

# OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CAFÉ MEDIANTE BIOBALÍSTICA CON EL GEN REPORTERO GUS

## OPTIMIZATION OF PARAMETERS FOR GENETIC TRANSFORMATION BY BIOLISTIC OF COFFEE WITH GUS REPORTER GENE

Zoraya De Guglielmo Cróquer<sup>1</sup>, Rafael Fernandez Da Silva<sup>2</sup>, Luis Hermoso Gallardo<sup>3</sup>, Illimar Altosaar<sup>4</sup> y Andrea Menéndez Yuffá<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética-Instituto de Oncología y Hematología-Universidad Central de Venezuela zdegugli@gmail.com. <sup>2</sup>Laboratorio de Biotecnología Aplica-Departamento de Biología-Universidad de Carabobo rfernandez2@uc.edu.ve. <sup>3-5</sup>Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal- Instituto de Biología Experimental- Universidad Central de Venezuela andrea.menendez@ciens.ucv.ve.

### RESUMEN

Se evaluaron diferentes parámetros involucrados en la transformación de café por biobalística. Estos parámetros incluyeron tipo de explante, distancia entre el dispositivo portador de las micropartículas y el tejido blanco, presión de helio y tiempo de disparo. Explantes de *Coffea arabica* cv. Catimor fueron bombardeados con micropartículas de tungsteno cubiertas con ADN del plásmido pCAMBIA3201 contentivo del gen reportero *gus* o *uidA* (glucuronidasa, GUS). La respuesta de los explantes al bombardeo fue observada en medio sólido de regeneración con o sin pre-incubación en medio líquido suplementado con ácido naftaleno acético. Las condiciones óptimas de bombardeo se determinaron sobre la base de la expresión transitoria del gen reportero *gus* y la supervivencia y velocidad de regeneración del material bombardeado. Los mejores resultados en cuanto a expresión *gus*, supervivencia y regeneración de café fueron obtenidos utilizando embriones tipo torpedo, 70 psi de helio, distancia de 14 cm e incubación directa en medio sólido de los embriones somáticos, sin pre-incubación en medio líquido.

### ABSTRACT

Different parameters involved in the biolistic transformation of coffee were tested. These parameters included explants, distance between the microparticle device and the target tissue, helium pressure and shoot time. Explants of *Coffea arabica* cv. Catimor were bombarded with tungsten microparticles covered with DNA of the plasmid pCAMBIA3201 containing the visible reporter gene *gus* or *uidA* (glucuronidase, GUS). Response of explants to bombardment was observed on solid regeneration medium with or without pre-incubation in liquid medium supplemented with naphthalene acetic acid. The optimal conditions were determined through transient expression of the reporter *gus* gene, and the survival and regeneration rate of the bombarded material. The better values of *gus* expression, survival and regeneration of coffee were obtained using torpedo shape embryos, 70 psi of helium pressure, 14 cm distance and incubation of the bombarded somatic embryos directly on solid medium, without pre-incubation in liquid medium.

**Palabras clave:** café, transformación genética, biobalística, bombardeo de micropartículas, *gus*.

**Keywords:** Coffee, genetic transformation, biolistic, microparticle bombardment, *gus*.

---

## INTRODUCCIÓN

Las especies del género *Coffea*, en particular *C. arabica* y *C. canephora* son de gran importancia agronómica y comercial, por lo que han sido blanco de mejoramiento mediante la ingeniería genética en combinación con el mejoramiento tradicional, para obtener nuevos cultivares resistentes tanto a estrés bióticos como abióticos (Samson y col. 2007; De Guglielmo, 2009; De Guglielmo y col., 2009; Fernández y col., 2010). Los estudios de transformación genética de café se han llevado a cabo a través de métodos biológicos y físicos que incluyen *Agrobacterium*, electroporación y biobalística (Kumar y col. 2006a, b; Barton y col. 1991; da Cunha y col. 2004; Ribas y col. 2006; Hatanaka y col. 1999). Estos estudios pueden verse limitados por la disponibilidad de vectores adecuados de transformación que permitan el logro de los objetivos planteados en cuanto a resistencia frente a estrés biótico o abiótico, mejoramiento de las cualidades nutritivas, incremento del rendimiento o de la producción, etc., en combinación con la optimización de los parámetros involucrados y el monitoreo o seguimiento del producto del procedimiento utilizado. En tal sentido, Díaz y col. (2004) han señalado que las pruebas de estandarización son la base para la puesta a punto de un protocolo de transformación eficiente donde se ha maximizado la cantidad de células competentes en las que ocurren, de manera simultánea en una misma célula, tres procesos necesarios para obtener una planta transgénica: transferencia del transgén al interior de la célula, integración del transgén al ADN celular y regeneración de una planta completa en la que se verificaron los pasos anteriores. Esto es muy importante considerando que células y explantes de distinto genotipo, e incluso explantes diferentes de un mismo genotipo, tienen diferente

competencia o capacidad de respuesta para cada uno de los procesos mencionados.

