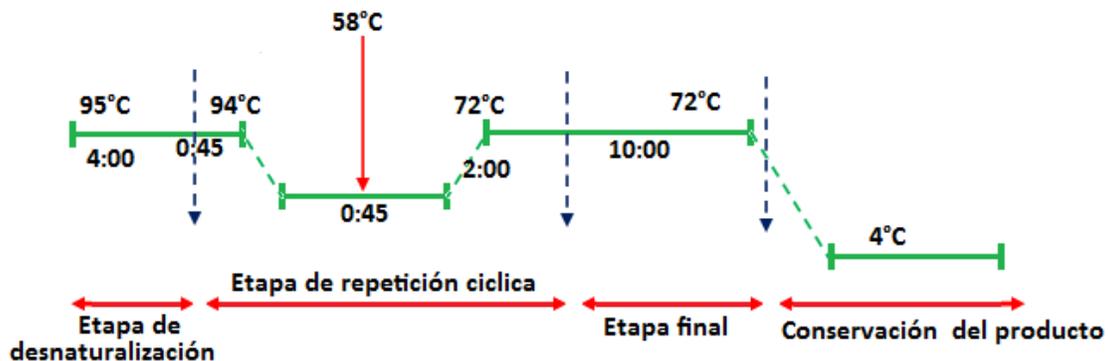


Figura 20. Programa de PCR para *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.

2.3.4.1.2 CaMV y T-NOS

El programa de PCR empleado (**Tabla 20 y Figura 21**) fue calculado a partir de las temperaturas medias (Tm) calculadas de cada primer, empleando una temperatura promedio de 60°C, ya que al realizar los cálculos se presentaron temperaturas inferiores y superiores a 60°C y al obtener un promedio la temperatura resultante fue de 59.5 °C, considerando elegir 60°C para la adecuada hibridación de los primers empleando 40 ciclos.

- Calculo de la temperatura de hibridación (Tm) de los primers para CaMV y T-NOS

$$Tm = (4(\text{número de Guaninas} + \text{número de Citocinas})) + (2(\text{número de Adeninas} + \text{número de Timinas}))$$

CaMV

Frontal: $(4(2+7)) + (2(6+4))=56^{\circ}\text{C}$	}	Promedio: 59°C	}	Promedio: 59.5°C ≈ 60°C
Reverso: $(4(9+2)) + (2(3+6))=62^{\circ}\text{C}$				

T-NOS

Frontal: $(4(6+5)) + (2(2+7))=62^{\circ}\text{C}$	}	Promedio: 60°C
Reverso: $(2(4+5)) + (2(3+8))=58^{\circ}\text{C}$		

Tabla 20. Ciclos, temperaturas y tiempos del programa de PCR para CaMV y T-NOS

Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	Desnaturalización inicial	94	5:00
40	Desnaturalización	94	2:00
	Hibridación	60	1:00
	Elongación	72	1:00
1	Elongación final	72	5:00
	Hold	4	∞

pero la calidad de los amplificaaados obtenidos para café es baja. Los reactivos de la reacción de PCR directa se nombran a continuación (Tabla 22).

Tabla 22. Reactivos empleados en la reacción PCR Directa.

Reactivo	Cantidad (µL)
Agua libre de nucleasas	8.3
2X Phire Plant PCR Buffer	10
Primer frontal	0.4
Primer reverso	0.4
Phire Hot Start II DNA polymerase	0.4
AND	0.5
Total	20

2.3.4.3.1 Programa para PCR directo

Las recomendaciones otorgadas por la empresa Thermo Scientific para la utilización de este kit y con las que se obtuvieron los amplificados fueron las siguientes con 30 ciclos (Tabla y Figura 23):

Tabla 23. Ciclos, temperaturas y tiempos del programa de PCR directo.

Ciclos	Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1	Desnaturalización inicial	98	5:00
30	Desnaturalización	98	0:15
	Hibridación	58	0:15
	Elongación	72	0:15
1	Elongación final	72	5:00
	Hold	4	∞

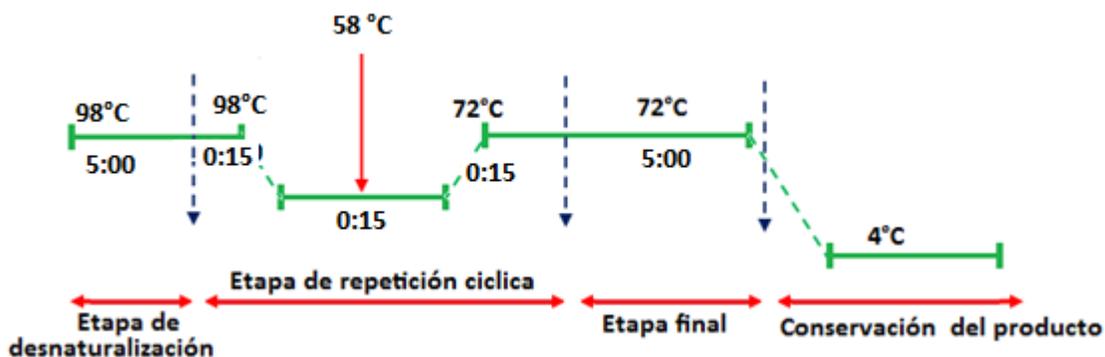


Figura 23. Programa de PCR empleado en la PCR directa.

2.3.5 Electroforesis en gel de agarosa para visualizar los productos de PCR

La electroforesis en gel de agarosa es un método bastante utilizado para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. Dado que el ADN está cargado negativamente debido a los grupos fosfato de la molécula, la migración en la cámara de electroforesis ocurre del polo negativo hacia el polo positivo a través del gel de agarosa (**Figura 24**). Una vez terminada la electroforesis, la visualización de las moléculas de ADN se logra mediante la tinción con bromuro de etidio (Puerta & Ureña, 2005).



Figura 24. Dirección de la migración del ADN en la cámara de electroforesis.

Tabla 24. Reactivos, material y equipo para la electroforesis y visualización del gel.

Reactivos	Material y equipo
❖ Agarosa	❖ Cámara y cassette de electroforesis
❖ Tris acetato y EDTA (TAE) 1X como solución buffer, pH=8	❖ Fotodocumentador Cleaver Scientific Ltd.
❖ Bromuro de etidio (BrEt)	❖ Fuente de calor (microondas)
❖ Marcador de peso molecular	❖ Micropipetas
❖ Tinte cargador blue/orange 6X	❖ Parafilm
❖ Muestras de las reacciones de PCR	

Se pesaron 0.75 g de agarosa que sería necesario para preparar el gel a una concentración de 2.5% añadiendo 30 ml de TAE 1X, se calentó en el microondas aproximadamente 1 minuto evitando que esta ebuliera. Se agregó una gota de BrEt y se agitó levemente para homogeneizar vaciando después la solución de agar al cassette de electroforesis colocando el peine. Una vez que solidificó se retiró el peine, se colocó el cassette en la cámara de electroforesis y se agregó la solución amortiguadora TAE 1X a la cámara.

Se colocaron en el parafilm 3 μ l de la muestra de la reacción de PCR, 3 μ l de tinte blue/orange 6X y 3 μ l de BrEt y se cargó la muestra ya homogeneizada en un pozo del gel de agarosa.

Se repitieron los pasos con el resto de las muestras así como con el marcador de peso molecular y se encendió la fuente de poder programada a 60V.

Para visualizar la fluorescencia del gel:

Se colocó el gel en la cámara del fotodocumentador con cuidado y se encendió el fotodocumentador y la cámara fotográfica posteriormente la lámpara de luz UV. Se tomó la fotografía y se guardó el archivo.

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

“Cuando bebemos café, las ideas marchan como un ejército”

Honoré Balzac

3.1 RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA EXTRACCIÓN DE ADN EN MUESTRAS DE CAFÉ

El protocolo descrito por Sambrook, (2001) se logró estandarizar para la extracción de ADN de los granos de café verde. Inicialmente se intentó la extracción empleando los granos de café fragmentados, sin obtener resultados favorables debido a la gran cantidad de pigmentos que se liberaban durante la extracción, causados por los compuestos fenólicos presentes en los granos así como por la clorofila, estos pigmentos interferían en las lecturas del espectrofotómetro alterando los valores de la relación de absorbancia. Posteriormente se utilizaron únicamente los embriones del grano para la extracción, esta parte del grano contenía la cantidad suficiente de ADN para la cuantificación logrando así obtener un ADN más puro y con el cual se pudo trabajar posteriormente. La extracción de ADN para la hoja de cafeto se hizo con el protocolo normal, pulverizando y extrayendo, sin un remojo previo como en el caso de los granos. Las diluciones se hicieron tratando de ajustar la concentración a 60-50 ng/μL o lo más cercano posible (**Tabla 25**).

Tabla 25. Cuantificación de Concentración de ADN y relaciones de absorbancia en muestras de café verde en grano y la hoja.

Número	ADN Concentrado		ADN Diluido	
	260/280	ng/μL	260/280	ng/μL
1	1.60	1914.6	1.51	83.1
2	1.59	1706.8	1.47	57.6
3	1.64	1683.9	1.55	84.9
4	1.69	2476.8	1.51	82.3
5	1.60	1833.8	1.50	84.1
6	1.51	1199.9	1.59	53.6
7	1.66	1972.2	1.56	114.7
8	1.42	81.5	1.42	56.1
9	1.50	103.2	1.48	57.4
10	1.55	83.3	1.56	54.7
11	1.65	69.7	s/d	s/d
12	1.64	61.5	s/d	s/d
13	1.66	51.8	s/d	s/d
14	1.60	65.6	s/d	s/d
15	1.43	63.5	s/d	s/d
16	1.65	60.2	s/d	s/d

17	1.72	1484.1	1.50	59.4
18	1.69	1281.8	1.57	60.8
19	1.62	998.7	1.51	56.7
20	1.67	1103.4	1.53	58
Oro	1.25	222.5	1.28	34.5

*s/d: sin diluir

3.2 ESPECIFICIDAD DE LOS PRIMERS Y OBTENCIÓN DE CONTROLES POSITIVOS PARA EVENTOS TRANSGÉNICOS

Los primers elegidos como ya se mencionó en el Capítulo II tanto para café y para las secuencias de CaMV y T-NOS fueron obtenidos de artículos científicos (Spaniolas *et al.*, 2006) y (Karamollaoglu *et al.*, 2009) que muestran su empleo y funcionamiento, se buscó la existencia de dichos primers en la base de datos bioinformática Gene-bank del NCBI (resultados que se muestran en el ANEXO 2) logrando corroborar la existencia de dichas secuencias en las bases de datos así como poder seleccionar el programa de PCR correspondiente a cada pareja de primers (Figuras 20 y 21) y el tamaño de los amplificados que se esperaban obtener con cada pareja de primers durante la experimentación.

3.2.1 Especificidad de primers de café

- Concentración de ADN por absorbancia del material biológico

El ADN empleado para conocer la especificidad de los primers de café se obtuvo bajo el mismo protocolo descrito por Sambrook, (2001); Se obtuvieron las siguientes lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro con el ADN ya diluido (Tabla 26). El control positivo (C+) empleado para la detección del café fue el café verde en grano número 1 (ver tabla 10 y 25).

Tabla 26. Cuantificación de concentración de ADN de material biológico para especificidad.

ADN Muestra	Relación 260/280	ng/μL
C+	1.51	83.1
Soya	1.78	125.1
Tomate verde	1.67	52.4
Chile verde	1.70	62.0
Papaya	1.66	48.9
Bovino	1.84	78.6

- Especificidad en primers de café

La especificidad de los primers de café se corroboró realizando una reacción de PCR con ADN extraído de diferentes especies vegetales y animales (**Tabla 26**) con el programa para PCR descrito anteriormente (**Figura 20**) para asegurar que estos no hibridaran con ninguna de las otras especies empleadas de las cuales cuatro son filogenéticamente cercanas y una filogenéticamente lejana (bovino), constatando que efectivamente son específicos ya que sólo amplifican para café verde mostrando un amplificado de 251 pb y logrando así obtener un control positivo para café verde (**Figura 25**).

