

Efecto de los agentes selectivos kanamicina y sulfadiacina sobre el proceso de embriogénesis somática en *Coffea arabica* cv. Caturra rojo

Raúl Barbón*, Elio Jiménez, Alina Capote, Víctor Gil, Barbara 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, Cuba. CP 54830. e-mail: rabaro8@yahoo.es, raulb@ibp.co.cu

RESUMEN

Se estudió el efecto de kanamicina y sulfadiacina como marcadores de selección en la primera fase de la transformación genética del café (*Coffea arabica*). Se emplearon suspensiones celulares embriogénicas de café de la variedad Caturra rojo. En la fase de diferenciación de los embriones somáticos se realizó la selección en medio de cultivo líquido con una densidad de 0.5 gramos de masa fresca por litro (gMF.l⁻¹) y en medio de cultivo semisólido se colocaron grupos de agregados celulares con una masa fresca de 50 mg por placa de Petri. En la germinación se utilizaron embriones somáticos en etapa de torpedo. Los agentes selectivos empleados fueron kanamicina (25, 50 y 100 mg.l⁻¹) y sulfadiacina (10, 20 y 30 mg.l⁻¹). Se evaluó la masa fresca y el número de embriones somáticos para la fase de diferenciación y en la fase de germinación el número de embriones somáticos germinados. En la diferenciación se observó que los tratamientos con kanamicina tanto en medio de cultivo líquido como semisólido, se presentó multiplicación de los agregados celulares y formación de embriones somáticos. Sin embargo, con el empleo de la sulfadiacina a partir de la concentración mínima de 10 mg.l⁻¹ se apreció un efecto inhibitorio sobre los agregados celulares en medio de cultivo líquido y semisólido. En la fase de germinación, la supervivencia de los embriones somáticos colocados en medio de cultivo con kanamicina fue 45.7% con una germinación entre 28.5 y 34.1% con respecto al control que tuvo un 71% de supervivencia y una germinación de 37.1%. En el caso de la sulfadiacina en la fase de germinación, aunque hubo supervivencia en las concentraciones de 10 y 20 mg.l⁻¹ con valores entre 11.4 y 5.7% respectivamente, no se logró la germinación total de los embriones somáticos. Con 30 mg.l⁻¹ de sulfadiacina hubo una inhibición total de la germinación y mortalidad de los embriones somáticos.

Palabras clave: agente selectivo, embrión somático, germinación, suspensión celular

ABSTRACT

It was studied the effect of the kanamycin and sulfadiazin like selection markers in the first phase of the genetic transformation of coffee (*Coffea arabica*). Embryogenic cell suspensions of coffee of the variety caturra rojo were used. In the differentiation phase of the somatic embryos, the selection in liquids medium was carried out using a density of 0.5 grams of fresh mass for liter (gMF.l⁻¹) and semisolid culture medium, groups of cell aggregates with a fresh mass of 50 mg were placed in Petri dishes. Torpedo somatic embryos were used in the germination phase. The agents selective were kanamycin (25, 50 and 100 mg.l⁻¹) and sulfadiazin (10, 20 and 30 mg.l⁻¹). It was evaluated the fresh mass and number of somatic embryos for the differentiation phase and for the germination phase, the number of somatic embryos germinated. In the differentiation process was observed that the treatments with kanamycin in liquid and semisolid culture medium, was presented multiplication of the cell aggregate and the formation of somatic embryos. I did not seize with the use of the sulfadiazin where starting from the concentration minimum of 10 mg.l⁻¹ an inhibitory effect is presented on the embryogenic cell suspension. The survival of the somatic embryos cultivated with kanamycin was 45.7% with a germination among 28.5-34.1% with regard to control treatment who had 71% of survival and 37.1% of germination. In the case of the sulfadiazin, although there was survival in the doses of 10 and 20 mg.l⁻¹ with values between 11.4 and 5.7% respectively, the germination of the somatic embryos was not achieved. There was with 30mg.l⁻¹ of sulfadiazin a total inhibition of the germination.

Key words: cell suspension, germination, selective agent, somatic embryos

INTRODUCCIÓN

El café es un cultivo de gran importancia para muchos países en los cuales constituye uno de los principales productos de exportación. La manipulación de nuevas características de importancia económica y tecnológica, como la resistencias a plagas y enfermedades, es un proceso largo, a causa del ciclo biológico de las especies perennes, tanto autógamas o alógamas (Santana, 1992).

La amenaza eminente de enfermedades y plagas 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 a dichas enfermedades y plagas (Fernández, 2003).

Una posibilidad sería la combinación de la potencialidad de la embriogénesis somática como sistema de regeneración-propagación y algún método de transformación genética.

