

Artículo Científico

Biotecnología Vegetal Vol. 11, No. 1: 33 - 42, enero - marzo, 2011

ISSN 1609-1841 (Versión impresa)

ISSN 2074-8647 (Versión electrónica)

## Transformación genética de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo mediante la electroporación de suspensiones celulares embriogénicas

R. Barbón\*, E. Jiménez, A. Capote, V. Gil, B. Ocaña. \*Autor para correspondencia

Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central 'Marta Abreu' de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. CP 54 830. Cuba. e-mail: raulb@ibp.co.cu

### RESUMEN

La regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de suspensiones celulares es considerada como el método más eficiente para la producción masiva de plantas. Este trabajo tuvo como objetivo lograr la transformación genética del café cultivar Caturra rojo mediante la electroporación de suspensiones celulares embriogénicas. Para ello, se determinó el efecto de diferentes condiciones de electroporación (capacitancia y fuerza de campo) sobre suspensiones celulares, sin aplicación de ADN plásmidico, mediante el análisis de la vitalidad celular a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la electroporación. También se determinó la influencia del tampón de electroporación sobre la vitalidad celular y la expresión transiente del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa y se estudió la expresión transiente del gen *GUS* en suspensiones celulares embriogénicas electroporadas con el plásmido pDB-GUS-INT. En las suspensiones celulares electroporadas bajo las diferentes condiciones de electroporación, se apreció que las descargas eléctricas afectaron la vitalidad celular con respecto al grupo control. En las suspensiones celulares electroporadas con tampón de electroporación A y con aplicación de un tiempo de descarga de 500 msec se obtuvo el mayor porcentaje de vitalidad, con un valor de un 32.14, con respecto a los otros tratamientos. Sin embargo, en los agregados celulares electroporados con una capacitancia de 100 y 1200  $\mu$ F se observó una mayor actividad transiente del gen *GUS* (59.37 y 61.01%) con respecto al tratamiento electroporado con una capacitancia de 490  $\mu$ F donde los valores obtenidos fueron de un 50.0%.

Palabras clave: embriogénesis somática, café

### ABSTRACTS

Plant regeneration by somatic embryogenesis from cell suspensions is considered the most efficient method for mass production of plants. The objective of this work was to achieve the genetic transformation of *Coffea arabica* cv. Caturra rojo by electroporation of embryogenic cell suspensions. The effect of different electroporation conditions (capacitance and field strength) on the cell suspensions without the application of plasmid DNA, by analysis of cell vitality at 24, 48 and 72 hours after electroporation was evaluated. The effect of electroporation buffer on cell vitality and transient expression of the gene for beta-glucuronidase was also determined. Besides, the transient expression of *GUS* gene in embryogenic cell suspensions electroporated with plasmid PDB-GUS-INT was studied. In the electroporated cell suspensions, under different electroporation conditions, electric shocks significantly affect cell vitality compared to the control group. In the Electroporated cell suspensions with buffer of Dekeyser *et al.* (1990) and applying a discharge time of 500 msec was obtained the highest percentage of vitality, with a value of 32.14, compared to other treatments. While in the electroporated cell aggregates with a capacitance of 100 and 1200  $\mu$ F there was a higher transient *GUS* gene activity (59.37 and 61.01%) compared to electroporated treatment with a capacitance of 490  $\mu$ F, where values obtained were 50.0%.

Keywords: somatic embryogenesis, coffee tree

### INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea* spp.) es un cultivo de gran importancia económica para muchos países en los cuales constituye uno de los principales productos de exportación. La amenaza eminente de enfermedades y plagas como las ocasionadas por patógenos tales como:

*Hemileia vastatrix* Berk (roya), *Leucoptera coffella* Guer. (minador) y *Hipotenemus hampei* Ferr. (broca), deben acelerar la búsqueda de nuevas técnicas de mejoramiento genético, métodos de cultivo y de propagación del café, que sean de corta duración y que den una respuesta rápida para obtener plantas resistentes. Una posibilidad sería la

combinación de las potencialidades de la embriogénesis somática en medios de cultivo líquidos como sistema de regeneración y propagación y algún método de transformación genética.

La embriogénesis somática en café fue descrita por primera vez por Starisky (1970) en *Coffea canephora* P. ex Fr. A partir de entonces, han sido numerosas las publicaciones relacionadas con la embriogénesis somática en café (Dufour *et al.*, 1992; Afreen *et al.* 2002; Albarran *et al.*, 2005; Ducos *et al.*, 2007). La regeneración de plantas vía embriogénesis somática a partir de suspensiones celulares es considerada como el método más eficiente para la producción masiva de plantas, dado por la naturaleza misma del proceso embriogénico que consiste en la formación de un embrión viable a partir de células aisladas con lo cual se logran altos coeficientes de multiplicación y permite manejar grandes cantidades de propágulos en volúmenes reducidos de medio de cultivo.