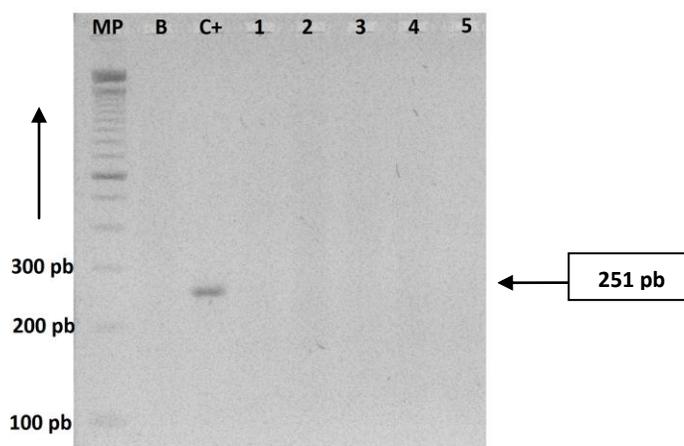


Figura 25. Especificidad de los primers de café. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb, **B:** Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+:** café verde número 1; **1:** soya; **2:** Tomate verde; **3:** Chile verde; **4:** Papaya y **5:** Bovino. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5µl de producto de la PCR.

3.2.2 Control positivo para eventos transgénicos.

- Concentración de ADN por absorbancia del evento transgénico de maíz.

Para el control positivo que nos confirma la presencia de un evento transgénico se empleó un evento transgénico de maíz (**Figura 26**), este evento contiene el promotor del transcripto **35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35S)** así como la secuencia 3' no codificante para la poliadenilación del gen **nos (T-NOS)**, ambas secuencias fueron identificadas mediante la extracción

de ADN del evento con el método de Sambrook (2001), las lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro del ADN ya diluido fueron las siguientes:

Tabla 27. Cuantificación de Concentración de ADN del evento transgénico de maíz por absorbancia.

ADN Muestra	Relación 260/280	ng/ μ L
Evento transgénico de maíz	2.04	63.6

- PCR especificidad de los primers de CaMV y T-NOS

Posteriormente se corroboró la presencia de dichos fragmentos mediante la aplicación de la PCR con el programa descrito anteriormente (**Figura 21**), obteniendo un amplificado de 195 pb para el promotor CaMV 35S y un amplificado de 180 pb para el gen *nos* (**Figura27**), corroborando así que estos primers son útiles para la identificación de OGM como se menciona en el artículo de Karamollaoglu *et al.*, (2009).

Existen eventos transgénicos de maíz autorizado desde el año 2002 en México (COFEPRIS, 2013) ejemplos de un organismos modificados genéticamente en circulación.



Figura 26. Granos del evento transgénico de maíz empleados para la extracción de ADN.

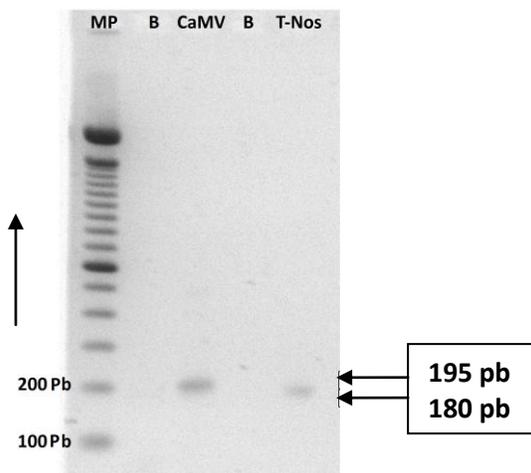


Figura 27. Especificidad de los primers que identifican un OGM. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **CaMV**: Amplificado que identifica la presencia del gen CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor en el evento transgénico de maíz, **T-NOS**: Amplificado que identifica la presencia del gen *nos* en el evento transgénico de maíz. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

3.3 DIFERENCIACIÓN ENTRE ESPECIES *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.

3.3.1 Identificación del género *Coffea*

Con el ADN de café verde extraído anteriormente (Tabla 25) se llevó a cabo la reacción de PCR (Figura 20) a todas las muestras de café empleadas, con la cual al obtener un amplificado de 251 pb estamos demostrando que las muestras son pertenecientes al género *Coffea* (Figuras 28, 29, 30, 31 y 32).

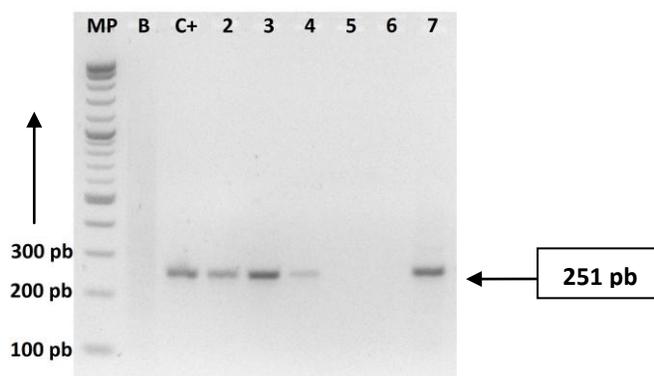


Figura 28. PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde 1. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb, **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+**: ADN de café verde número 1 empleado como control positivo; **2, 3, 4, 5, 6, 7**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde ver Tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

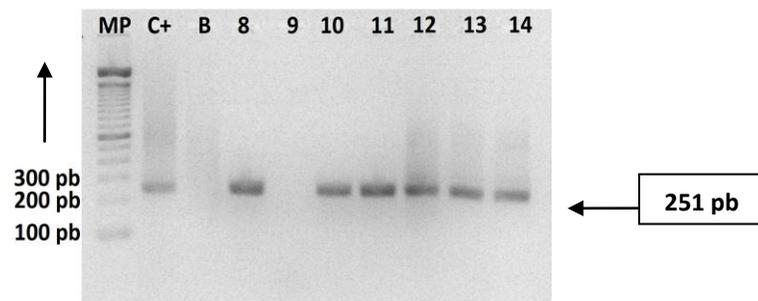


Figura 29. PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde 2. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb, **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+**: ADN de café verde número 1 empleado como control positivo; **8, 9, 10, 11, 12, 13, 14**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional ver Tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

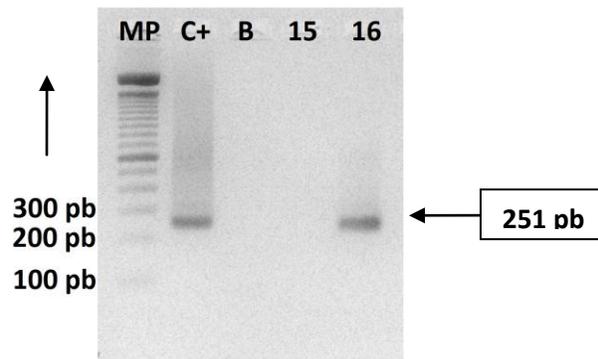


Figura 30. PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde 3. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb, **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+**: ADN de café verde número 1 empleado como control positivo; **15 y 16**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional ver Tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

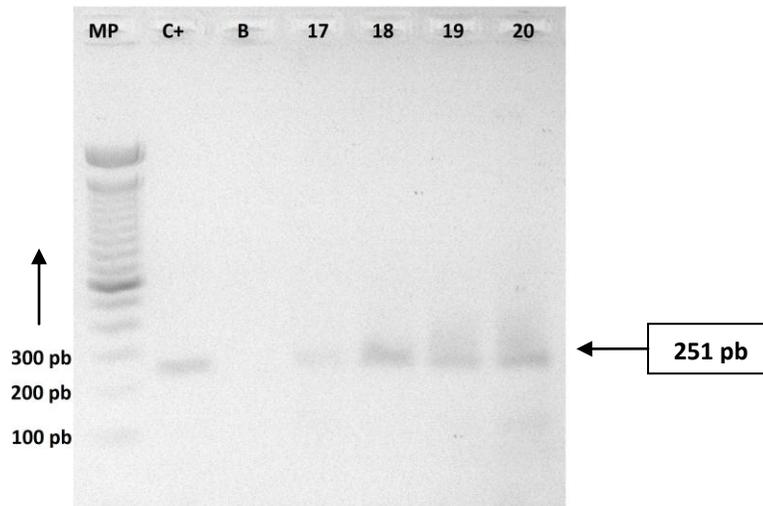


Figura 31. PCR que identifica el género *Coffea* en granos de café verde importado. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+**: ADN de café verde número 1 empleado como control positivo; **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **17, 18, 19 y 20**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde importado ver Tabla 11. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

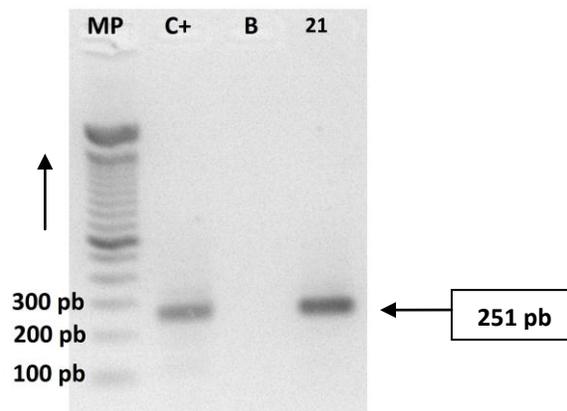


Figura 32. PCR que identifica el género *Coffea* en hoja de cafeto. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+**: ADN de café verde número 1 empleado como control positivo; **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **21**: ADN correspondiente a la hoja de cafeto ver Tabla 12. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

3.3.1.1 PCR-RFLP. Control positivo para diferenciación entre especies de *Coffea arabica* y *Coffea canephora*.

La diferenciación entre estas dos especies se llevó a cabo cortando con la enzima de restricción *Psu I* que como ya se dijo antes, esta corta en el sitio de restricción de la región intergénica *tmL-tmF* del ADN de cloroplasto de *Coffea canephora* pero que está ausente en la especie *Coffea arabica* (ver ANEXO 1), esto permite obtener una clara diferenciación entre estas dos especies ya que el corte se dará únicamente en la especie robusta mostrando dos amplificados uno de 159 pb y otro de 92 pb y quedando igual para arábica con 251 pb (Figura 33). Para esta prueba se tomó el ADN pertenecientes al café verde número 1 (Tabla 10) que se tiene como control positivo y que a su vez está reportado como *Coffea arabica* y para el *Coffea canephora* se tomó como control positivo el café verde número 20 reportado como robusta, se eligió este debido a que uno de los principales países productores de café robusta es Vietnam (Tabla11).

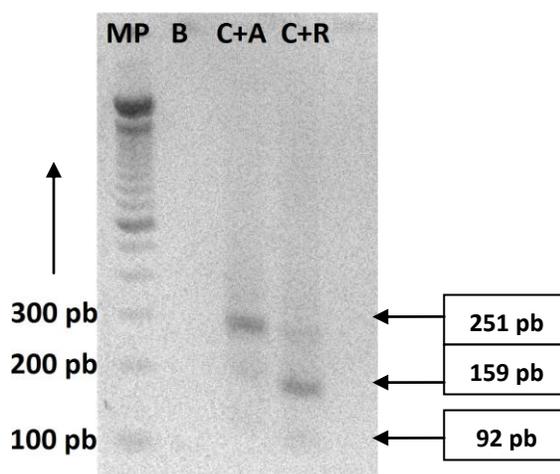


Figura 33. Controles positivos para *Coffea arabica* y *Coffea canephora*. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+A**: Amplificado que muestra la ausencia de corte con la enzima *PSU I* para la especie *Coffea arabica*, **C+R**: Amplificado que muestra la presencia del corte con la enzima *PSU I* para la especie *Coffea canephora*. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR-RFLP.