El objetivo de este trabajo fue la estandarización de diferentes parámetros de transformación (presión de He, distancia de disparo y tipo de explante) de *Coffea arabica* cv. Catimor mediante biobalística, a través de la expresión transitoria del gen GUS y el porcentaje de sobrevivencia y regeneración de los explantes bombardeados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Material vegetal.** Se utilizaron embriones somáticos (torpedos y globulares), callo embriogénico y hojas de vitro plantas de *Coffea arabica* cv. Catimor. Este material fue obtenido a partir del sistema de cultivo *in vitro* de café por embriogénesis somática establecido por García y Menéndez (1987). Las condiciones de incubación de los explantes fueron a luz continua ( $12 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) y a una temperatura promedio de 24 °C.

**Aislamiento del ADN plasmídico.** Se trabajó con el plásmido pCAMBIA 3201 (en la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* como vector de clonación) desarrollado por el laboratorio de Biología Molecular del Medical Research Council, Cambridge-Inglaterra, y donado al Centro para la Aplicación de la Biología Molecular en la Agricultura Internacional (CAMBIA, siglas en inglés; [www.cambia.org](http://www.cambia.org)), el cual presenta al gen reportero *gus* o *uidA* bajo control de la secuencia promotora CAMV y el gen *bar* de la fosfinotricina el cual confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio. Este plásmido fue obtenido a través de la Dra. Ariadne Vegas (INIA, Maracay - Venezuela). El aislamiento del plásmido se realizó de células *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas según el

protocolo descrito por Chung y col. (1989). La purificación del plásmido se realizó mediante el sistema Wizard<sup>®</sup> Plus Midipreps DNA Purification System de PROMEGA.

**Biobalística.** Se utilizó una pistola a baja presión de Helio fabricada en el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC, ubicada en el “Laboratorio de Biotecnología Vegetal” del Instituto de Biología Experimental – UCV, donde ha sido empleada en trabajos previos. El procedimiento se basó en la metodología descrita por Klein y col. (1997; 1998). Los parámetros de transformación por biobalística evaluados fueron el tipo de explante (embriones

somáticos tipo torpedo y globular, callos embriogénico y hojas de vitroplantas), presión de helio (40, 70 y 180 psi), distancia de disparo de micropartículas de tungsteno entre el filtro y el explante (7 y 14 cm) y tiempo de disparo (0,1 y 0,3 s) (Tabla 1). El número de embriones, así como el área foliar y de callo se determinó previamente en ensayos de calibración con papel de filtro como material bombardeado y micropartículas limpias. Para cada uno de los explantes considerados se realizaron bombardeos (por duplicado) combinando con las distintas condiciones físicas a probar (presión de helio, distancia y tiempo de disparo), lo que representó un total de 96 bombardeos.

**Tabla 1.** Cálculo del número de embriones somáticos y el área de callo embriogénico y de hojas de vitroplantas a usar por cada bombardeo.

Presión (psi)	Distancia (cm)	Diámetro (cm)*	Área de cobertura por micropartículas (cm <sup>2</sup> )**	No. de embriones torpedo	No. de embriones globular
40	14	3.5	9.6	18	46
40	7	3.0	7.1	15	34
70	14	2.5	4.9	12	28
70	7	2.2	3.8	10	20
180	14	1.4	1.5	8	13
180	7	1.1	0.9	6	11

\* Diámetro de cobertura en el disparo de micropartículas bajo las condiciones de presión y distancia.

\*\* Área de bombardeo, calculado con el diámetro correspondiente.

**Regeneración del material bombardeado.** El 50 % del material bombardeado en cada caso fue colocado en medio MS líquido (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con 8 mg/l de ácido naftalenoacético ANA, bajo agitación suave (100 rpm) durante dos días y después fue transferido a medio sólido de germinación sin hormonas descrito en Hermoso y Menéndez (2000) (MS/2, 8 g/l de agar); el 50% restante fue colocado directamente en medio sólido de germinación sin hormonas.

**Evaluación de la efectividad del procedimiento de bombardeo.** Las condiciones más

eficientes de transformación por biobalística fueron determinadas mediante la tasa de supervivencia y regeneración de los tejidos bombardeados, así como por la expresión transitoria del gen *gus* de los mismos, evaluada histoquímicamente por la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (Jefferson y col., 1987), tomando una muestra de los explantes bombardeados 48 horas después de haber realizado los disparos. Se tomaron 2 ó 3 embriones torpedos, 10 embriones globulares y la mitad de la superficie de callo o de hoja. Como control positivo se utilizaron secciones foliares de plantas transgénicas de papa, portadoras del gen *gus*, mientras que como control