La utilización de la transformación genética para la creación de nuevas variedades mejoradas de café puede contribuir al progreso decisivo para la selección. Barton (1991) describió la obtención de embriones somáticos transformados a partir de protoplastos electroporados de *C. arabica* L., pero no logró regenerar plantas transgénicas a partir de estos. Por otra parte, Spiral (1993) informó la obtención de plantas transgénicas de *Coffea canephora* L. cv. Robusta mediada por *Agrobacterium rhizogenes* así como métodos de transformación directa que abren la posibilidad de establecer una metodología eficiente para transformar dicha especie.

Sobre la base de esta problemática es que se realizó el presente trabajo que tuvo como objetivo lograr la transformación genética del café cultivar Caturra rojo mediante la electroporación de suspensiones celulares embriogénicas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Procedimiento general para la electroporación suspensiones celulares embriogénicas*

Se emplearon suspensiones celulares embriogénicas de café (*Coffea arabica* cv.

Caturra Rojo), obtenidas según la metodología descrita por de Feria (1995). Se realizó un filtrado de una suspensión celular ( $100 \text{ gMF.l}^{-1}$ ) a través de tamices y se seleccionaron los agregados celulares entre 40 y 450 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) y se resuspendieron  $5.0 \text{ gMF}$  en 50 ml de tampón de electroporación en Erlenmeyers de 100 ml de volumen total. La suspensión celular embriogénica en tampón de electroporación fue mantenida en agitador orbital a 110 rpm,  $26^\circ\text{C}$  y en condiciones de oscuridad. Se reemplazó el tampón tres veces con intervalos de una hora (Dekeyser *et al.*, 1990; Arencibia *et al.*, 1995).

Los agregados celulares fueron colectados por decantación y resuspendidos en 25 ml de tampón de electroporación, para obtener una densidad celular de  $200 \text{ mgml}^{-1}$ . Alícuotas de 1.0 ml fueron mezcladas con  $100 \mu\text{g}$  de ácido desoxirribonucleico (ADN) plasmídico en tubos Eppendorf de 1.5 ml de volumen total y se mantuvieron las muestras durante tres horas a  $4^\circ\text{C}$  en condiciones de oscuridad.

Antes de aplicar la descarga eléctrica, se le incorporaron a cada muestra otros  $50 \mu\text{g}$  de ADN plasmídico. Las muestras se homogenizaron por agitación y se transfirieron 0.8 ml a las cubetas de electroporación pG 235-4 (Hoefer Scientific Instruments) de 0.4 cm de separación entre los electrodos de aluminio. La electroporación se efectuó en una unidad de electroporación PG-200 PROGENETOR (Hoefer Scientific Instruments) proporcionando pulsos de caída exponencial.

Cada muestra electroporada fue inoculada en Erlenmeyers de 100 ml que contenían 20 ml de medio de cultivo de multiplicación compuesto por las sales inorgánicas propuestas por Murashige y Skoog (1962),  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D),  $1.0 \text{ mg l}^{-1}$  de Kinetina y 3.0% (m/v) de sacarosa y se mantuvieron en agitador orbital durante 72 horas con las condiciones de cultivo anteriormente descritas.

Los tampones de electroporación se esterilizan por filtración, a través de una membrana de filtración ANALIPORE® (OSI) de celulosa estéril, con una porosidad de  $0.22 \mu\text{m}$ , el pH se ajustó a un valor de 7.2 antes de la filtración (Tabla 1).

Tabla 1. Composición de los tampones de electroporación propuestos por Dekeyser *et al.* (1990) y Fromm *et al.* (1986).

Tampón de electroporación Dekeyser <i>et al.</i> (1990)		Tampón de electroporación Fromm <i>et al.</i> (1986)	
HEPES (N-2-hidroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic.)	10 mM	Dihidrógenofosfato de potasio	0.15 mM
Cloruro de calcio dihidratado	4.0 mM	Cloruro de sodio	128.3 mM
Glucosa	0,1 mM	Manitol	199.78 mM
Espermidina	0.2 M		

- ADN plasmídicos

Los plásmidos empleados para los ensayos de electroporación fueron:

- El plásmido pBPF-A5-GUS presenta 5 637 pares de base (pb), este contiene el gen reportero que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa (*GUS*) bajo el promotor 35-S del *Virus del mosaico de la Coliflor* (CaMV 35-S) y como terminador la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintetasa (*NOS*) de *Agrobacterium tumefaciens*.

- El plásmido pDB-GUS-INT presenta 15 kilobases (Kb), el cual contiene el gen reportero *GUS* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa bajo el control del promotor 35-S del *Virus del mosaico de la Coliflor* (CaMV 35-S) y el terminador; también presenta la secuencia del gen *bar* que codifica para fosfinotricina acetiltransferasa, que confiere resistencia a herbicidas bialafos y fosfinotricina (BASTA), bajo el control de los mismos elementos reguladores.