3.3.2 PCR directo

Posteriormente a las muestras que no amplificaron con el Kit de PCR Master Mix de Promega es decir 5, 6, 9 y 15 (Ver Figuras 28, 29 y 30), se sometieron al tratamiento con el Kit de PCR directa, este kit facilita la PCR debido a que no es necesario realizar la extracción de ADN, la primera vez se trató de hacer de esta manera, empleando únicamente el embrión del café para realizar la PCR directa, pero se tuvieron problemas pues no se logró el amplificado deseado, esto quizá pudo ser debido a que los mismos fenoles y pigmentos que contiene el café interfieren directamente con dicha reacción, por lo que se empleó el ADN ya extraído de los mismos embriones bajo el protocolo de Sambrook, (2001); Con esta modificación y siguiendo las recomendaciones de la empresa Thermo Scientific se logró la amplificación de las muestras restantes corroborando así que también son pertenecientes al género *Coffea*, aunque los amplificados obtenidos fueron de menor calidad, mostrando barridos al revelar el gel (Figura 34).

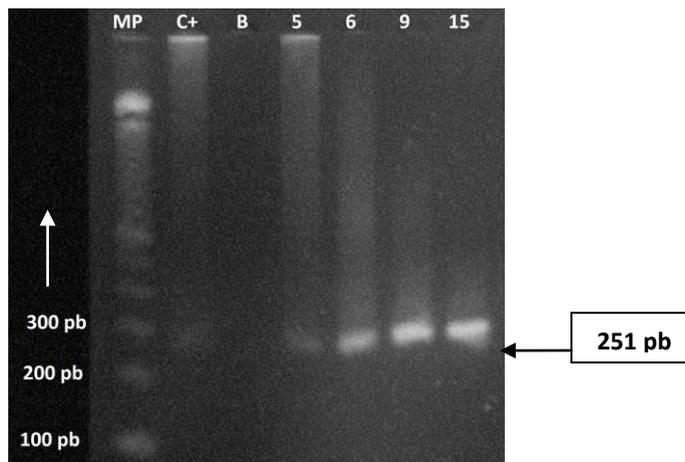


Figura 34. PCR directo que identifica el género *Coffea* en granos de café verde que no amplificaron con el Kit PCR Master MIX. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+**: ADN de café verde número 1 empleado como control positivo; **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **5, 6, 9 y 15**: ADN correspondiente a muestras de café verde ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR-RFLP.

3.3.2.1 PCR-RFLP Identificación de posibles híbridos.

El corte con la enzima PSU I se aplicó primero únicamente a las muestras que mostraron un amplificado: 2,3,4,7,8,10,11,12,13,14,16 para el café nacional (**Figura 35 y 36**), 17,18,19 y 20 para el café importado (**Figura 37**) así como también se le aplicó al producto de la PCR obtenido con el ADN de la hoja de cafeto (**Figura 38**) debido a que esto debe de realizarse de preferencia inmediatamente cuando se termina de hacer la PCR para evitar la degradación del ADN con el tiempo, de esta manera se asegura el funcionamiento adecuado de la enzima de restricción y así obtener resultados más confiables. Una vez que igual se logró la amplificación con PCR directa de las muestras faltantes inmediatamente se realizó el corte con la enzima PSU I obteniéndose los resultados mostrados en la **Figura 39** en la cual se puede observar de la misma manera que la **Figura 34** un corrimiento en el gel de muy baja calidad mostrando barridos.

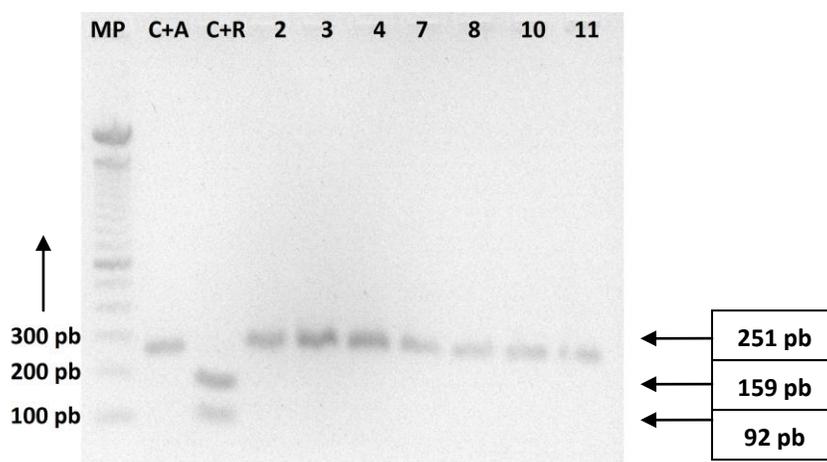


Figura 35. RFLP en granos de café verde 1. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+A:** ADN de café verde número 1 empleado como control positivo para *Coffea arabica*; **C+R:** ADN de café verde número 20 empleado como control positivo para *Coffea canephora*; **2, 3, 4, 7, 8, 10 y 11:** ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional, ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 µl de producto de la PCR-RFLP.

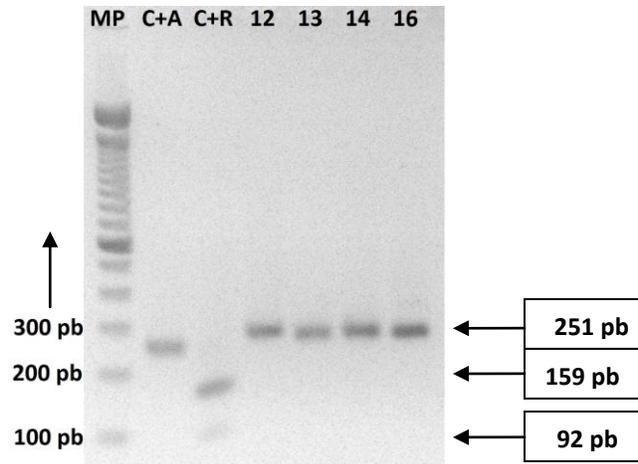


Figura 36. RFLP en granos de café verde 2. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+A:** ADN de café verde número 1 empleado como control positivo para *Coffea arabica*; **C+R:** ADN de café verde número 20 empleado como control positivo para *Coffea canephora*; **12, 13, 14 y 16:** ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional, ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR-RFLP.

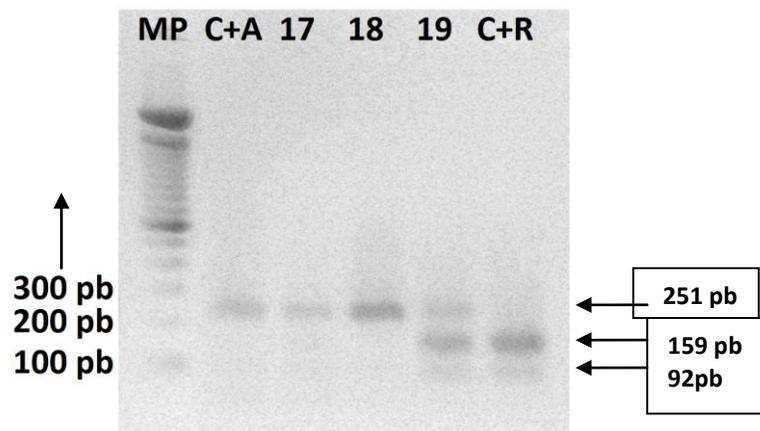


Figura 37. RFLP en granos de café verde 3. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+A:** ADN de café verde número 1 empleado como control positivo para *Coffea arabica*; **C+R:** ADN de café verde número 20 empleado como control positivo para *Coffea canephora*; **17, 18 y 19:** ADN de café verde correspondientes a granos de café verde importado, ver tabla 11. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR-RFLP.

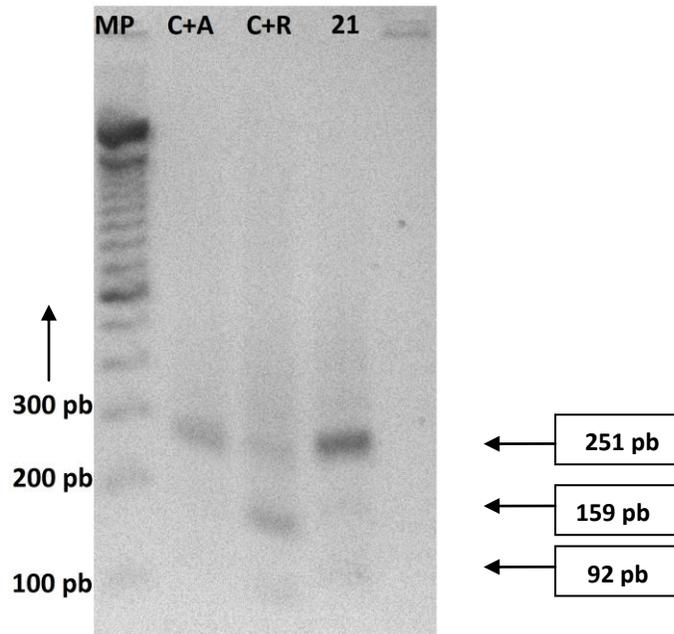


Figura 38. RFLP en hoja de cafeto. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+A:** ADN de café verde número 1 empleado como control positivo para *Coffea arabica*; **C+R:** ADN de café verde número 20 empleado como control positivo para *Coffea canephora*; **21:** ADN de correspondientes a hoja de cafeto, ver tabla 12. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR-RFLP.

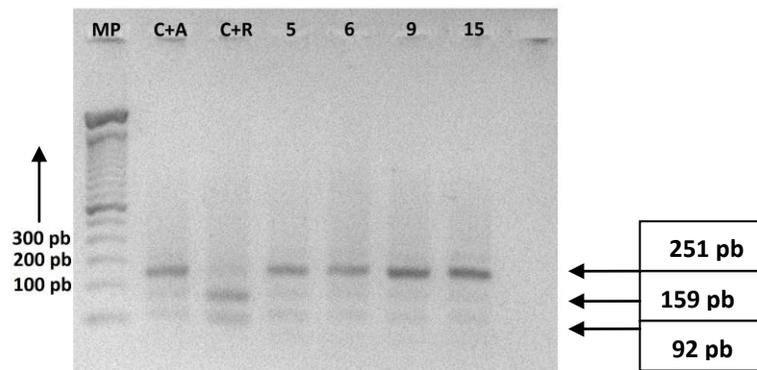


Figura 39. RFLP de los productos de la PCR directa. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb; **C+A:** ADN de café verde#1 empleado como control positivo de café arábica; **C+R:** ADN de café verde #20 empleado como control positivo de café robusta. **5, 6, 9 y 15:** ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR-RFLP.