En diversas especies de café, las técnicas de cultivo de tejidos están bien establecidas en distintos órganos, excepto la raíz, siendo la embriogénesis somática la principal vía de regeneración ya que presenta la mayor tasa de multiplicación (Hermoso-Gallardo y Ménéndez-Yuffa, 2000; Fernández, 2003).

El desarrollo de sistemas de regeneración *in vitro* eficientes en cultivares de interés económico como Caturra rojo (*C. arabica*) y Robusta (*C. canephora*), así como métodos para su transformación genética es una prioridad en la estrategia de mejoramiento genético de este cultivo.

Por ello, el establecimiento de un sistema de transformación eficiente requiere un sistema de cultivo de alta frecuencia de regeneración y un sistema de transferencia genético sencillo, económico y reproducible.

Según Fernández (2003), son escasos los trabajos publicados para el café en transformación genética. Con el método indirecto usando *Agrobacterium*, *Spiral et al.* (1993) transformaron *C. canephora* (Robusta) mediante *A. rhizogenes* y lograron regenerar por embriogénesis somática indirecta plántulas con expresión transitoria del gen *gus*.

En un sistema de transformación eficiente, es requisito primordial la transferencia de productos genéticos que permitan la selección e identificación de individuos transformantes. Uno de los productos genéticos son los genes marcadores de selección que por lo general son antibióticos o herbicidas. Entre los genes marcadores de selección más empleados están *nptII*, *bar*, *hpt* y *sul* (Gil *et al.*, 1998). Algunos de ellos funcionan también como genes reporteros porque se dispone de ensayos enzimáticos que permiten monitorear su expresión, por ejemplo el gen *nptII* (Kahl y Welsing, 1993).

El método más utilizado para la selección de tejidos y/o plantas supuestamente transformados, se fundamenta en la exposición de mismos a compuestos tales como antibióticos, que inhiben el normal crecimiento de las células o los tejidos no transformados, por esta razón es necesario determinar el agente selectivo y la concentración ante los cuales los tejidos o las células no transformadas no manifiestan crecimiento.

Sobre la base de esta problemática es que se realizó el presente trabajo que tuvo como objetivo evaluar el efecto de los antibióticos kanamicina y sulfadiacina como marcadores de selección en el sistema de embriogénesis somática en *Coffea arabica* variedad Caturra rojo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suspensiones celulares embriogénicas y embriones somáticos en etapa de torpedo de café variedad Caturra rojo se emplearon para realizar las experiencias de determinación de la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos kanamicina y sulfadiacina.

Los agentes selectivos, el procedimiento de preparación y esterilización de las soluciones patrones fueron los siguientes:

A) Kanamicina (SIGMA, Chemical Co): Solución a una concentración de 100 mg.ml⁻¹ y se empleó como solvente agua desionizada.

B) Sulfadiacina (SIGMA, Chemical Co): Solución a una concentración de 25 mg.ml⁻¹ y se utilizó como solvente dimetilsulfóxido (DMSO).

C) Estos antibióticos, utilizados para los diferentes ensayos de marcadores de selección, fueron esterilizados por filtración, a través de una membrana ANALIPORE® (OSI) de celulosa estéril, con una porosidad de 0.22 µm.

Efecto de los antibióticos sulfadiacina y kanamicina sobre el proceso de diferenciación

Se estudió la acción de la sulfadiacina y la kanamicina como marcadores de selección sobre agregados celulares embriogénicos que fueron colocados tanto en medio de cultivo líquido y semisólido compuesto por las sales basales del medio de cultivo propuesto por Murashige y Skoog (1962) (MS) + 1.0 mg.l⁻¹ 6-BAP+ 3% Sacarosa.

En ambos tratamientos, la selección se realizó al aplicar tres concentraciones de kanamicina (25, 50 y 100 mg.l⁻¹) y tres de sulfadiacina (10, 20 y 30 mg.l⁻¹), con 20 réplicas por cada tratamiento, que incluyeron un control con el mismo número de réplicas. La densidad de inoculación para los tratamientos con medio de cultivo líquido fue de 1.0 gMF.l⁻¹, mantenida en agitador orbital a 110 r.p.m., con una temperatura de 26°C y en condiciones de oscuridad. Se realizó la renovación del 50% del medio de cultivo con una frecuencia de siete días con su respectiva concentración del agente selectivo. Para las variantes con medio de cultivo semisólido se utilizaron cinco grupos de agregados celulares, de 50.0 miligramos (mg) de masa fresca cada uno, en una placa de Petri (90.0 mm de diámetro), se dosificó un volumen de 15 ml de medio de cultivo por placa de Petri estéril y fue solidificado con 5 g.l⁻¹ de agar (SIGMA, Chemical Co.).

Luego de nueve semanas de cultivo, se evaluó el incremento en masa fresca y el número total de embriones somáticos al final del proceso de diferenciación en medios de cultivo líquido y semisólido. Los conteos de los embriones somáticos en los dos tratamientos se hicieron por observación a través de un microscopio estereoscópico modelo Leica WILD M8.