Los plásmidos fueron purificados a través de una columna cromatográfica de SEPHACRYL-1000, se determinó su concentración por lectura espectrofotométrica a 260 nm y se estandarizó a una concentración 1.0  $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ .

#### *Determinación de la vitalidad en suspensiones celulares embriogénicas*

El análisis de la vitalidad de las suspensiones celulares se realizó mediante la prueba de diacetato de fluoresceína (F.D.A.) (Widholm, 1972). Se utilizó un hematocímetro (cámara tipo Neubauer) para el conteo celular, siguiendo el procedimiento descrito por SIGMA (1992). Para las observaciones se empleó un microscopio óptico Axioskop (Carl Zeiss, Alemania) con excitación a 450-490 nm y fluorescencia a 510-520 nm.

#### *Detección histoquímica de la actividad $\beta$ -glucuronidasa*

De las suspensiones celulares electroporadas se tomaron muestras de 0.5 ml y se colocaron en tubos eppendorf (de 1.5 ml de volumen total), se realizó un lavado con tampón fosfato de sodio 50 mM (pH 7). Finalmente a las muestras se les añadió el sustrato histoquímico X-GLU preparado acorde a lo descrito por Jefferson (1988). Después se incubaron durante 48 horas en la oscuridad a 37°C. Por cada muestra se analizaron diez campos por observación en un microscopio óptico Axioskop (Alemania), y se cuantificaron los agregados celulares con actividad transiente *GUS*.

#### *Análisis estadísticos de los resultados de ensayos de electroporación*

Los datos relacionados con porcentajes de vitalidad y expresión transiente fue necesario aplicarles la transformación logaritmo de X+1 para procesarlos. Los resultados experimentales fueron procesados estadísticamente mediante un ANOVA bifactorial y el grado de significación fue determinado mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan para un nivel de significación del 5%.

#### **Determinación de parámetros para la electroporación de suspensiones celulares embriogénicas**

Para establecer un sistema de transformación por electroporación es necesario determinar los parámetros eléctricos adecuados. En este estudio se emplearon seis réplicas por tratamiento y se determinó el efecto de las

diferentes condiciones de electroporación (capacitancia y fuerza de campo sobre las suspensiones celulares, sin aplicarse ADN plasmídico, mediante el análisis de la vitalidad (Widholm, 1972) a las 24, 48 y 72 horas posteriores a la electroporación (Tabla 2).

### Efecto de la composición del tampón de electroporación sobre la expresión transitoria del gen *GUS*

Se determinó la influencia de la composición del Tampón de electroporación sobre la vitalidad de las suspensiones celulares y la expresión transiente del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa. Para ello se probaron dos tampones de electroporación (Dekeyser *et al.* (1990) y Fromm *et al.* (1986) bajo los mismos parámetros físicos de electroporación (Tabla 3). Para este ensayo las suspensiones celulares se electroporaron con el plásmido pBPF-A5-GUS y se emplearon diez réplicas por tratamiento.

En este ensayo se evaluó la vitalidad celular de los diferentes tratamientos a las 24, 48 y 72 horas y se determinó la expresión transiente del gen de la  $\beta$ -glucuronidasa.

### Expresión transiente del gen *GUS* en suspensiones celulares embriogénicas electroporadas

En este ensayo se estudió la expresión transiente del gen *GUS* en suspensiones celulares embriogénicas electroporadas con el plásmido pDB-GUS-INT, al aplicarse valores de fuerza de campo constante y valores de capacitancia variable (Tabla 4).

Se realizó el análisis de la vitalidad celular a las 24, 48 y 72 horas de los diferentes tratamientos, los cuales estaban replicados cuatro veces y también la detección de la expresión transiente de la  $\beta$ -glucuronidasa en los agregados celulares a las 48 horas posteriores al proceso de electroporación.

Tabla 2. Parámetros físicos aplicados para la electroporación a los diferentes tratamientos de suspensiones celulares embriogénicas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo.