El corte con la enzima nos revela que la información obtenida por parte de los productores no es del todo confiable debido a que algunas muestras 3, 5, 17 y 18 reportadas como especie *Coffea canephora* no presentan corte con la enzima, por tanto no podemos asegurar que pertenezca a esta especie, y a su vez se puede observar que la muestra 19 se trata de un organismo modificado genéticamente hablando de él como un híbrido y no de un transgénico, debido a que revela la presencia de ambas especies en ADN extraído, por lo que se tomó la decisión de extraer el ADN de un solo embrión y repetir el procedimiento únicamente de esta muestra para comprobar si en efecto se trataba de una hibridación entre ambas especies obteniendo los siguientes resultados:

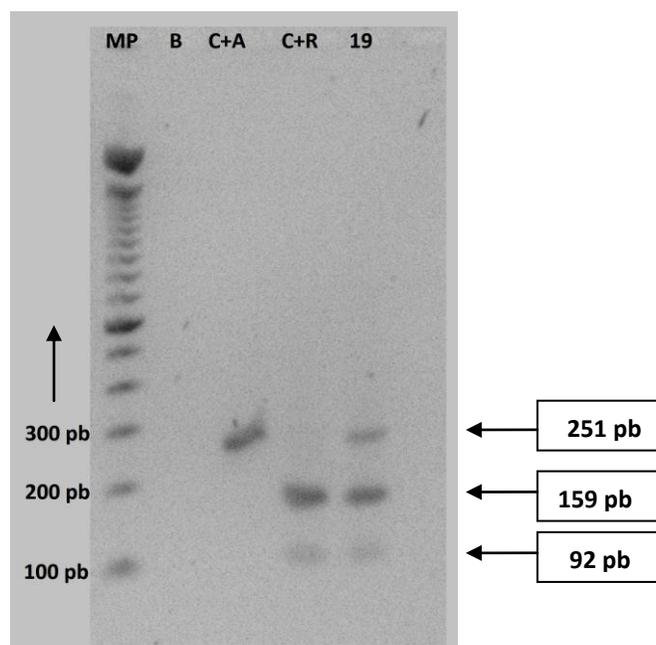


Figura 40. RFLP de muestra híbrida. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb; **B:** Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+A:** ADN de café verde número 1 empleado como control positivo de café arábica; **C+R:** ADN de café verde número 20 empleado como control positivo de café robusta; **19:** ADN de café verde importado de Indonesia. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5µl de producto de la PCR-RFLP.

3.4 PCR PARA IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES EVENTOS TRANSGÉNICOS

3.4.1 CaMV

Como es mencionado en el Capítulo I actualmente existen una gran variedad de experimentos que han logrado la modificación del café añadiendo genes ajenos a su estructura, por diversas razones y empleando diferentes métodos. Sin embargo a pesar de dichos experimentos estos eventos no han sido aprobados para su comercialización existiendo únicamente en invernaderos controlados, lo que nos hace suponer que no existe aún café transgénico circulando en el ambiente. En la **Tabla 8** se dan a conocer algunos de los ejemplos más sobresalientes y que han sido publicados desde el año de 1996. La decisión de emplear primers para identificar las secuencias del promotor CaMV 35S y para el terminador T-NOS, es debido a que ambos son ampliamente empleados en la generación de plantas transgénicas alrededor del mundo, aunque no siempre se emplean juntos estos siguen siendo los más comunes de encontrar en OGMs transgénicos. Se analizaron todas las muestras empleadas con los respectivos programas de PCR y empleando el control positivo correspondiente (**Figuras 41, 42, 43 y 44**).

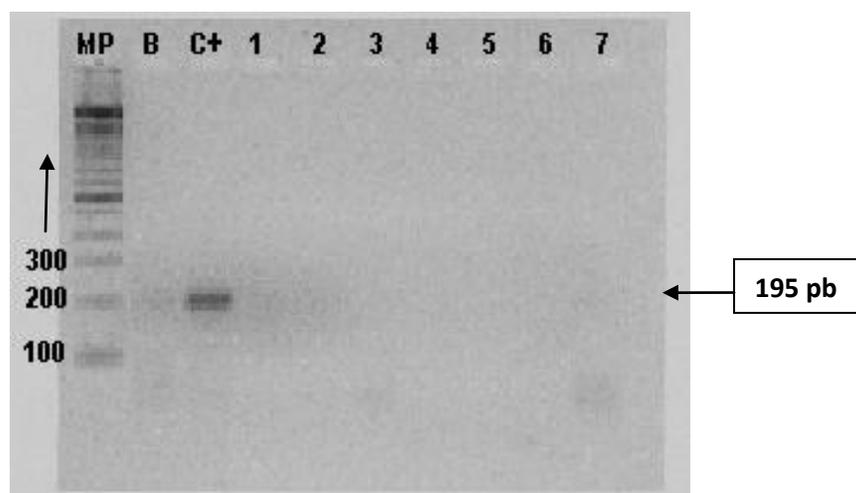


Figura 41. PCR que identifica el gen CaMV 35S en granos de café verde 1. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb, **B:** Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+:** ADN del evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7:** ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5µl de producto de la PCR.

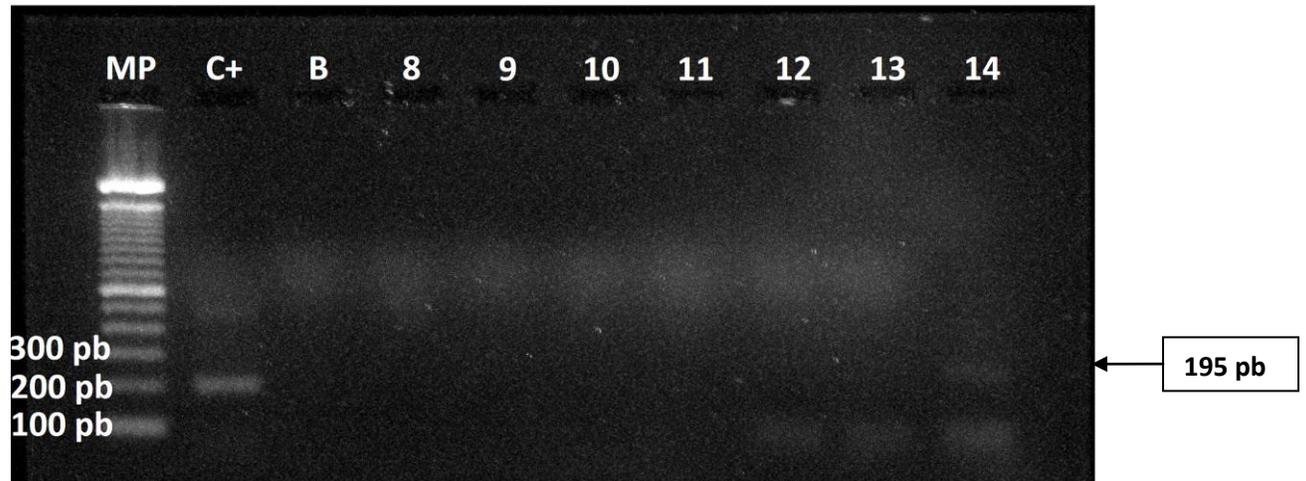


Figura 42. PCR que identifica el gen CaMV 35S en granos de café verde 2. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb, **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+**: ADN del evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5µl de producto de la PCR.



Figura 43. PCR que identifica la posible presencia del gen CaMV 35S en granos de café verde 3. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb, **B**: Muestra que no contiene ADN, Blanco; **C+**: ADN del evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **15 y 16**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional; **17, 18, 19 y 20**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde importado ver tabla 11. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5µl de producto de la PCR.

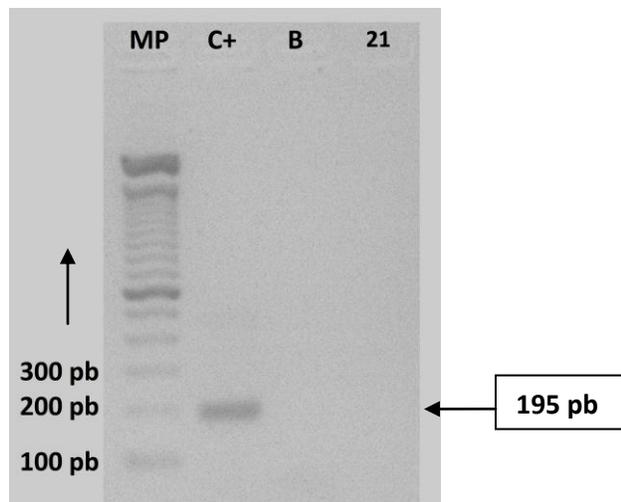


Figura 44. PCR que identifica la posible presencia del gen CaMV 35S en la hoja de cafeto. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb, **C+:** Amplificado que identifica la presencia del gen CaMV35S del virus del mosaico de la coliflor en el evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **B:** Muestra que no contiene ADN, Blanco; **21:** ADN de hoja de cafeto ver tabla 12. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

Los resultados arrojados por la PCR nos presentan la posible presencia de un café transgénico perteneciente a la muestra número 14 en la **Figura 42**, en donde claramente se puede observar un amplificado de 195 pb en el carril perteneciente a esta muestra, a pesar de que el amplificado no es con la misma intensidad que el control positivo no debía descartarse la posibilidad que se tratara de un transgénico liberado sin algún tipo de regulación o con previa autorización de los organismos correspondientes o una contaminación de la muestra. Por tal motivo se tomó la decisión de repetir la prueba para asegurar que no se haya tratado de una contaminación, se repitió por duplicado y esta vez ya no se obtuvo ningún amplificado, esto quiere decir que el amplificado mostrado en la **Figura 42** se trataba en efecto de una contaminación de la muestra y no de un transgénico.

3.4.2 T-NOS

De la misma manera se llevó a cabo el análisis de PCR para la identificación del gen *nos* (T-NOS), sin obtener ningún resultado positivo que afirmara la presencia de dicho terminador en alguna de las muestras analizadas, empleando el programa y el control positivo correspondiente (**Figuras 45, 46, 47 y 48**).



Figura 45. PCR que identifica la posible presencia del gen *nos* (T-NOS) en granos de café verde 1. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb, **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+**: ADN del evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

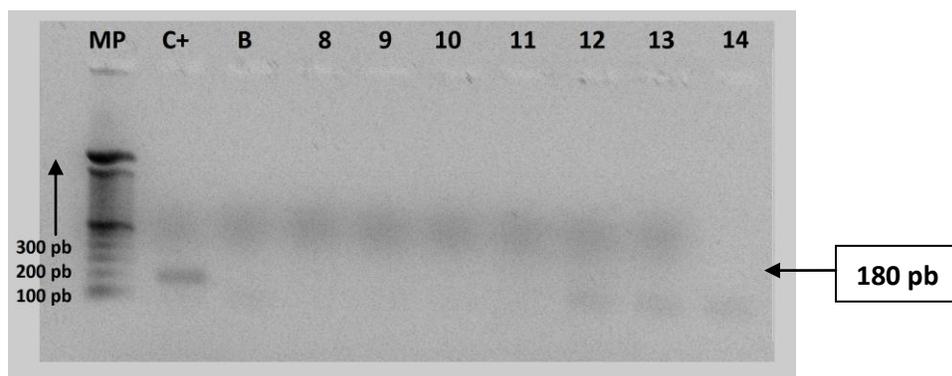


Figura 46. PCR que identifica la posible presencia del gen *nos* (T-NOS) en granos de café verde 2. Dónde **MP**: Marcador de peso molecular de 100 pb, **B**: Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+**: ADN del evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14**: ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional ver tabla 10. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