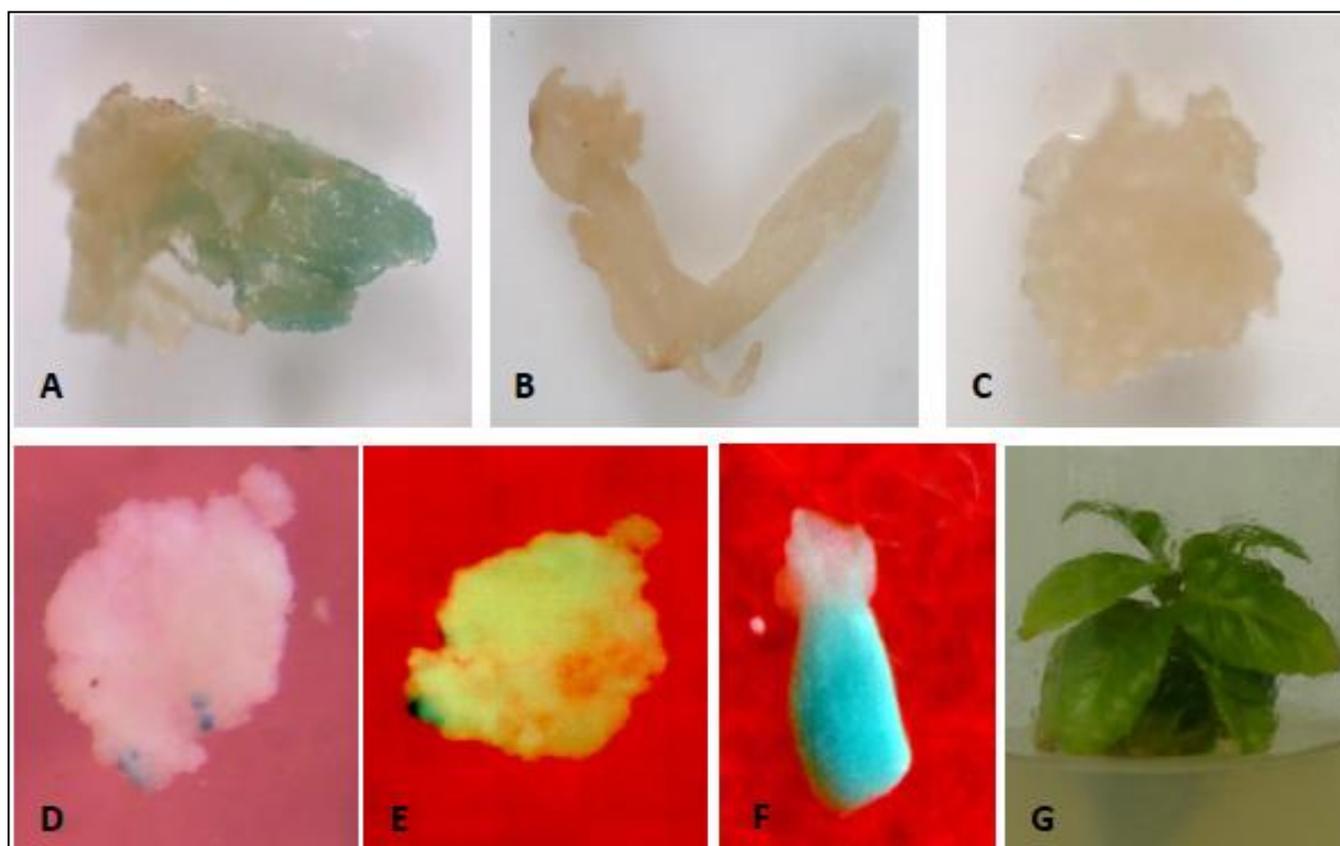
negativo se emplearon segmentos de callo embriogénico no transgénico de café y secciones de hojas de papa.

## RESULTADOS

### Expresión transitoria del gen reportero *gus*.

En los casos considerados positivos, se observó una coloración azul en áreas o zonas de la muestra estudiada, combinada, a veces, con la presencia de puntos color azul intenso. Esta tinción estuvo ausente en los controles negativos y en ningún caso se apreció una coloración vaga o difusa, lo

que indica que las observaciones realizadas son confiables. En los resultados se resalta el hecho que solo los embriones tipo torpedo y el callo embriogénico bombardeados fueron positivos en la reacción GUS, observándose en el primero una coloración azul en 60-80% de su superficie, mientras que para el segundo se detalló un promedio de tres puntos azules por cm<sup>2</sup> (Figura 1). Asimismo, no se observaron diferencias en los niveles de expresión *gus* entre el material bombardeado colocado directamente en medio sólido de germinación sin hormonas y el material incubado en medio líquido suplementado con ANA y transferido al mencionado medio sólido.



**Figura 1. Expresión transitoria del gen reportero *gus*, 48 horas después del bombardeo.** A) Control positivo para el gen *gus* (sección foliar de papa transgénica) B) and C) Control negativo para el gen *gus* (sección foliar de papa no transgénica y callo embriogénico de café, respectivamente) D) y E) Callo embriogénico de café bombardeado mostrando puntos azules; F) Embrión somático tipo torpedo bombardeado mostrando expresión *gus* G) Planta de café regenerada de embrión somático tipo torpedo bombardeado con pCAMBIA 3201, 6 meses después de los bombardeos.

**Sobrevivencia y regeneración del material bombardeado con el plásmido pCAMBIA 3201.**

Los embriones somáticos tipo torpedo mostraron ser el tejido más adecuado a la transformación por bombardeo, ya que los embriones somáticos globulares y las hojas de vitroplantas no sobreviven a las distintas condiciones ensayadas, oscureciéndose los mismos en pocos días, evidenciando una fuerte oxidación, típica de plantas leñosas, como el café, producto de la existencia de altas concentraciones de

polifenoles los cuales pueden liberarse cuando el tejido sufre daño mecánico, como el causado por la penetración de las micropartículas, la cual ha sido asociada a necrosis tisular y señalada como responsable de una baja expresión *gus*, bien sea por muerte del tejido o por enmascaramiento de la tinción o inhibición de la reacción enzimática GUS (van Boxtel y col., 1995). En el caso del callo embriogénico, a pesar que sobrevivió al bombardeo, no hubo regeneración del tejido (Tabla 2).