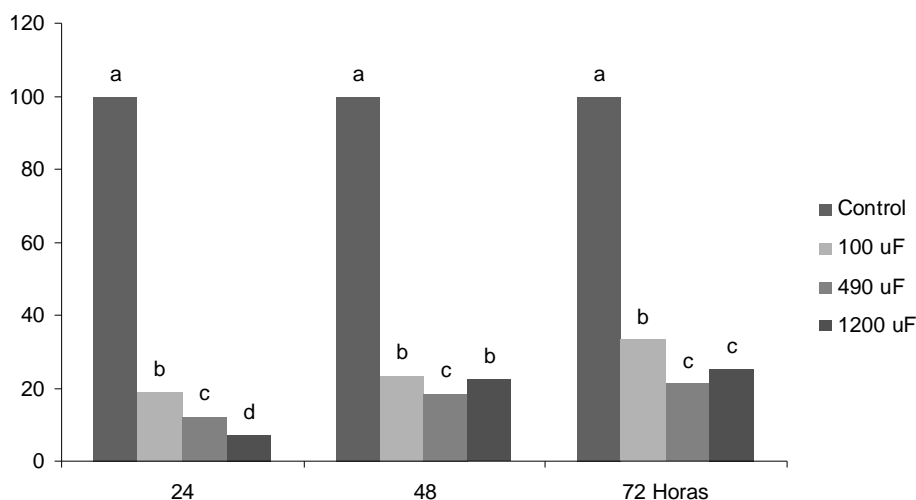
Fuerza de campo (V cm <sup>-1</sup> )	Capacitancia ( $\mu$ F)	Tiempo de descarga (mseg)	Tratamientos
200.0	100.0	42.0	1
	490.0	204.0	2
	1200.0	499.0	3
600.0	100.0	42.0	4
	490.0	204.0	5
	1200.0	499.0	6
1000.0	100.0	42.0	7
	490.0	204.0	8
	1200.0	499.0	9
-	-	-	Control

Tabla 3. Parámetros físicos utilizados para la electroporación de suspensiones celulares de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo en dos tampones de electroporación.

Tampón	Fuerza de campo (V.cm <sup>-1</sup> )	Capacitancia ( $\mu$ F)	Tiempo de de descarga (mseg)	Tratamientos
BEP-A	600	860	500.0	1
			1000.0	2
BEP-B	600	860	500.0	3
			1000.0	4
	600	860	1000.0	Control

Tabla 4. Parámetros eléctricos utilizados para determinar la expresión transiente en las suspensiones celulares electroporadas de *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo.

Fuerza de campo ( $V\ cm^{-1}$ )	Capacitancia ( $\mu F$ )	Tiempo de descarga. (mseg)	Tratamientos
600	100.0	42.0	1
	490.0	204.0	2
	1200.0	499.0	3



\* Barras con letras distintas para cada tiempo (hora) evaluado indican diferencias significativas para  $p < 0.05$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan

Figura 1. Influencia de diferentes parámetros eléctricos sobre la vitalidad celular de suspensiones celulares electroporadas *Coffea arabica* L. cv. Caturra rojo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Determinación de parámetros para la electroporación de suspensiones celulares embriogénicas

La aplicación de distintos valores de fuerza de campo, combinados con variaciones en la capacitancia afectaron la vitalidad de los agregados celulares, manifestándose diferencias altamente significativas entre los tratamientos (Figura 1).

En el análisis morfológico de las suspensiones celulares embriogénicas electroporadas e inmediatamente después del pulso eléctrico, se observó que inicialmente el número de células vivas era muy alto, mientras que después de transcurridas algunas horas de aplicarse el pulso de electroporación, se apreció mortalidad celular debido al daño irreversible que se produce por el proceso de electroporación. El daño se evaluó a partir de

las 24 horas. Posterior a este tiempo, las células comenzaron a salir del estado crítico e iniciaron un proceso de recuperación de su capacidad mitótica y la suspensión celular electroporada inició la multiplicación.

En cuanto a la vitalidad de las suspensiones celulares electroporadas bajo las diferentes condiciones, se apreció que las descargas eléctricas afectaron la vitalidad celular con respecto al grupo control. Los tratamientos electroporados con una fuerza de campo de  $200\ V\ cm^{-1}$  se caracterizaron por poseer una mayor vitalidad (78.88 - 62.45%). Se observó que en la medida que se incrementó la fuerza de campo de 600 a  $1000\ V\ cm^{-1}$  se presentó un decrecimiento de la vitalidad celular, siendo para valores de  $600\ V\ cm^{-1}$  entre 45.33 a 51.46%, mientras que para valores de  $1000\ V\ cm^{-1}$  fue entre 18.66 y 6.85%.

Los cambios en la capacitancia para una misma fuerza de campo fueron menos

variables. Por ejemplo, para una fuerza de campo de  $200 \text{ V cm}^{-1}$  existió una disminución de la vitalidad celular de un 78.88 a 62.45%. Un comportamiento similar ocurrió para 600 y 1000  $\text{V cm}^{-1}$ . Se observó una mayor repercusión de los valores de fuerza de campo con respecto a los de capacitancia, debido a que son más drásticos los cambios de vitalidad con el aumento de la fuerza de campo, que los cambios de capacitancia dentro de un mismo valor de fuerza de campo. Dentro de una misma fuerza de campo, al aumentar la capacitancia, se determinó una disminución en la vitalidad, debido a que valores altos de capacitancia conllevan a un incremento en el tiempo de descarga y producen un pulso más prolongado que provoca que los lípidos y proteínas que componen la membrana celular no puedan recuperar su actividad funcional.