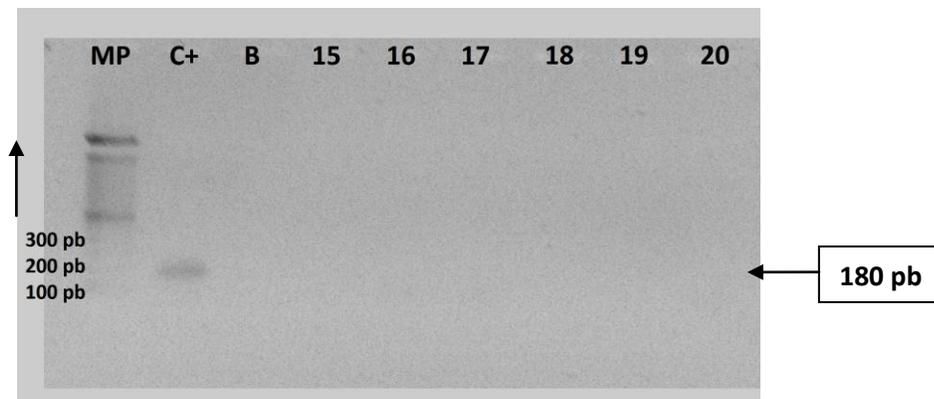


Figura 47. PCR que identifica la posible presencia del gen *nos* (T-NOS) en granos de café verde 3. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb, **B:** Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+:** ADN del evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **15 y 16:** ADN de café verde correspondientes a granos de café verde nacional; **17, 18, 19 y 20:** ADN de café verde correspondientes a granos de café verde importado ver tabla 11. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

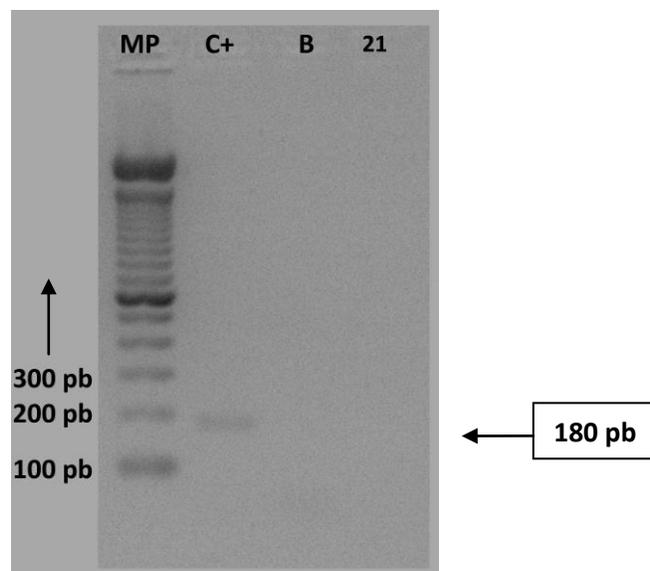


Figura 48. PCR que identifica la posible presencia del gen *nos* (T-NOS) en la hoja de cafeto. Dónde **MP:** Marcador de peso molecular de 100 pb, **B:** Blanco, muestra que no contiene ADN; **C+:** ADN del evento transgénico de maíz empleado como control positivo; **21:** ADN de hoja de cafeto ver tabla 12. Gel de agarosa al 2.5%, cada carril se cargó con 5 μ l de producto de la PCR.

CAPÍTULO IV

CONCLUSIONES

"Mientras haya café en el mundo, ¿qué tan mal pueden estar las cosas?"

Cassandra Clare

- El programa bioinformático empleado fue de gran ayuda para corroborar que las parejas de primers encontradas en la bibliografía realmente existieran reportadas en las bases de datos de genes y poder llevar a cabo la experimentación.
- El protocolo de extracción de ADN fue efectivo para las muestras de material biológico empleado en las pruebas de especificidad y se obtuvieron lecturas de concentración y pureza aptas.
- Se logró aislar y purificar el ADN del café verde del embrión del grano y así de esta manera se logró retirar la mayor parte de los pigmentos asociados y obtener lecturas de concentración y pureza aptas para la experimentación.
- La funcionalidad y especificidad de los primers seleccionados se corroboró exitosamente obteniéndose de manera adecuada las bandas que demostraban un amplificado correcto mediante PCR.
- Con metodología de PCR-RFLP se logró la identificación de un híbrido interespecífico, es decir dos especies pertenecientes al mismo género en el ADN de una de las muestras de café. La principal razón del desarrollo de híbridos interespecíficos es la mejora de los cultivos convencionales debido a que la especie *Coffea arabica* es altamente susceptible a plagas.
- En este trabajo se puede constatar que de las muestras analizadas ninguna se trató de un evento transgénico que pudiera contener la secuencia promotora CaMV o la secuencia terminadora T-NOS. Existen trabajos reportados del desarrollo de café transgénico en diferentes partes del mundo, pero en este momento aún siguen siendo pruebas de invernadero no liberadas.
- En el área de la cafecultura el hablar de un café genéticamente modificado no es hablar de un transgénico, sino más bien de las diferentes hibridaciones que se han desarrollado mediante biotecnología vegetal. Es muy necesario enfatizar esta aclaración debido a que en este ámbito es en verdad muy común escuchar el término: Café genéticamente modificado.

RECOMENDACIONES

"El café nos hace mal y es grave, pero nos hace filosóficos"

Jonathan Swift

- Al tratarse de café verde en grano se recomienda hacer la extracción directamente del embrión y así de esta manera se retirará la mayor parte de los pigmentos asociados y se obtendrán lecturas de concentración y pureza aptas para la experimentación.
- El trabajar con café o cualquier alimento que contenga colorantes naturales tan fuertes como los fenoles puede acarrear ciertas complicaciones siguiendo una metodología similar a la aquí descrita. Quizá el empleo de kits de extracción que permita la purificación adecuada del ADN sea recomendable ya que puede facilitar el uso de esta técnica con este tipo de alimentos.
- Para trabajos futuros se recomienda ampliamente la investigación de la metodología y conceptos básicos así como de todas las características del material biológico a analizar, esto facilitará las pruebas y por ende hará que la experimentación sea realmente rápida.
- El empleo de las técnicas basadas en el análisis de ADN, en este caso la PCR son de gran utilidad en el área de alimentos. La identificación de secuencias de genes ajenas a una especie o bien la presencia de ambas especies en un solo ADN nos da una clara idea de cómo es que esta técnica tiene diferentes usos basándose en una misma metodología.

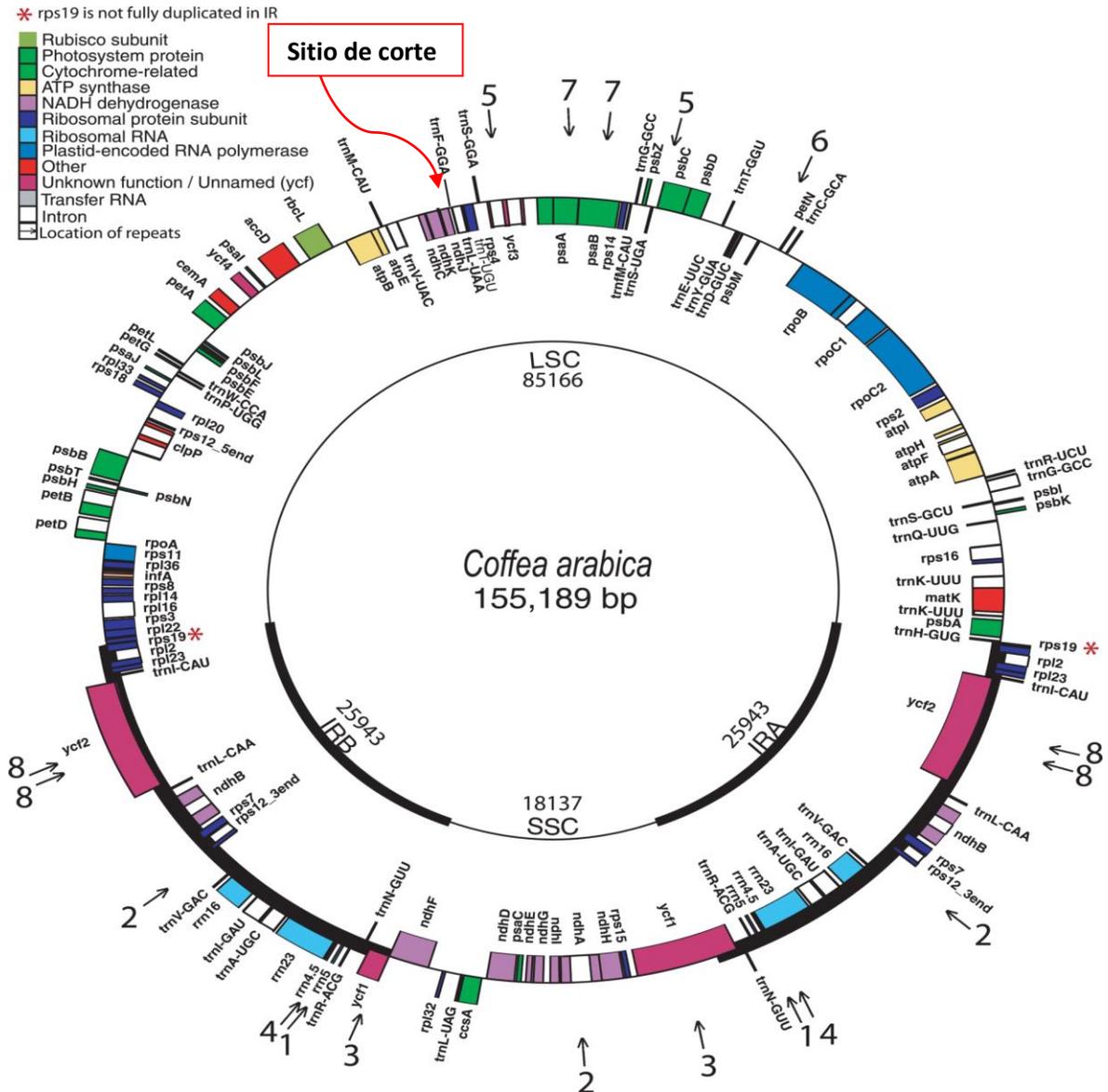
ANEXO

“El descubrimiento del café fue a su manera, tan importante como la invención del telescopio o del microscopio... Gracias al café se intensificaron y modificaron de una forma impredecible las capacidades y las actividades del cerebro humano.”

Heinrich Eduard Jacob

1. Genoma de cloroplasto de *Coffea arabica* L. y ubicación de la región intragenica tml-tmF, sobre la que actúa la endonucleasa de restricción PSU I

La secuencia del genoma del cloroplasto de *Coffea arabica* L. es el primer miembro de la cuarta familia más grande de las angiospermas las *Rubiaceas* en ser secuenciado. El genoma tiene 155 189 pb de longitud, incluyendo un par de repeticiones invertidas de 25 943 pb. De los 130 genes presentes, 112 son distintos y 18 están duplicados en la repetición invertida. La región de codificación comprende 79 genes de proteínas, 29 genes de ARN de transferencia, 4 genes de ARN ribosomal y 18 genes que contienen intrones (Samson *et al.*, 2007).