**Tabla 2.** Supervivencia, regeneración y expresión transitoria del gen *gus* en tejidos bombardeados, bajo condiciones de presión y distancia de bombardeo.

Explante	Presión He (psi)/ distancia (cm)	* Supervivencia (%)	** Regeneración (%)	• Expresión GUS
<b>Embriones Torpedo</b>	40 / 7 and 40/14	100	80	-
	70 / 7	20	-	-
	70 / 14	60	60	+
	180 / 7 and 180/14	0	-	-
<b>Embriones Globulares</b>	40 / 7 and 40/14	100	-	-
	70 / 7 and 70/14	0	-	-
	180 / 7 and 180/14	0	-	-
<b>Callo embriogénico</b>	40 / 7 and 40/14	100	-	-
	70 / 7	0	-	-
	70 / 14	20	-	+
<b>Hojas Vitroplantas</b>	180 / 7 and 180/14	0	-	-
	40 / 7 and 40/14	100	-	-
	70 / 7 and 70/14	0	-	-
	180 / 7 and 180/14	0	-	-

\*Porcentaje de material bombardeado que sobrevivió a los disparos de micropartículas bajo las condiciones de presión de He y distancia.

\*\* Porcentaje de regeneración del material sobreviviente

• Presencia (+) o ausencia (-) de expresión transitoria del gen *gus*

En cuanto a los parámetros de bombardeo ensayados, la distancia más adecuada fue la de 14 cm, ya que a 7 cm se produjo una fuerte oxidación y/o desintegración de los explantes bombardeados. Con respecto a la presión de helio, los embriones

tipo torpedo y el callo embriogénico bombardeados a 40 psi se recuperaron en menor tiempo del bombardeo, evidenciando un rápido desarrollo de embriones somáticos secundarios, no obstante, no se observó una respuesta GUS positiva a ninguna

de las distancias probadas. En las hojas y los embriones globulares bombardeados a esta presión mostraron poca oxidación, en comparación a la observada a 70 y 180 psi de He, pero no regeneraron y murieron al poco tiempo. Estos resultados podrían deberse a que dicha presión fue insuficiente para la penetración de las micro-partículas, por lo que no hubo respuesta GUS, y a que las hojas y embriones globulares son más susceptibles al daño causado por el bombardeo en el sistema de transformación empleado, independientemente de la presión de He y la distancia utilizadas. Al aplicar 180 psi, la sobrevivencia y la regeneración fueron nulas independientemente del tejido y/o la distancia, no se registrándose resultados GUS positivos debido presumiblemente, a la fuerte oxidación observada. De tal manera que para embriones somáticos tipo torpedo, la presión más adecuada fue de 70 psi de He, en combinación con la distancia de 14 cm, ya que se observó la respuesta GUS positiva y la sobrevivencia y regeneración de los mismos. Mientras que las hojas y embriones globulares mostraron una notoria necrosis a 48 horas después del bombardeo y el callo aunque sobrevivió, no regeneró.

En relación con el tiempo de disparo, no se observaron diferencias en las respuestas obtenidas con los dos valores de probados (0,1 y 0,3 s), lo cual pareciera ser indicativo de que este parámetro no es determinante en la transformación de café en el sistema utilizado. Otra explicación posible es que la diferencia entre los tiempos probados era muy poca, por lo que sería recomendable probar un intervalo de valores más amplio, lo cual contribuiría a evaluar con mayor certidumbre el efecto de este parámetro en el bombardeo de café bajo el sistema utilizado.

Por otra parte, en los embriones somáticos tipo torpedo bombardeados a 40 y 70 psi de He en

combinación con la distancia de 14 cm, se observó la formación de embriones somáticos secundarios previamente al desarrollo de cotiledones, los cuales aparecieron en menor tiempo y con mayor abundancia en el material incubado en medio líquido, respecto a lo observado en el material colocado directamente en el medio sólido de germinación. Sin embargo, el material incubado en el medio líquido + ANA no germinó y, en general, los embriones secundarios formados no progresaron.

## DISCUSIÓN

En este estudio se llevó a cabo la optimización de parámetros de transformación de *Coffea arabica* cv. Catimor mediante biobalística sobre la base de la expresión transitoria del gen reportero *gus* y de la sobrevivencia de distintos explantes bombardeados para determinar las condiciones más adecuadas para la futura obtención de plantas transgénicas de café resistentes al minador de la hoja, bombardeadas con el gen *cryIac* de *Bacillus thuringiensis* (resultados a ser publicados). Al respecto, Gahakwa y col. (2000) señalan que con diversas especies vegetales, se han realizado pruebas de transformación por biobalística con genes marcadores y reporteros, lo cual constituye en la mayoría de los casos el primer paso para la transformación con genes de interés agronómico. Así, Chen y col. (1998) reportaron una correlación positiva entre expresión transitoria e integración estable con el uso del bombardeo de micropartículas. Mientras que, Tian y Seguin (2004) explican que la relación entre expresión transitoria e integración estable de genes introducidos no es simple y que si bien la expresión transitoria no es el único factor determinante para la transformación estable, constituye el de mayor peso, por lo que los resultados de pruebas de expresión transitoria son frecuentemente utilizados como indicadores para