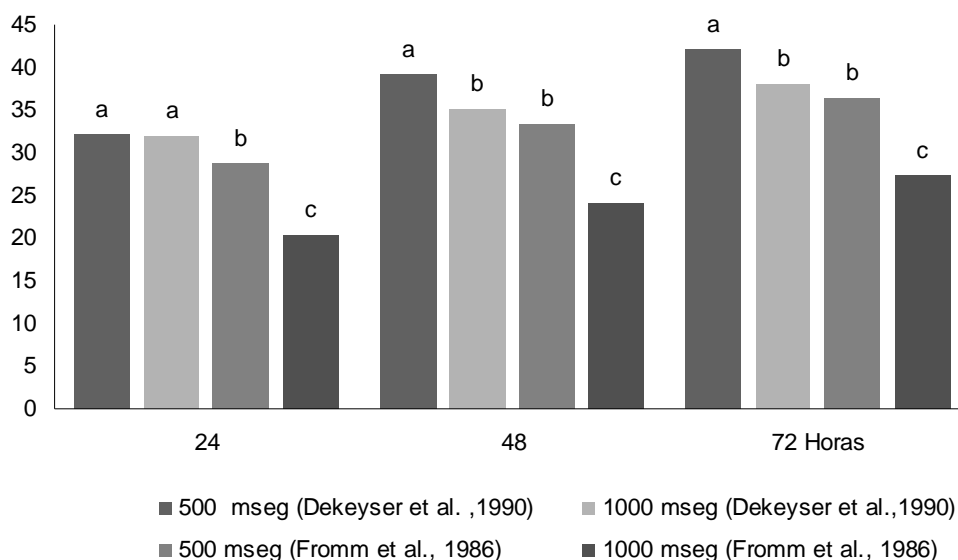
Al producirse el pulso eléctrico se inducen poros o áreas de permeabilización en la membrana celular, pero si el pulso aplicado excede un determinado valor de umbral de fuerza de campo, entonces la membrana celular se daña irreversiblemente y es la causa de la mortalidad celular. Rathus (1992) sugirió que en la electroporación celular, la formación del poro es el resultado de la rotación en bloque de grupos lipídicos cercanos en la bicapa de la

membrana celular, la cual se produce debido a una variación en el potencial de membrana de la célula.

Para seleccionar valores adecuados para establecer un sistema de transformación genética mediante electroporación, de acuerdo con Rathus (1992) se debe determinar un voltaje lo bastante alto para alcanzar una fuerza de campo que produzca la mortalidad del 50% de las células o protoplastos viables en un cultivo celular. En el ensayo los valores obtenidos a una fuerza de campo de  $600 \text{ V cm}^{-1}$  con tiempos de descarga de 42, 204 y 499 mseg provocaron una mortalidad alrededor de un 50% (51.46, 48.22 y 45.33 respectivamente) siendo estos los parámetros que se utilizaron a partir de este momento en los demás ensayos de electroporación en la variedad Caturra rojo.

#### Efecto de la composición del tampón de electroporación sobre la expresión transitoria del gen *GUS*

En este ensayo se observó que la composición del tampón tuvo efecto sobre la expresión transitoria del gen *GUS*, existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (Figura 2).



Barras con letras distintas para cada tiempo (hora) evaluado indican diferencias significativas para  $p < 0.05$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan

Figura 2. Vitalidad de suspensiones celulares electroporadas de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo con Tampón de electroporación Dekeyser *et al.* (1990) y Fromm *et al.* (1986).

En las suspensiones celulares electroporadas con tampón de electroporación propuesto por Dekeyser *et al.* (1990) con un tiempo de descarga de 500 mseg, fue donde se obtuvo el mayor porcentaje de vitalidad, con un valor de un 32.14%, con respecto a los otros tratamientos. Obteniéndose un 31.89% de vitalidad para un tiempo de descarga de 1 000 mseg para tratamientos con Tampón Dekeyser *et al.* (1990) y en los tratamientos con Tampón de electroporación Fromm *et al.* (1986). con tiempo de descarga de las suspensiones celulares electroporadas con un tiempo de descarga de 500 y 1 000 mseg, se apreciaron valores de vitalidad de 28.81 y 20.31% respectivamente. Se observó una recuperación lenta de la vitalidad celular con el tiempo a las 48 y 72 horas de cultivo.