2. Empleo de Las bases de datos para corroborar la existencia de los primers reportados para café en la bibliografía.

- ❖ Búsqueda bibliográfica, ubicando la secuencia de primers. (Spaniolas *et al.*, 2006)

Authentication of Coffee by Means of PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis

STELIOS SPANIOLAS,[†] SEAN T. MAY,^{‡,¶} MALCOLM J. BENNETT,^{‡,¶} AND GREGORY A. TUCKER^{*,†,¶}

Division of Nutritional Sciences, Division of Plant Sciences, and Authentigene Ltd.,
School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough,
Leics LE12 5RD, United Kingdom

Table 2. PCR Primers Used in This Study

primer	5'-3' sequence	target	accession no.
Coffea1-F Coffea1-R	AATCGATCTGGACGGAAAAGC AGCATCCTCATTATTAGAGAAAAGG	<i>trnL-trnF</i> intragenic region of chloroplast DNA	CAU93387, CCU93393

- ❖ Acceder a la base de datos MITOMAP: www.mitomap.org

Accesar a la sección de Complete Mitochondrial Genome Sequences

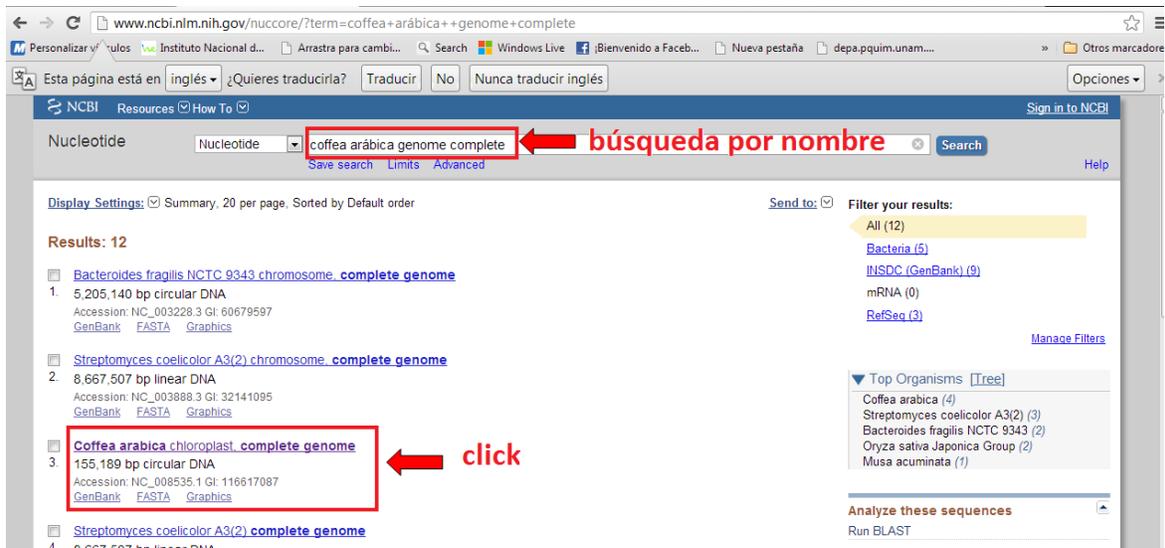
The screenshot shows the MITOMAP website interface. On the left, there is a navigation menu with options like 'Log In', 'Register', 'Reset Password', and 'Tools'. The main content area features the MITOMAP logo and a search bar. Below the header, there is a section titled 'MITOMAP Quick Reference' with instructions on how to search for point mutations and rCRS. At the bottom, a table lists 'General References' and 'Illustrations'. A red arrow points to the link 'Complete Mitochondrial Genome Sequences' in the General References table.

General References	Illustrations:
The Annotated Human Mitochondrial DNA Sequence	View Figures
The rCRS & other mtDNAs	-Mitochondrial DNA Map
Amino Acid Translation Tables	-Eleven pathological mutations in tRNA
Mitochondrial References. ALL (very large file) - A-L only - M-Z only	-Mitochondrial energetics
Haplogroup Markers & Frequencies Simpler mtDNA Tree: Europe, Asia, Africa	-Diabetes metabolism & the mitochondria
Mitochondrial DNA Function Locations (Gene Loci)	-World migrations
Mitochondrial DNA Polypeptide Assignments	-mtDNA Trees
Complete Mitochondrial Genome Sequences	

❖ Accesar a la base de datos de NCBI dando click en la liga



❖ Búsqueda del genoma completo de Coffea arabica.



❖ Búsqueda de las secuencias frontales y reversas de los primers reportados para asegurar la existencia de las secuencias.



❖ Búsqueda del primer frontal en dirección 5' a 3': AATCGATCTGGACGGAAAAGC

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_008535.1

Esta página está en **inglés** ¿Quieres traducirla? Traducir No Nunca traducir inglés

47821 atccggcttt cogaaccca agaaaggtt cagaagctga aaaaagata gttgcagaga
 47881 ctcaacggaa gctgtcttaa caaatggagt tggctgqgtt agtagagaaa tctttccatc
 47941 taaaattccg aaaggataaa gtgaaggata aacgtatata cgtattgaat actatattaa
 48001 atgattaatt agactcaaac tgaatctgta ttttttatat aaaaatggaa gaattgtgtg
 48061 gaatgatttc cacattgaag aaagatcga atattcattg atcaaatgat tcaactcaata
 48121 gctgataga tottttcaag aatgattaa tccgaagaga ataaagatag agtccogtto
 48181 tacatgtcaa tgtggcaac aatgaattt atagtaagag gaaaatccgt cgaactttaa
 48241 aatcgtgagg gttcaagttc cttcatcccc aaaaacata ttgtatcccc caactattta
 48301 tccatcccco ctttcttag cgtttcaaaa aacotttatto atttactota ttctcttaga
 48361 aatcgatctg gacggaaaag cccctttctt atcaaaaatc ttgttttatt tatgatatac
 48421 atataaaaga acatotttga gaaagaata cccatttgaa tggtttcaaa tggatataac
 48481 tattcatact gaaacttaca aagtaactct ttttaagata caagaatctc tagtaacctag
 48541 ataaaatttt gcaatcccco ttccttcttt taattgacat agcccactc tctctataaa
 48601 atgaggatgc tacattggga ctggtgggga tagctcagat ggttagagag aggactgaaa
 48661 atccctgtgt caccagttoa aatctggttc ctggcaatg attaatttgt ataaactctc
 48721 cttgtataaa tcaattgata tgaatcgaca ttcataatta tagtttagat cataataaat
 48781 acatattgtt tccactctca cggagatata cccactctat ttatagatag gttgaactct
 48841 tttagataag gttctaaaa gaattagatt ctattctctc atcttttta ttctctcttc
 48901 tcttttgttc aaaaagaatg ttaatacttc atatatattc aaaaacata ttcaaggggt
 48961 taatttaatt ggttgagatc aaacttagag gaattgaaat acacagaga tacaataaaa
 49021 tagaactcaa tatctcttaa ttctctgta ttctctgta cttttagatt cgtctatctc
 49081 acttacataa ctttcaaaa ccccttaaat aatgtcgcta gtagaagtc aaaaactatg
 49141 atgtagaagt tcatctcttc tttctgtctc atctgagata agcatcttac aaaaacata
 49201 aatcggatgt aagaatacca acgaatctct catctgcttc ttctttgttc agcatcttac
 49261 agaatctcca atacaagag agactctcat atctctgctt aactctgagc agaaactata
 49321 atccctgaat atgtgaaatt gtataagag aaattagttt ctatctcttc aatgagatct
 49381 ttgtatttca taaaatttgg gagaacata atccttgctt aagggccatc ctatccaatc
 49441 tccagcaatt agactcctgt tcaagctggt atgattatca taagatcttc ccaactatcc
 49501 ataaagattc atcaaaagg agactctcat atctctgctt aactctgagc agaaactata
 49561 aggatctctc cttgagacaa atacttttat gcaactctct totgtttgat ctacacata
 49621 cctattcttc gtaagatgat atacaactag taacagctcc cgggttgcta catctatagc
 49681 gcaattggga cggagataat tgaactcata tacatataaa ataacagaa tagaattgca
 49741 atccctggac tttatttcta aagctcttat tctctgttaa tcaaaagcga aagactctatg
 49801 aatagcctca tctctgata ccaagcaga caaacgaccc tgaatctttt tttctctccc
 49861 catattttta ttgtattaa gtattt
 49921 atttgtaca aagaataact gttctaa tctgt aagtaaaagt agatgcccgt tgaataagga
 49981 atttgaaaaa tgtttcagt tctgt aagtaaaagt agatgcccgt tgaataagga

AATCGATCTGGACGGAAAAGC Find 1 of 1 NC_008535 : 48361-48381

Introducción de la secuencia

❖ Búsqueda del primer reverso en dirección 5' a 3': CTTTTTCTCATAAAATGAGGATGCT

www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_008535.1

Esta página está en **inglés** ¿Quieres traducirla? Traducir No Nunca traducir inglés

47821 atccggcttt cogaaccca agaaaggtt cagaagctga aaaaagata gttgcagaga
 47881 ctcaacggaa gctgtcttaa caaatggagt tggctgqgtt agtagagaaa tctttccatc
 47941 taaaattccg aaaggataaa gtgaaggata aacgtatata cgtattgaat actatattaa
 48001 atgattaatt agactcaaac tgaatctgta ttttttatat aaaaatggaa gaattgtgtg
 48061 gaatgatttc cacattgaag aaagatcga atattcattg atcaaatgat tcaactcaata
 48121 gctgataga tottttcaag aatgattaa tccgaagaga ataaagatag agtccogtto
 48181 tacatgtcaa tgtggcaac aatgaattt atagtaagag gaaaatccgt cgaactttaa
 48241 aatcgtgagg gttcaagttc cttcatcccc aaaaacata ttgtatcccc caactattta
 48301 tccatcccco ctttcttag cgtttcaaaa aacotttatto atttactota ttctcttaga
 48361 aatcgatctg gacggaaaag cccctttctt atcaaaaatc ttgttttatt tatgatatac
 48421 atataaaaga acatotttga gaaagaata cccatttgaa tggtttcaaa tggatataac
 48481 tattcatact gaaacttaca aagtaactct ttttaagata caagaatctc tagtaacctag
 48541 ataaaatttt gcaatcccco ttccttcttt taattgacat agcccactc tctctataaa
 48601 atgaggatgc tacattggga ctggtgggga tagctcagat ggttagagag aggactgaaa
 48661 atccctgtgt caccagttoa aatctggttc ctggcaatg attaatttgt ataaactctc
 48721 cttgtataaa tcaattgata tgaatcgaca ttcataatta tagtttagat cataataaat
 48781 acatattgtt tccactctca cggagatata cccactctat ttatagatag gttgaactct
 48841 tttagataag gttctaaaa gaattagatt ctattctctc atcttttta ttctctcttc
 48901 tcttttgttc aaaaagaatg ttaatacttc atatatattc aaaaacata ttcaaggggt
 48961 taatttaatt ggttgagatc aaacttagag gaattgaaat acacagaga tacaataaaa
 49021 tagaactcaa tatctcttaa ttctctgta ttctctgta cttttagatt cgtctatctc
 49081 acttacataa ctttcaaaa ccccttaaat aatgtcgcta gtagaagtc aaaaactatg
 49141 atgtagaagt tcatctcttc tttctgtctc atctgagata agcatcttac aaaaacata
 49201 aatcggatgt aagaatacca acgaatctct catctgcttc ttctttgttc agcatcttac
 49261 agaatctcca atacaagag agactctcat atctctgctt aactctgagc agaaactata
 49321 atccctgaat atgtgaaatt gtataagag aaattagttt ctatctcttc aatgagatct
 49381 ttgtatttca taaaatttgg gagaacata atccttgctt aagggccatc ctatccaatc
 49441 tccagcaatt agactcctgt tcaagctggt atgattatca taagatcttc ccaactatcc
 49501 ataaagattc atcaaaagg agactctcat atctctgctt aactctgagc agaaactata
 49561 aggatctctc cttgagacaa atacttttat gcaactctct totgtttgat ctacacata
 49621 cctattcttc gtaagatgat atacaactag taacagctcc cgggttgcta catctatagc
 49681 gcaattggga cggagataat tgaactcata tacatataaa ataacagaa tagaattgca
 49741 atccctggac tttatttcta aagctcttat tctctgttaa tcaaaagcga aagactctatg
 49801 aatagcctca tctctgata ccaagcaga caaacgaccc tgaatctttt tttctctccc
 49861 catattttta ttgtattaa gtattt
 49921 atttgtaca aagaataact gttctaa tctgt aagtaaaagt agatgcccgt tgaataagga
 49981 atttgaaaaa tgtttcagt tctgt aagtaaaagt agatgcccgt tgaataagga