el desarrollo de transformación estable en muchas plantas y tejidos. En relación a la expresión transitoria del gen reportero, se ha señalado que la intensidad de la coloración puede ser variable y que esto, a su vez, pudiera estar relacionado a la distribución de las micropartículas portadoras del ADN sobre el tejido blanco (o bien, a la cantidad de micropartículas recibidas en un área), al grado de agregación de las micropartículas, a la profundidad del impacto, a variaciones en el oscurecimiento del tejido después del bombardeo y a distintos niveles de expresión del gen reportero (Jain y col., 1996; Taylor y col., 1991; Barros y col., 2001).

Los resultados obtenidos en este trabajo con las hojas de vitroplantas no concuerdan con los reportados por van Boxtel y col. (1995, 1996), quienes explican que los mejores resultados en cuanto a regeneración y expresión transitoria del gen *gus* fueron obtenidos al trabajar con hojas de vitroplantas de café, dadas las características morfológicas y regenerativas de este explante. Tales discrepancias pudieran explicarse en diferencias en la composición de los medios de cultivo previo al bombardeo y en el tipo de pistola de utilizada, ya que a diferencia de van Boxtel y col. (1995), nosotros empleamos una pistola de Helio a baja presión, y no aplicamos un tratamiento pre osmótico a los explantes antes del bombardeo. Esta aseveración es reafirmada con respecto al tipo de pistola, al observar los resultados descritos por Gatica-Arias y col. (2008) en café Catui, donde obtiene una elevada y estable expresión transitoria de *gus* con una pistola de alta presión de He.

Por otra parte, se ha señalado que el éxito del protocolo de transformación sobre la base de la sobrevivencia y regeneración del material bombardeado está relacionado con la morfología del explante, su edad, forma, tamaño y potencial

regenerativo (Chen y col., 1998; Sági y col., 1995). En este sentido, los embriones somáticos globulares son más jóvenes y parecieran ser menos resistentes que los embriones somáticos torpedo, además de presentar un menor tamaño y, en consecuencia, menor superficie de contacto para las micropartículas, lo cual puede ocasionar una disminución en la eficiencia de la transformación (medida en base a la expresión transitoria) y, en el peor de los casos, la muerte del tejido sometido al bombardeo, la cual está asociada a la oxidación de los mismos como producto de la existencia de altas concentraciones de polifenoles los cuales se liberan cuando el tejido sufre daño mecánico ocasionado por la penetración de las micropartículas (Ramírez-Coronel y col., 2004). En el caso del callo embriogénico, si bien hubo respuesta GUS positiva, esta fue menos frecuente que la observada en los embriones torpedo además de que no se produjo regeneración del callo bombardeado sobreviviente. Recientemente, da Cunha y col. (2004) reportaron la obtención de plantas transgénicas de café a partir de callo bombardeado, al cual se aplicaron tratamientos osmóticos prebombardeo; tales tratamientos pudieron influir en la respuesta positiva de este explante al procedimiento de transformación, a diferencia de lo observado en el presente estudio.

En relación a la presión de aceleración de las micropartículas, los resultados obtenidos están acordes con los reportados por distintos investigadores quienes han señalado que a presiones relativamente altas la expresión transitoria *gus* disminuyó significativamente (Jain y col., 1996; Taylor y col., 1991; Bastar y col., 2004). Así mismo, las diferencias observadas en los resultados para cada explante pudieran deberse principalmente a la penetración de las micropartículas, lo cual concuerda con las observaciones realizadas por Yamashita y col. (1991), McCabe y

Christou (1993) y Hunold y *col.* (1994), quienes explican que esta capacidad de penetración es extremadamente importante porque explantes diferentes de un mismo genotipo (y aún explantes idénticos de distinto genotipo) pueden requerir distintas condiciones de aceleración para la óptima penetración de las partículas.

Aparte del efecto en la profundidad de penetración de las micropartículas, la presión de aceleración también tiene una influencia importante en su distribución y en la magnitud del daño mecánico causado al tejido. Así, a presiones de aceleración relativamente bajas, las áreas cubiertas por las partículas son más grandes que aquellas a presiones más altas; todo esto se refleja en la sobrevivencia y regeneración del material bombardeado, al igual que en la expresión transgénica. Rasco-Gaunt y *col.* (1999), mediante análisis microscópico de la expresión *gus* observaron que a bajas presiones los eventos de expresión mostraban una distribución más uniforme y una densidad relativamente menor, lo cual implica una reducción en el estrés o impacto del bombardeo y en el daño causado al tejido. A presiones altas, solo un área pequeña de los tejidos blanco exhibió una expresión intensa porque había sido fuertemente impactada y, en consecuencia, era mayor la probabilidad de haber sufrido un daño irreversible que impidiera su recuperación, mientras que las áreas de la periferia mostraron escasos o nulos eventos de expresión *gus*. Es importante tener en cuenta que a presiones muy bajas, el nivel de penetración de las micro-partículas es también menor y, aunque el área cubierta y el porcentaje de sobrevivencia sean mayores, se puede afectar negativamente la inserción y la expresión transgénicas, ya que se corre el riesgo de que las micropartículas se queden en la superficie de las células (al nivel de la pared). Por ello, como ha sido señalado en la literatura, es fundamental estandarizar la presión de aceleración de las micropartículas (al igual que el resto de parámetros involucrados en la

biobalística) de acuerdo al sistema con el que se trabaje, incluyendo mecanismo de aceleración, especie vegetal, explante y características de las micropartículas.