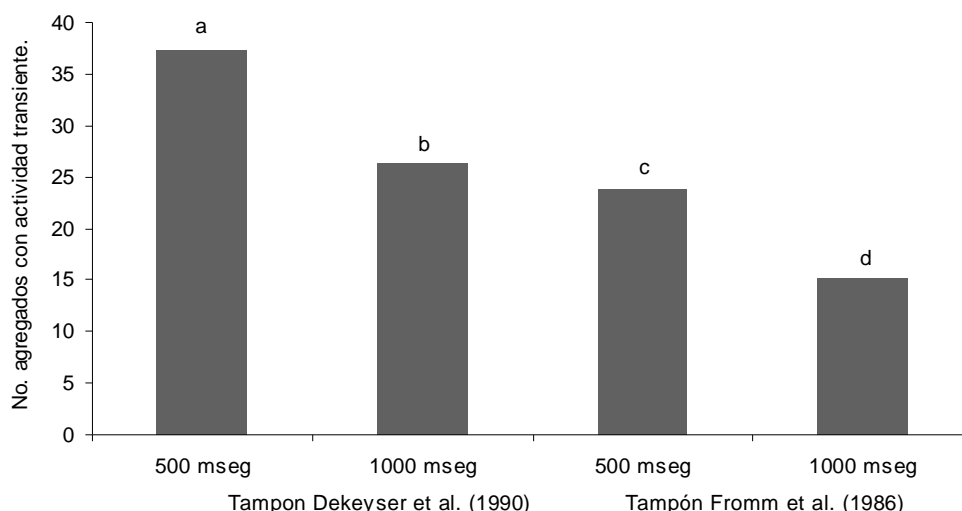
La composición del tampón es un parámetro importante que se debe determinar para lograr sistemas de transformación genética por electroporación de una forma eficiente. La composición, concentración y pH de los tampones pueden ejercer una influencia determinante para la estabilidad de la vitalidad celular durante el proceso de electroporación.

Según Rathus (1992a), los iones divalentes,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , han sido muy utilizados por su papel en la estabilización de la membrana después de la desestabilización producto del pulso eléctrico. El caso del tampón de electroporación propuesto por Dekeyser *et al.* (1990) contiene  $\text{Ca}^{2+}$  lo cual pudiera ser una de las causas de mejores

resultados de vitalidad con respecto al tampón propuesto por Fromm *et al.* (1986), el cual no presenta en su composición  $\text{CaCl}_2$ . Una causa de los valores bajos de vitalidad de los tratamientos con tampón de electroporación propuesto por Dekeyser *et al.* (1990) se pudiera deber a la alta conductividad debido a la presencia de  $\text{NaCl}$  (128.3 mM). Resultados similares obtuvo Rathus (1992a), al utilizar tampón con 100 y 150 mM de  $\text{NaCl}$ . Además, observó una reducción en los niveles de proteínas y un detrimento en la vitalidad de la suspensión celular, con resultados óptimos al incorporar al tampón 5.0 mM de  $\text{CaCl}_2$ .

El tampón de electroporación propuesto por Dekeyser *et al.* (1990) posee en su composición elementos que permiten estabilidad en la vitalidad celular, como el HEPES, el cual es un estabilizador del pH, lo cual evita los cambios bruscos de pH de la solución durante todo el proceso y mantiene así una mayor estabilidad del ADN plasmídico y de las células a electroporar; la presencia también en este Tampón de la espermidina, la cual es una poliamina que se combina fuertemente con los grupos fosfatos situados en la periferia externa de la doble hélice del ADN plasmídico; haciendo más estable y flexible la molécula.

Al realizarse el análisis de la actividad transiente de los diferentes tratamientos mediante el ensayo histoquímico X-GLU, se observaron diferencias significativas entre los tratamientos electroporados con diferentes tampón de electroporación y tiempos de descarga (Figura 3).



\* Barras con letras distintas indican diferencias significativas para  $p < 0.01$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan

Figura 3. Expresión transitoria del gen *GUS* para suspensiones celulares de electroporadas con tampón de electroporación propuesto por Dekeyser *et al.* (1990) y tampón de electroporación propuesto por Fromm *et al.* (1986).

Los mayores valores de expresión del gen *GUS* se obtuvieron en los tratamientos electroporados con el tampón de electroporación Dekeyser *et al.* (1990), con un 37.31 y 26.41% de agregados con actividad transiente, con respecto a los tratamientos electroporados con tampón B, los cuales se comportaron con valores de actividad transiente de 23.86 y 15.15%, respectivamente.