CTTTTCTCATAAAATGAGGATGCT 1 of 1 NC_008535 : 48587-48611

Introducción de la secuencia

❖ Identificación del tamaño de la secuencia de amplificación

www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/116617087?report=genbank&to=155189

```

47821 atccggcttt ccgaaccocaa aggaaggctt cagaagctga aaaaagata ggtgagaga
47881 ctcaacggaa gctgttota ccaatggagt tggotgctt agtagagaa totttccatc
47941 taaaattccg aaaggataaa gtgaagata aacgtatata cgtattgaat acatatttaa
48001 atgattatcg acgactaac tgaactgta tttttatata aaaaatgaa gaattggtgt
48061 gaatagactc cacattgaag aaagaatcga atattcattg atcaaatgat tcaatccata
48121 gtctgataga tottttaag aattgataa tggagcaga ataaagatg agtccogtct
48181 tacatgcoa tgtggcaac aatgaaatt atagtaagag gaaaatcogt cgaattttaa
48241 aatgtgag gttcaagtc cttatcccc aaaaacata tttgctccc caactattta
48301 tccatcccc ctttggttag oggttcaaaa aacottatto atttactota ttctcttaga
48361 aaatogctctg gaaggaaaag cccttttctt atcaaaatc ttgtgttatt tatgatatac
48421 atataaatga acatcttga gcaagaata cccattttaa tggtttaca tcatataaac
48481 tcttcaactc gaaacttaca aagtaacttt ttttaagata caagaatct tagtaactga
48541 ataaaatttt gaaatccctt tccctcttct taattgacat agccccttct ttctctttaa
48601 atcaaatctc tacatcttga cggctggga tagctagat ggttagcag agaatctaaa
48661 atccctgctc caccagttca atctgtctc ctggacatg ataaatctt ataatctct
48721 ctgtataaa ttaattgata tgaatgaca ttcatttta tagtttagat caataaaat
48781 acatattgtt tccacttca gogagata cccatctat tttatagat ggtagaactt
48841 tttagataag gtatctaaa gaattagat ctattcttct atcttttct ttctctctct
48901 totttgtct aaaaagaatg ttaactctc atatatctc aaaaagata tcaagggtt

```

Secuencia a amplificar 251 pb

Empleo de Las bases de datos para corroborar la existencia de los primers reportados para CaMV y para T-NOS en la bibliografía.

❖ Búsqueda bibliográfica, ubicando la secuencia de primers. (Karamollaoglu *et al.*, 2009)

Biochemical Engineering Journal 44 (2009) 142–150

Contents lists available at ScienceDirect

Biochemical Engineering Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bej

QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)

İrem Karamollaoglu^a, Hüseyin Avni Öktem^a, Mehmet Mutlu^{b,*}

^a Middle East Technical University, Department of Biological Sciences, Plant Biotechnology Lab., İnönü Bulvarı, 06531 Ankara, Turkey
^b Hacettepe University, Engineering Faculty, Plasma Aided Bioengineering and Biotechnology (PABB) Research Group, Eskişehirli Yolu Beytepe, 06532 Ankara, Turkey

2.2.2. PCR product amplification

CaMV 35S and T-NOS PCR products were amplified from plant transformation plasmid vector pTJK136. CaMV 35S promoter region and T-NOS terminator region specific sense and antisense primers were purchased from MVG Biotech AG (Ebersberg, Germany) and Iontek Inc. (Istanbul, Turkey). The base sequences of primers are reported below [26]:

CaMV 35S sense: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3'
 CaMV 35S antisense: 5'-GGATAGTGGGATTGCGCTC-3'
 T-NOS sense: 5' GAATCCTGTGCCGGCTTG 3'
 T-NOS antisense: 5' TTATCCTAGTTGCGCGCTA 3'

- ❖ El procedimiento para la ubicación de las secuencias es el mismo que se describió anteriormente.
- ❖ Una vez verificada la secuencia, se debe de obtener la secuencia en formato FASTA.

Para posteriormente ser analizada emparejando los primers en el programa Sequencher 4.1.4.



The screenshot shows a web browser window displaying the NCBI GenBank entry for the Coffea arabica chloroplast, complete genome (NC_008535.1). The page title is "Coffea arabica chloroplast, complete genome". Below the title, there are links for "FASTA" and "Graphics". A red arrow labeled "click" points to the "FASTA" link. The main content of the page is a text-based record for the sequence, including fields such as LOCUS, DEFINITION, ACCESSION, VERSION, DBLINK, KEYWORDS, SOURCE, and ORGANISM.

```
NCBI Reference Sequence: NC_008535.1
FASTA Graphics
LOCUS       NC_008535                155189 bp    DNA    circular    F01 26-MAR-2010
DEFINITION  Coffea arabica chloroplast, complete genome.
ACCESSION  NC_008535
VERSION   NC_008535.1  GI:114617087
DBLINK    Project: JGI
          BioProject: PRJNA10517
KEYWORDS  .
SOURCE    chloroplast Coffea arabica (coffee)
ORGANISM  Coffea arabica
           Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;
           Asterids; Vascular plants; Magnoliopsida; Rosales; Rubiales;
           Rubiaceae; Rubiaceae; Rubiaceae; Rubiaceae; Rubiaceae
```

BIBLIOGRAFÍA

*“Una buena taza de su negro licor, bien preparado, contiene tantos problemas y tantos poemas
como una botella de tinta”*

Rubén Darío

- **Alvarado Soto, M., & Rojas Cubero, G. (2007).** “Cultivo y beneficiado del café”. San José, Costa Rica: Universidad Estatal a Distancia.
- **Aranguren-Méndez, J., Portillo, M., Ruiz, J., Villasmil-Ontiveros, Y., Yáñez, L., Borjas, L., y otros. (2009).** “Identificación de especies en productos de origen animal mediante PCR”. *Revista Científica, FCV-LUZ*, 19(2),159 - 164.
- **Bartlett, J. M. (2003).** “PCR Protocols”. Totowa, NJ.: Humana Press.
- **Belitz, H.D. (2009).** “Food Chemistry “(4ta. edición). Berlin , Alemania: Springer.
- **Benítez, Burraco Antonio (2005),** “Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas” . Barcelona, España: Reverté.
- **Cankar, K., Chauvensy-Ancel, V., Fortabat, M.-N., Gruden, K., Kobilinsky, A., Zel, J., y otros. (2008).** “Detection of nonauthorized genetically modified organisms using differential quantitative polymerase chain reaction: application to 35S in maize”. *Analytical biochemistry* , 376: 189-99.
- **Colín, A. S. (1990).** “El Cultivo del cafeto en México”. México: Instituto Mexicano del Café.
- **Cubero, J. I. (2002).** “Introducción a la mejora genética vegetal” (2da. ed.). Madrid, España: Mundi-prensa S.A.
- **De Los Santos-Briones, C., & Hernández-Sotomayor, T. (2006).** “Coffee biotechnology”. *Brazil Journal of Plant Physiology* 18(1):217-227.
- **Duce, A. M. (2005).** “Patología quirúrgica”. Madrid, España: El Sevier.
- **Ferreira Ribas, A., Protasio Pereira, L. F., & E. Vieira, L. G. (2006).** “Genetic transformation of coffee”. *Brazil Journal of Plant Physiology* , 18 (1): 83-94.
- **García Garibay, M., Quintero Ramírez, R., & López-Munguía Canales, A. (2004).** “Biotecnología alimentaria”. México DF: Limusa.
- **Gutiérrez Prieto, Sandra Janeth, Acosta Gómez Adriana Paola, Agudelo M., Carlos Mario y otros. (2006).** “Fundamentos de ciencias básicas aplicadas a la odontología”. Bogotá, Colombia: Pontificia Universidad Javeriana
- **Haarer, A. E. (1982).** “Producción moderna de café” (2da. ed.). México: Continental S.A de C.V.

- **Hernández, Á. G.** (2010). "Tratado de nutrición. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos". Madrid, España: Editorial Médica Panamericana.
- **Herrera, I. S.** (1993). "Manual del cultivo del café". Quevedo, Ecuador: INIAP.
- **Holden, M. J., Levine, M., Scholdberg, T., Haynes, R. J., & Jenkins, G. R.** (2010). "The use of 35S and Tnos expression elements in the measurement of genetically engineered plant materials". *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396(6):2175-2187.
- **Hui, Y.H., Khachatourians George G.** (1995) "Food Biotechnology: microorganisms", EUA; John Wiley & Sons Inc.
- **Karamollaoglu, I., Avni Öktem, H., & Mutlu, M.** (2009). "QCM-based DNA biosensor for detection of genetically modified organisms (GMOs)". *Biochemical Engineering Journal* , 44: 142-150.
- **Kempken, Frank ; Jung, Christian;.** (2010). "Genetic Modification of Plants. En J. M. Widholm, H. Lörz, & T. Nagata, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* " (Vol. 64, pág. 675). Berlin, Alemania: Springer.
- **Kole, C.** (2007). "Technical Crops". Berlin, Alemania: Springer-Verlag.
- **Luthy, J.** (1999). "Detection strategies for food authenticity and genetically modified foods". *Food control* , 10: 359-361.
- **Mariotti, E., Minunni, M., & Mascini, M.** (2001). "Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection". *Analytica Chimica ACTA* , 453(2): 165–172.
- **Mussatto, S. I., S. Machado, E. M., Martins, S., & Teixeira, J. A.** (2011). "Production, Composition, and Application of Coffee". *Food Bioprocess Technology* , 4(5): 661-672.
- **Pimentel Peñalosa, E., Ortiz Muñiz, A. R., & Breña Valle, M.** (2006). "Tópicos de genética". México: UAEM.
- **Prado, E. E.** (1993). "El café cereza en México: tecnología de la producción". México: Universidad Autónoma Chapingo.
- **Puerta B., C. J., & Urueña P., C. P.** (2005). "Prácticas de biología molecular". España: Pontificia Universidad Javeriana.
- **Ramírez, F. D.** (2011). "Cultivo del café". Colombia: Grupo latino editores S.A.S.

- **Rogg**, H. W. (2001). “Manual: manejo integrado de plagas de cultivos de la Amazonia Ecuatoriana”. Venezuela: IICA.
- **Sambrook**, J. y. (2001). “Molecular cloning. A laboratory Manual”. EUA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- **Samson**, N., Bausher, M. G., Seung-Bum, L., Jansen, R. K., & Daniell, H. (2007). “The complete nucleotide sequence of the coffee (*Coffea arabica* L.) chloroplast genome: organization and implications for biotechnology and phylogenetic relationships amongst angiosperms”. *Plant Biotechnol journal* , 5(2): 339–353.
- **Segura**, M. A. (2004). “Adaptación al agroturismo de finca el potrero, ciudad vieja, scatepéquez”. Tesis de arquitectura. Guatemala, Guatemala: Universidad Francisco Marroquín.
- **Souza**, R. M. (2008). “Plant-Parasitic Nematodes of Coffee”. Río de Janeiro, Brazil: Springer.
- **Spaniolas**, , S., May, S. T., Bennett, M. J., & Tucker, G. A. (2006). “Authentication of Coffee by Means of PCR-RFLP Analysis and Lab-on-a-Chip Capillary Electrophoresis”. *Journal of agricultural and food chemistry* , 54: 7466–7470.
- **Spiral**, J., Leroy, T., Paillard, M., & Petiard, V. (2000). “Transgenic Coffee (*Coffea* Species)”. En Y. Bajaj, *Biotechnology in Agriculture and Forestry* (pág. 325). Heidelberg, Berlin: Spriger.
- **Torrens**, D. B. (2011). “¿Para qué sirven los transgénicos?: todas las claves de una tecnología útil y controvertida”. Barcelona, España: Edicions Universitat Barcelona.
- **Wagner**, R. (2001). “Historia Del Cafe En Guatemala”. Bogotá, Colombia: Villegas y asociados.