También se probó el efecto de la incubación del material bombardeado en medio líquido suplementado con una auxina, bajo agitación suave, lo cual ha sido reportado en la literatura como favorable para incrementar la expresión del gen *gus* (van Boxtel y *col.*, 1995). Se ha señalado que esta incubación disminuye la oxidación del tejido después del bombardeo al disminuir la liberación de polifenoles y favorecer la recuperación frente al daño mecánico sufrido y también puede realizarse antes del bombardeo, como un pretratamiento osmótico dirigido a facilitar la penetración de las micropartículas. La incubación en medio líquido posterior al procedimiento de transformación también fue señalada como favorable por Fernández (2002, 2003) en la recuperación y regeneración de explantes de café transformados por electroporación.

Los tratamientos osmóticos de corta duración aplicados antes o después del bombardeo se han realizado para minimizar la deshidratación citoplasmática de las células blanco. Generalmente se usan compuestos osmóticos no metabolizables como manitol, sorbitol, polietilenglicol o combinaciones de ellos, acompañados o no de hormonas (Alpeter y *col.*, 1996; Perl y *col.*, 1992; Ortiz y *col.*, 1996). En avena se han probado agentes osmóticos metabolizables (sacarosa y maltosa), encontrándose una mejora en la respuesta a largo plazo del cultivo y en la frecuencia de transformación estable (Rasco-Gaunt y *col.*, 1999). En cuanto a incubaciones en medio líquido con hormonas, se ha reportado que las auxinas favorecen la expresión transitoria *gus*, registrándose variaciones dependiendo del tipo y la concentración de auxina (van Boxtel y *col.*,

1995; Rasco-Gaunt y col., 1999). En este estudio no se observaron diferencias en cuanto a la expresión *gus* entre el material bombardeado incubado en medio líquido y el colocado directamente en medio sólido de germinación sin hormonas. Sin embargo, esta incubación favoreció la formación de embriones somáticos secundarios, los cuales aparecieron en menor tiempo y considerablemente con mayor abundancia que en el material bombardeado no incubado en medio líquido; esto pudiera explicarse en la presencia de la hormona ANA en el medio, la cual ha sido utilizada para inducir la formación de embriones en callo embriogénico de café (Menéndez y Hermoso, 1998; Hermoso y Menéndez, 2000) y en un efecto beneficioso de la mencionada incubación en la recuperación y regeneración del material bombardeado, al permitir un mejor intercambio gaseoso, uniformidad en la disponibilidad de nutrientes y rápida incorporación de estos y otros metabolitos a las células, así como la difusión al medio de compuestos fenólicos que pudieran interferir negativamente en la activación del potencial embriogénico del tejido (Fernández, 2003; Fernández y Menéndez, 2003).

La formación de embriones somáticos secundarios a partir de embriones torpedo bombardeados es interesante, no solo desde el punto de vista regenerativo, sino también para evitar fenómenos de expresión genética en mosaico. En la presente investigación, el mosaicismo tendría lugar por el hecho de que no todas las células de los explantes bombardeados reciben e integran el ADN foráneo. Así, la eliminación del mosaicismo ocurriría considerando el origen unicelular de los embriones, la formación de embriones secundarios a partir de células potencialmente transformadas en los embriones torpedo bombardeados y la regeneración de plantas a partir de estos embriones secundarios (las cuales, en consecuencia,

expresarían al transgén uniformemente). Esto pone en evidencia la importancia de la embriogénesis somática secundaria en los programas de mejoramiento vegetal a través de métodos de transformación genética, puesto que las plantas transgénicas pueden ser propagadas masivamente a partir de tejidos potencialmente transformados, manteniendo su fidelidad genética (Fernández y col., 2005). Es importante mencionar que a pesar del efecto beneficioso de la incubación post bombardeo en medio líquido para la inducción de embriogénesis somática secundaria, lo cual pudiera traducirse en un incremento en la capacidad regenerativa del material bombardeado, en los explantes así tratados la germinación se produjo tardíamente o, incluso, no tuvo lugar, además de que los embriones secundarios formados murieron al poco tiempo de ser transferidos a un medio fresco. Esto probablemente se relacione con la duración de la incubación y la composición del medio, por lo que sería recomendable realizar nuevas pruebas variando el tiempo de incubación y la concentración y/o el tipo de hormona para optimizar las condiciones de cultivo postbombardeo, con el objetivo de aprovechar el potencial que ofrece la embriogénesis somática secundaria en el sistema de transformación utilizado, al nivel de la propagación y de la posible eliminación de expresión genética en mosaico en las plantas regeneradas. Así mismo, es recomendable la optimización de tratamientos osmóticos prebombardeo, los cuales pudieran contribuir a la disminución de la oxidación en los tejidos bombardeados y a incrementar la eficiencia final de la transformación.