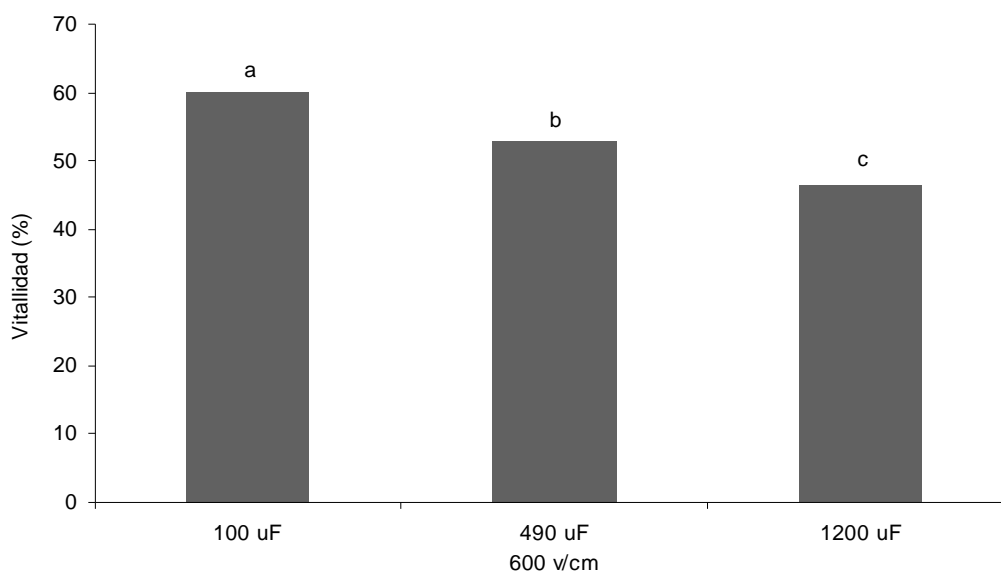
El porcentaje alcanzado en la actividad transiente del gen *GUS* para cada tratamiento es reflejo del efecto de la composición del tampón de electroporación. Con iguales condiciones de electroporación se observó que el tampón BEP-A permitió una mayor estabilidad celular con respecto al tampón BEP-B, de ahí que los valores de actividad transiente sean superiores. Según Rathus (1992b), los factores composición y concentración iónica, pH y osmolaridad son importantes para obtener un sistema eficiente para la expresión transiente y estable de tejidos a transformar.

De acuerdo con los resultados se aprecia que el tampón de electroporación Dekeyser *et al.* (1990) fue el más adecuado para realizar experiencias de electroporación en suspensiones celulares embriogénicas de café cultivar Caturra rojo.

### Expresión transiente del gen *GUS* en suspensiones celulares embriogénicas electroporadas

Teniendo en cuenta los resultados previos se realizó este ensayo en el cual se incluyeron distintos valores de capacitancia (100, 490 y 1200  $\mu\text{F}$ ), una fuerza de campo de  $600 \text{ V cm}^{-1}$  con el empleo de tampón de electroporación propuesto por Dekeyser *et al.* (1990) con el objetivo de determinar los valores de actividad transiente del gen *GUS* en las suspensiones celulares electroporadas (Figura 4).

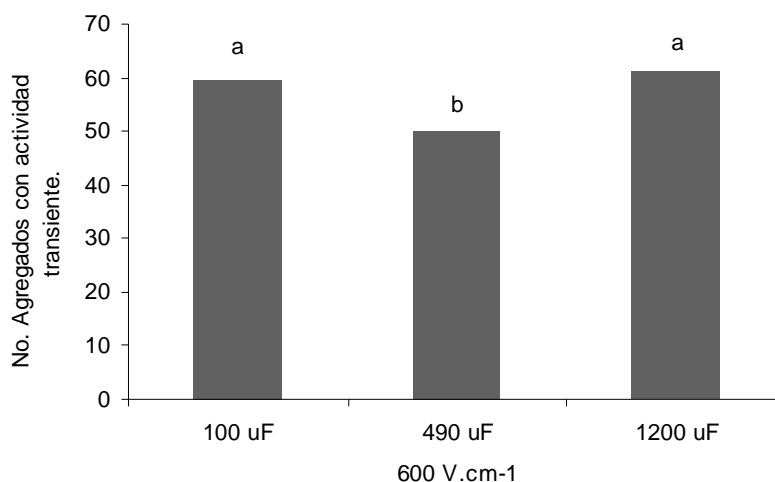
Los mayores valores de vitalidad (60.22%) se obtuvieron con una capacitancia de 100  $\mu\text{F}$ , y al aplicarse 490 y 1 200  $\mu\text{F}$  se alcanzaron valores de vitalidad de 52.95 y 46.37%, respectivamente. Las diferencias pueden deberse a los tiempos de descarga aplicados, mientras mayor es el tiempo de descarga aplicada a la suspensión celular mayor tiempo es aplicado el pulso eléctrico, lo cual provoca una desestabilización a nivel de la membrana lipídica y pérdida de actividad de las proteínas que componen dicha membrana y es menor la probabilidad de recuperación de la membrana celular. A las 48 y 72 horas de cultivo celular se apreció el comienzo del proceso de recuperación de los cultivos celulares electroporados.



\* Barras con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas para  $p < 0.05$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan

Figura 4. Vitalidad de suspensiones celulares embriogénicas de café electroporadas con diferentes valores de capacitancia.