Los resultados fueron procesados estadísticamente empleando un análisis de varianza de clasificación simple y la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Influencia de la sulfadiacina y la kanamicina en la germinación de embriones somáticos

En este segundo ensayo, se evaluó el efecto de los agentes selectivos sobre la germinación de embriones somáticos. Se emplearon embriones somáticos en etapa de torpedo, obtenidos a partir del proceso de diferenciación de suspensiones celulares embriogénicas. Se colocaron cinco embriones somáticos por frasco con medio de cultivo para la germinación ($\frac{1}{2}$ MS+0.25 mg.l⁻¹ 6-BAP+1.0% Sacarosa). Cada frasco de cultivo (frasco de vidrio de 250 ml de volumen total) se le añadieron 30 ml de medio de cultivo.

La selección se realizó con las mismas concentraciones de kanamicina y sulfadiacina que las empleadas en la selección en fase de diferenciación, cada tratamiento se replicó doce veces y se incluyó un tratamiento control con el mismo número de réplicas.

Para lograr la germinación de los embriones somáticos, estos fueron colocados en cámaras de crecimiento de luz solar con una intensidad luminosa que osciló entre 42-68 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y una temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego de ocho semanas, se evaluaron el número embriones somáticos con vitalidad y que germinaron totalmente.

Los resultados experimentales fueron procesados estadísticamente mediante un ANOVA de clasificación simple. En el caso de los datos relacionados con la germinación de los embriones somáticos fue necesario aplicarles la transformación raíz cuadrada de $X+0.5$ para procesarlos. La comparación de final de los tratamientos se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de los antibióticos sulfadiacina y kanamicina en el proceso de diferenciación

En todos los tratamientos a los cuales se les aplicaron las diferentes concentraciones del agente selectivo kanamicina, tanto para medio de cultivo líquido como semisólido, se manifestó crecimiento y multiplicación de los agregados celulares. Con una concentración de 100 mg.l⁻¹ de kanamicina hubo una disminución de la multiplicación celular de los agregados embriogénicos colocados en medios de cultivo semisólidos (Figura 1).

En medio de cultivo líquido los primeros embriones somáticos se observaron a los 21 días de cultivo tanto en el tratamiento control como en los tratamientos con kanamicina. Los embriones somáticos en etapa torpedo se apreciaron a los 37 días de cultivo en el medio de cultivo líquido y en medio de cultivo semisólido la aparición de estos ocurrió a los 33 días.

En los tratamientos realizados en medio de cultivo líquido, con sulfadiacina, los primeros embriones somáticos no aparecieron hasta los 32 días de cultivo y estos no continuaron su desarrollo permaneciendo en etapa globular.

Se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos para las variables número de embriones somáticos y masa fresca (Tabla 1), en el caso de la kanamicina en medio de cultivo líquido, con la concentración mínima se observó una producción de 17.65×10^3 ES.l⁻¹ y una masa fresca de 15.5 gMF.l⁻¹, mientras que en el grupo control se formaron 26.35×10^3 ES.l⁻¹ y una masa fresca de 52.0 gMF.l⁻¹. En las concentraciones mayores, 50 y 100 mg.l⁻¹, tampotampoco hubo inhibición total del crecimiento celular, en las cuales hubo una formación de 5.0×10^3 y 3.5×10^3 ES.l⁻¹, y un aumento de 8.95 y 5.10 gMF.l⁻¹ respectivamente.

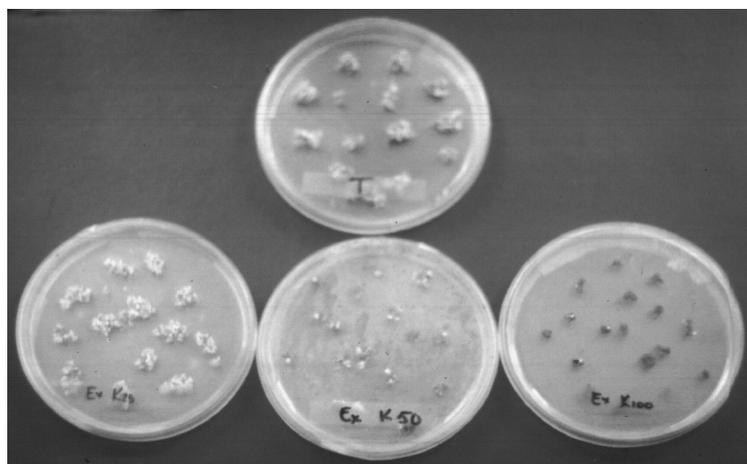


Figura 1. Agregados celulares embriogénicos de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo colocados en medio de cultivo semisólido a distintas concentraciones de Kanamicina (25, 50 y 100 mg.l⁻¹) a los 35 días de cultivo.