Cabe mencionar que en este estudio no se realizaron pruebas moleculares debido a que el propósito fue evaluar la expresión transitoria GUS (lo que se hizo mediante la prueba histoquímica) y la respuesta de los distintos tejidos a los

bombardeos. Sin embargo, se obtuvieron resultados positivos de expresión GUS 6 y 12 meses después de los bombardeos en material regenerado a partir de explantes bombardeados inicialmente, lo que sugiere la posible transformación estable bajo los parámetros seleccionados. Así mismo, los resultados obtenidos en esta estandarización en cuanto a las diferencias observadas en las respuestas de los explantes a las condiciones probadas fueron evidentes y no dejaron lugar a dudas, por lo que no fue necesario su análisis mediante pruebas estadísticas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al FONACIT y al CDCH-UCV por el apoyo financiero a través de los proyectos de investigación S1-98003209 y PI 03.33.5436.2004, respectivamente. De igual forma, por la colaboración prestada por la Dra.

En conclusión, los resultados óptimos en la expresión transitoria del gen *gus* y la regeneración de plantas de café, se obtuvieron a partir de embriones somáticos tipo torpedo a una presión de He de 70 psi y a una distancia de disparo de 14 cm, incubándose directamente en medio sólido, permitiendo la transformación eficiente y estable de genotipos de café Catimor con genes económicamente importantes (Kasuga y *col.*, 1999).

Ana Herrera (UCV) en la detallada revisión del manuscrito. También, a la Dra. Eva de García (Laboratorio de Biotecnología Vegetal-UCV) por suministrar las plantas de papa que sirvieron de controles en los ensayos *gus* y la Dra. Ariadne Vegas (INIA; Maracay) por suministrar el plásmido pCAMBIA3201.

## LITERATURA CITADA

- Alpeter, F., Vasil, V., Srivastava, V., Stoger, E. y Vasil, I. 1996. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) plants. *Plant Cell Rep.*, 16:12-17.
- Barros, E. V., da Guntha, W. G. y Miranda, A. C. 2001. Transient and stable expresión of GUS gene in the meristematic region of *C. arabica* embryos at different stages of in vitro cultivation. (RESUMEN). IX Encontro Latino-Americano de Biotecnología Vegetal (REDBIO), Goiás Brasil. Pp: 137.
- Barton, C. R., Adams, T. L. y Zarowitz, M. 1991. Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants. In: XIV International Conference of Coffee Science. ASIC. San Francisco, United States, pp 460-464.
- Bastar, M., Luthar, Z., Skof, S. y Bohanec, B. 2004. Quantitative determination of mosaic *GFP* gene expression in tobacco. *Plant Cell Rep* 22:939-944.
- Chen, L., Zhang, S., Beachy, R. y Fauquet, C. 1998. A protocol for consistent, large scale production of fertile transgenic rice plants. *Plant Cell Rep*, 18:25-31.
- Chung, C., Niemela, S. y Miller, R. 1989. One-step preparation of competent *E. coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl.Acad. Sci. USA*, 86:2172-2175.
- da Cunha, W.G., Machado, F. R. B., Vianna, G. R., Teixeira, J. B. y de Barros, E. V. S. A. 2004. Obtenção de plants de *Coffea arabica* genéticamente modificadas por bombardeamento de calos embriogênicos. *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 73:1-15.
- De Guglielmo, Z. 2009. Ingeniería genética aplica al café. *Revista UDO Agrícola*. 9 (3):475-486
- De Guglielmo, Z., Fernández R. y Menéndez, A. 2009. Origen, historia y aplicaciones biotecnológicas en el cultivo de café. *FARAUTE* 4(1):21-38.
- Díaz, M., Zappacosta, D., Franzone, P. y Ríos, R. 2004. Transformación genética. En “Biotecnología y mejoramiento Vegetal”, Ediciones INTA, Argentina. Parte III:109-123.
- Fernández, R. 2002. Establecimiento de un método para la transformación genética de café (*Coffea arabica* cv. Catimor) e incorporación del gen *bar* que confiere resistencia al herbicida “glufosinato de amonio”. Tesis Doctoral, Postgrado en Botánica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. pp 193.
- Fernández, R. 2003. Establecimiento de un método para la transformación genética de café (*Coffea arabica* cv. Catimor) e incorporación del gen *bar* que confiere resistencia al herbicida “glufosinato de amonio”. Resumen de Tesis Doctoral, *Acta Científica Venezolana*, 54:284-287.
- Fernández, R. y Menéndez, A. 2003. Transient gene expression in secondary somatic embryos from coffee tissues electroporated with the genes *gus* and *bar*. *Electronic J Biotechnol*, 6:29-38.
- Fernández, R., Hermoso, L. y Menéndez, A. 2005. Primary and secondary somatic embryogenesis in leaf sections and cell suspensions of *Coffea arabica* cv. Catimor. *Interciencia*, 30(11): 694-698.
- Fernández R., De Guglielmo, Z. y Menéndez, A. 2010. Cultivo de tejidos y transformación genética de café. *Revista de Investigación (IUPC)* 71(3): En prensa.
- Gahakwa, D., Maqbool, S., Fu, X., Sudhakar, D., Christou, P. y Kohli, A. 2000. Transgenic rice as a system to study the stability of transgene expression: multiple heterologous transgenes show similar behaviour in diverse genetic backgrounds. *Theor Appl Genet.*, 101:388-399.
- García, E de y Menéndez, A. 1987. Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto “Catimor”. *Café Cacao Thé*, 31:15-22.
- Gatica-Arias, A.M., Arrieta-Espinoza, G. y Espinoza-Esquivel, A.M. 2008. Plant regeneration via indirect somatic embryogenesis and optimization of genetic transformation in *Coffea arabica* L.cvs. Caturra and Catuai. *E. J. Biotechnology* 11(1):1-22.
- Hatanaka, T., Choi, Y. E., Kusano, T., y Sano, H. 1999. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Plant Cell Rep.*,19(2):106-110.
- Hermoso, L. y Menéndez, A. 2000. Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acta Científica Venezolana*, 51: 90-95.
- Hunold, R., Bronner, R. y Hahne, G. 1994. Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *Plant J*, 5:593-604.
- Jain, R., Jain, S., Wang, B. y Wu, R. 1996. Optimization on biolistic method for transient gene expression and production of agronomically useful transgenic Basmatic rice plants. *Plant Cell Rep.*, 15:963-968.

- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. y Bevan, M. W. 1987. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.*, 6(13):3901-3907.
- Kasuga M., Liu, Q., Miura, S., Shinozaki, K.Y. y Shinozaki, K. 1999. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech*, 17:287-291.
- Klein, T., Wolf, E., Wu, R. y Sanford, J. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*, 327: 70-73.
- Klein, T., Gradziel, T., Fromm, M. y Sanford, J. 1988. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cells by high-velocity microprojectiles. *Bio/Techn*, 6:559-564.
- Kumar, V., Naidu, M. M., Ravishankar, G. A. 2006a. Developments in coffee biotechnology - in vitro plant propagation and crop improvement. *Plant Cell Tiss Org Cult* 87:49-65.
- Kumar, V., Satyanarayana, K., Sarala, S., Indu, E., Giridhar, P., Chandrashekar, A., Ravishankar, G. 2006b. Stable transformation and direct regeneration in *Coffea canephora* P ex. Fr. By *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation without hairy-root phenotype. *Plant Cell Rep*, 25(3):214-222.
- McCabe, D. y Christou, P. 1993. Direct DNA transfer using electric discharge particle acceleration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33:227-236.
- Menéndez-Yuffá, A. y Hermoso, L. 1998. Estudio comparativo de la embriogénesis somática en café a partir de secciones de hojas de plantas de invernadero y vitroplantas (resumen). III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal, La Habana. Pp: 515.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 15:473-479.
- Ortiz, J., Reggiardo, M., Ravizzini, R., Spitteler, M., Altabe, S., Cervigni, G., Elias, F., Vallejos, R. 1996. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation. *Plant Cell Rep.*, 15: 877-881.
- Perl, A., Kless, H., Blumenthal, A., Galili, G. y Galun, E. 1992. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat calli by optimization. *Mol Gen Genet.*, 235:279-284.
- Ramirez-Coronel, M. A. N., Marnet, N., Kolli, V. S. K., Roussos, S., Guyot, S. y Augur, C. 2004. Characterization and estimation of proanthocyanidins and other phenolics in coffee pulp (*Coffea arabica*) by thiolysis-high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem* 52:1344-1349.
- Rasco-Gaunt, S., Riley, A., Barcelo, P., Lazzeri, P. 1999. Analysis of particle bombardment parameters to optimise DNA delivery into wheat tissues. *Plant Cell Rep*, 19:118-127.
- Ribas, A., Pereira, L. y Vieira, L. 2006. Genetic transformation of coffee. *Braz J Plant Physiol* 18:83-94.
- Sági, L., Panis, B., Schoofs, H., Swennen, R. y Cammue, B. 1995. Genetic transformation of banana and plantain via particle bombardment. *Biothec*, 13:481-485.
- Samson, N., Baushe, M. G., Lee, S.B., 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 Biotech J.*, 5: 339-353.
- Taylor, M. y Vasil, I. 1991. Histology of physical factors affecting transient GUS expression in pearl millet (*Pennisetum glaucum* (L) R. Br) embryos following microprojectile bombardment. *Plant Cell Rep.*, 10: 120-125.
- Tian, L. y Seguin, A. 2004. Microprojectile particle effect on stable transformation of black spruce via bombardment. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 199a-199f.
- van Bostel, J., Berthouly, M., Carasco, C. y Eskes, A. 1995. Transient Expresión of  $\beta$ -Glucuronidase Following Biolistic Delivery of Foreign DNA into Coffee Tissues. *Plant Cell Rep.*, 14: 748-752.
- van Bostel, J. y Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves: Factors influencing embryogenesis and subsequent proliferation and regeneration in liquid médium. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 44: 7-17.
- Yamashita, T., Iida, A. y Morikawa, H. 1991. Evidence that more than 90% of B-glucuronidase-expressing cells after particle bombardment directly receive the foreign gene in their nucleus. *Plant Physiol.*, 97: 829-831.