\* Barras con letras distintas en una misma columna indican diferencias significativas para  $p < 0.01$  según la prueba de rangos múltiples de Duncan

Figura 5. Expresión transiente del gen *GUS* en suspensiones celulares embriogénicas de café electroporadas con distintos tiempos de descarga.

Similares resultados obtuvo Pescitelli (1995), con bajos valores de capacitancia y por lo tanto un menor tiempo de descarga en suspensiones celulares obtenidas a partir de callos tipo II de maíz (*Zea mays* L.)

También se manifestaron diferencias significativas en cuanto a la expresión transiente del gen *GUS* (Figura 5).

En los agregados celulares electroporados con una capacitancia de 100 y 1 200  $\mu\text{F}$  se observó una mayor actividad transiente del gen *GUS* (59.37 y 61.01%) con respecto al tratamiento electroporado con una capacitancia de 490  $\mu\text{F}$  donde los valores obtenidos fueron de un 50.0%.

Aunque no existieron diferencias respecto a la expresión del gen *GUS* en los tratamientos electroporados con 100  $\mu\text{F}$  (42 msec) y 1200  $\mu\text{F}$  (499 msec); es recomendable emplear 100  $\mu\text{F}$ , con el objetivo de obtener una mayor efectividad en el proceso de transformación, pues al aplicar mayores capacitancias es necesario emplear mayores tiempos de descarga, y esto se revierte en una mayor mortalidad celular. Al aplicarse a la membrana celular un pulso eléctrico durante un tiempo muy prolongado, puede traer consigo que la desestabilización de la membrana sea irreversible y con ello ocasionar mortalidad celular.

Similares resultados obtuvo Rathus (1992a) al electroporar protoplastos de caña de

azúcar (*Saccharum officinarum* L.) con una fuerza de campo de 385  $\text{V cm}^{-1}$  y un tiempo de descarga de 10 msec obtuvo una máxima actividad transiente de la clorafenicol acetil transferasa (CAT) y la vitalidad celular es mínima, con respecto a tratamientos con menores tiempos de descarga. La aplicación de la electroporación a células intactas y la obtención de actividad transiente también ha sido descrita por Arencibia (1995), el cual electroporó células intactas de caña de azúcar obtenidas a partir de callos embriogénicos.

Al aplicar una fuerza de campo de 600  $\text{V cm}^{-1}$  y una capacitancia de 100  $\mu\text{F}$ , se obtuvo la combinación de parámetros eléctricos adecuados para obtener valores de un 59.37% de expresión transiente del gen *GUS* en suspensiones celulares embriogénicas de café cultivar Caturra rojo.

## REFERENCIAS

- Afreen, F, Zobayed SMA, Kozait (2002) Photoautotrophic culture of *Coffea arabusta* somatic embryos: ability and growth of different stage embryos. *Annals of Botany* 90: 11-19
- Albarran, J, Bertrand B, Lartaud M, Etienne H (2005) Cycle characteristics in a temporary immersion bioreactor affect regeneration, morphology, water and mineral status of coffee (*Coffea arabica*) somatic embryos. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 81: 27-36

- Arencibia, A, Molina P, De la Riva G, Selman-Housein G (1995) Production of transgenic sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plant by intact cell electroporation. *Plant Cell Reports* 14: 305 - 309
- Barton, CA, Adams T L, Zarowitz M A (1991) Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants. *Biotechnology . ASIC 14<sup>e</sup> Colloque San Francisco*, p. 460-464
- Dekeyser R A, Claes B, De Rycke RMU, Habets ME, Van Montagu M C, Caplan A B. 1990. Transient gene expression in intact and organized rice tissues. *Plant Cell* 2: 591-602
- Fromm, ME, Taylor L P, Walbot V (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* 319: 791-793
- Jefferson, RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1988) Gus fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBOJ* 6: 3901-3907
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15: 473-497
- Pescitelli, SM, Sukhapinda K (1995) Stable transformation via electroporation into maize type II callus and regeneration of fertile transgenic plants. *Plant Cell Reports* 14: 712-716
- Rathus, C, Birch RG (1992a) Optimization of conditions for electroporation and transient expression of foreign genes in sugar cane protoplasts. *Plant Science* 81: 65-74
- Rathus C, Birch RG (1992b) Stable transformation of callus from electroporated sugarcane protoplast. *Plant Science* 82: 81-89
- Spiral, J, Thierry C, Paillard M, Petiard V (1993) Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. *CR Acad. Sci. Paris*, t 316, Série III, p. 1-6
- Staritsky G (1970) Embryoid formation in callus tissues of coffee. *Acta Bot. Neerl.* 19: 509-514
- Widholm JM (1972) The use of fluorescein diacetate and phloxine B for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47: 189-194