RECURSOS ELECTRÓNICOS

- **ArgenBio**. Consejo Argentino para la información y el desarrollo de la Biotecnología, Maíz Evento MON810, (Consultado en línea el 25 de enero 2014 12:51p.m) <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=305>
- **EL BABLE** (Consultado en línea el 15 de noviembre de 2013 a las 10:37 a.m.). <http://vamosalbable.blogspot.mx/2012/10/breve-historia-de-la-llegada-del-cafe.html>

- **COFEPRIS** (2013). “Lista de evaluación de inocuidad caso por caso de los organismos genéticamente modificados (OGMs)” . (Consultado en línea el 10 de marzo de 2013 a las 18:39 p.m.)
<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/OGMS/Lista.aspx>
- **COFEPRIS** (2008).(Consultado en línea el 16 de marzo de 2013 a las 10:35 a.m.)
http://www.cofepris.gob.mx/AZ/.../protocolo_evaluacion_riesgo_ogms3.pdf
- **Eduardo Taylor Coffee** . “Proceso del café” (Consultado en línea el 22 de octubre de 2013 a las 15:00 p.m.)
<http://eduardotaylorcoffee.com/nuestro-cafe/proceso-del-cafe/>
- **El informador**. “El café mexicano aumenta su ritmo exportador” (consultado 13 diciembre 2013 a las 17:00 p.m.).
<http://www.informador.com.mx/economia/2012/426337/6/el-cafe-mexicano-aumenta-su-ritmo-exportador.htm>
- Glosario de biotecnología para la agricultura y la alimentación (Consultado en línea el 20 de Diciembre del 2013 a las 17:45 p.m.)
<http://www.fao.org/docrep/004/y2775s/y2775s00.htm#Contents>
- **Infusionistas**. “Tueste casero de café” (Consultado en línea el 14 de noviembre de 2013^a las 17:50 p.m.).
<http://infusionistas.com/tueste-casero-de-cafe/>
- **International coffee organization**. (Consultado en línea el 15 de noviembre de 2013 a las 21:00 p.m.).
http://www.ico.org/ES/field_processingc.asp
- **SAGARPA** (2012). (Consultado en línea el 18 de Septiembre del 2013 a las 14:30 p.m.)
<http://www.sagarpa.gob.mx/agricultura/Documents/Cultivos%20Agroindustriales/Impactos%20Caf%C3%A9.pdf>
- **SAGARPA** (2011). (Consultado en línea el 18 de Septiembre del 2013 a las 12:15 p.m.):
<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B546.aspx>
- **Silverio, Z. I.** SENASICA. (Consultado en línea el 13 de noviembre del 2013 a las 22 :00)
<http://www.senasica.gob.mx/?id=4645>

– MITOMAP

<http://www.mitomap.org>

– nescafé.com, 2013

<http://nescafé.com.mx>

GLOSARIO DE TÉRMINOS

El café fuerte me resucita, me causa un escozor, una carcoma singular, un dolor que no carece de placer. Más me gusta entonces, sufrir que no sufrir”

Napoleón Bonaparte

- **ADN:** Abreviación de ácido desoxirribonucleico. Largo polímero de desoxirribonucleótidos. El ADN constituye el material genético de la mayoría de los organismos y orgánulos que se conocen; normalmente se encuentra formando una doble hélice, aunque algunos genomas virales contienen ADN de una sola cadena y otros, ARN de una o de doble cadena.
- **Anteras:** Parte del estambre de las flores donde se almacena el polen.
- **Bifurcado:** Dividirse en dos ramales, brazos o puntas.
- **Cápsida:** La cápsida vírica o cápside vírica es una estructura [proteica](#) formada por una serie de monómeros llamados [capsómeros](#). En el interior de esta cápside se encuentra siempre el material genético del [virus](#).
- **Cloroplasto:** Plasto especializado que contiene clorofila. Los cloroplastos, que poseen forma lenticular y están limitados por una doble membrana, contienen estructuras membranosas apiladas (tilacoides) rodeadas de una matriz gelatinosa (estroma). Constituyen los centros de transferencia de la energía solar y de algunas importantes reacciones involucradas en la síntesis de carbohidratos. Los cloroplastos tienen su propio ADN; estos genes se heredan solamente a través del progenitor femenino y son independientes de los genes nucleares.
- **Compuestos sápidos:** Sustancia que tiene algún sabor.
- **Corola:** Parte interna de la flor formada por un conjunto de pétalos.
- **Cruzamiento:** El proceso de selección y transmisión a futura generaciones de los rasgos deseados por ciertas plantas y animales. A través del proceso de hibridación t endogamia, los rasgos deseados pasan a futuras generaciones.
- **Cultivar:** Término aceptado internacionalmente para designar una variedad de plantas cultivadas. Debe poder distinguirse de otras variedades de su especie por determinadas características y retener sus caracteres distintivos cuando se reproduce bajo condiciones específicas.

- **Cultivo de haploides:** el desarrollo in vitro de Células u [organismos](#) con un solo complemento cromosómico, como sucede en los gametos tras la meiosis.
- **Cultivos de meristemos:** Cultivo de tejidos que contienen domos meristemáticos sin primordios foliares adyacentes o tejido de tallo. También puede referirse al cultivo de regiones meristemoides de plantas, o crecimiento meristemático en cultivo.
- **Electroforesis:** Método que permite separar moléculas de ADN y ARN en función de su tamaño. En este procedimiento, las muestras se someten a la acción de un campo eléctrico aplicado a un gel de agarosa.
- **Embriogénesis somática:** Proceso de diferenciación de embriones somáticos tanto de células de explantos (embriogénesis directa), como del callo generado por explantos (embriogénesis indirecta). *Sinónimo:* embriogénesis asexual.
- **Endonucleasa de restricción:** Clase de enzimas que cortan el ADN después de reconocer una secuencia específica. Los tres tipos de endonucleasas de restricción son: I. Las que producen el corte en una secuencia al azar a más de 1 kpb de la secuencia de reconocimiento y que tienen actividades de restricción y de metilación. II. Las que cortan dentro o cerca de una secuencia de reconocimiento corta, generalmente palindrómica. Otra enzima distinta metila la misma secuencia de reconocimiento. III. Las que cortan a 24-26bp secuencia abajo de una secuencia de reconocimiento corta y asimétrica, que requieren ATP y tienen actividades de restricción y de metilación. Las enzimas del tipo II son la que suelen utilizarse en la mayoría de las aplicaciones de la biología molecular.
- **Espacio intergénico:** ADN no codificante que separa copias en tándem de secuencias génicas repetidas (normalmente ADN ribosómico). Su interés radica en que, frente a las secuencias codificantes, los espaciadores muestran altos niveles de polimorfismo de secuencia y, por lo tanto, son útiles como herramientas en los análisis de identificación de especies.

- **Especie:** Grupo de individuos capaces de entrecruzarse, pero que están aislados reproductivamente de otros grupos con los que tienen muchas características en común. Se trata de una clasificación a veces arbitraria o imprecisa, pero todavía bastante útil en muchas situaciones.
- **Especificidad:** En pruebas diagnósticas, capacidad de una sonda de reaccionar de forma precisa y específica con su molécula diana.
- **Estigma:** Extremo receptor del estilo al cual se adhiere el polen.
- **Gen:** Unidad de herencia transmitida de generación en generación durante la reproducción sexual o asexual. El término se usa, de forma más general, en relación a la transmisión y herencia de caracteres específicos identificables. El gen más sencillo consta de un segmento de ácido nucleico que codifica una proteína individual o ARN.
- **Individuos clonales:** Grupo de células o de organismos genéticamente idénticos, originados a partir de una única célula u organismo por reproducción asexual, por división artificial de estados embrionarios iniciales o por trasplante nuclear. 2. Grupo de plantas genéticamente idénticas, obtenidas todas ellas por propagación vegetativa de un individuo seleccionado.
- **Ingeniería genética:** Tecnología que permite inducir cambios por transgénesis en el genotipo y, por tanto, en el fenotipo de un organismo.
- **Lóculos:** Cada uno de los compartimientos en que están encerradas las semillas de un fruto.
- **Mutagénesis:** Inducción de cambios heredables en la constitución genética de una célula a través de la alteración de su ADN.
- **OGM:** Organismo genéticamente modificado. Organismo transformado por la inserción de uno o más transgenes.
- **Organismos poiquiloterms:** Los poiquiloterms se caracterizan porque la temperatura de su cuerpo varía con la del ambiente. Se les llama también animales de "sangre fría". A este grupo pertenecen los animales invertebrados y además los peces, anfibios y reptiles.

- **Organogénesis:** Formación de tallos adventicios o *de novo*, o de raíces a partir de cultivos de callo, de meristemos o en suspensión.
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa. Una de las técnicas más utilizadas de la biología molecular que permite la producción de millones de copias (amplificación) de una secuencia específica de ADN, siempre que se conozca la secuencia de pares de bases de cada extremo del ADN diana. Supone la aplicación de varios ciclos que incluyen desnaturalización de ADN, hibridación del cebador y extensión de la cadena de ADN, y requiere una ADN polimerasa termoestable, desoxirribonucleótidos, y oligonucleótidos específicos (cebadores).
- **Pirolisis:** Descomposición de un compuesto por la acción del calor.
- **Poliadenilación:** Adición post-transcripcional de múltiples residuos de adenina al extremo 3' del ARNm eucariótico. También se denomina prolongación poli(A). El segmento terminal 3' rico en adenina se conoce como cola poli(A).
- **Polimerasa** Enzima que cataliza la formación de polímeros a partir de monómeros. Una ADN polimerasa sintetiza ADN a partir de desoxinucleósidos trifosfato utilizando una hebra de ADN complementario y un cebador. Una ARN polimerasa sintetiza ARN a partir de ribonucleósidos trifosfato y una hebra de ADN complementario.
- **Primers:** Oligonucleótido de tamaño pequeño que, al hibridar con un molde de ADN de una hebra, le proporciona una estructura bicatenaria a partir de la cual, la ADN polimerasa sintetizará una nueva hebra de ADN para producir una molécula dúplex.
- **Proteína recombinante:** Proteína codificada por un gen clonado.
- **Protoplastos:** Célula bacteriana o vegetal de la que se ha eliminado la pared celular por un procedimiento químico o enzimático, dejando su citoplasma rodeado por una membrana periférica. Los protoplastos son esféricos y más pequeños que las células angulares, alargadas y normalmente vacuoladas de las que proceden.
- **Quintales:** Quintal es una unidad de masa que se utilizaba en la antigüedad. De acuerdo al contexto, un quintal podía resultar equivalente a 100 libras o a 100 libras castellanas.

Esto quiere decir que un quintal equivalía a unos 46 kilogramos.

- **Regeneración de plantas:** Crecimiento de nuevos tejidos u órganos para reemplazar los dañados o perdidos. En cultivos de tejidos vegetales, la regeneración se refiere al desarrollo de órganos o plántulas a partir de un explanto.
- **RFLP:** Expresión alternativa para secuencia polimórfica amplificada y cortada. Segmento de ADN que contiene un polimorfismo y que puede amplificarse por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Después de la ampliación por PCR de un locus, el amplicón se trata con una endonucleasa de restricción. Si el sitio de reconocimiento de esta enzima se encuentra en el amplicón, se generan dos o más fragmentos de restricción. De este modo la variación de secuencia entre individuos en el sitio de reconocimiento puede detectarse por electroforesis. *Véase también:* polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción.
- **Taq-Polimerasa:** ADN polimerasa termoestable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, muy utilizada en PCR.