Tabla 1. Número de embriones somáticos y masa fresca obtenidos en diferentes estados físicos del medio de cultivo y concentraciones de los agentes selectivos (sulfadiacina y kanamicina) en el proceso de diferenciación de suspensiones embriogénicas de *Coffea arabica*, variedad Caturra rojo a los 37 días de cultivo.

Tratamientos	Concentración (mg.l)	Medio de cultivo líquido		Medio de cultivo semisólido	
		No. ES.l ⁻¹ (x 10 ³)	Masa Fresca (gMF.l ⁻¹)	No.ES./ 50 mg	Masa Fresca (gMF.l ⁻¹)
Control	0	26.35 a	52.0 a	85.0 a	1.15 a
	25	17.65 b	15.5 b	50.0 b	0.91 b
Kanamicina	50	5.00 c	8.95 c	38.7 c	0.85 c
	100	3.50 d	5.10 c	27.0 de	0.72 d
Sulfadiacina	10	1.10 d	2.80 d	10.0 e	0.65 de
	20	0.09 e	1.40 d	0 f	0.54 e
	30	0.05 e	0.75 d	0 f	0.54 e
	X+E.E	7.90 + 0.17	12.35+ 0.12	30.10 +0.28	0.76 + 0.02
C.V.	18.02 %	5.10 %	17.12 %	8.11 %	

* Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la prueba de rangos múltiples de Duncan.

En el medio de cultivo semisólido con kanamicina el comportamiento fue similar a los tratamientos realizados en medios de cultivo en estado líquido, con respecto a la no inhibición del crecimiento, de los agregados celulares plaqueados. Se observó que las diferencias son menos marcadas entre los tratamientos en medio de cultivo semisólido con respecto al comportamiento en los agregados celulares inoculados en Erlenmeyers. Al incrementarse la concentración de kanamicina de 25 a 100 mg.l⁻¹ hubo un decrecimiento en 5.04 veces en la producción de embriones somáticos y 3.03 veces en la masa fresca en el caso de los tratamientos realizados en agitador orbital. Sin embargo, en medio de cultivo semisólido sólo el decrecimiento fue de 1.8 y 1.26 veces para la producción de embriones somáticos y la masa fresca respectivamente. Ello indicó que en el medio de cultivo en estado líquido el efecto selectivo de la kanamicina fue más marcado, tal vez debido a que la acción del agente selectivo es más uniforme al estar todos los agregados celulares embriogénicos en contacto con el mismo. Por el contrario en los tratamientos realizados en medio de cultivo semisólido, sólo una parte de los agregados celulares está en contacto con el agente selectivo y parte de los agregados escapan a la influencia de este.

Resultados similares se han obtenido para el café y otras especies. Según Barton (1991), no pudo seleccionar los posibles transformantes utilizando concentraciones superiores a 100 mg.l⁻¹. Similares resultados obtuvo De García (1995), la cual observó un crecimiento celular con concentraciones de 400 mg.l⁻¹ de kanamicina.

Fitch (1992) observó el efecto de diferentes antibióticos sobre el crecimiento de tejidos de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.), y determinó que la

kanamicina posee un efecto menos inhibitorio que otros antibióticos como la higromicina. Pesticelli y Sukhapinda (1995) al utilizar concentraciones de 300 mg.l⁻¹ de kanamicina como agente de selección sobre explantes callos tipo II de maíz (*Zea mays* L.), observaron que no había inhibición del crecimiento. Sin embargo, en otras especies se emplea la kanamicina como un excelente agente selectivo y se aplica a concentraciones bajas. Du (1994), utilizó una concentración no mayor de 50 mg.l⁻¹ para seleccionar en callos de alfalfa; mientras que Barna (1995), utilizó solamente 50 mg.l⁻¹ de kanamicina para la selección de callo y embriones somáticos en *Lathyrus sativus*.

En los tratamientos en medio de cultivo líquido y semisólido, a los cuales se les aplicó sulfadiacina se observaron diferencias con respecto al tratamiento control (Figura 2.), a partir de una concentración de 10 mg.l⁻¹ se determinó un proceso inhibitorio que fue más notable en los tratamientos con 20 y 30 mg.l⁻¹, donde no se encontraron diferencias entre ellos y donde el efecto inhibitorio fue completo. En medio de cultivo semisólido a concentraciones de 20.0 y 30.0 mg.l⁻¹ de sulfadiacina no hubo formación de embriones somáticos ni incremento en la masa fresca (Figura 2).

Los embriones somáticos obtenidos en los distintos tratamientos en medio de cultivo selectivo fueron colocados en un medio de cultivo de germinación sin antibióticos y en condiciones de iluminación con el objetivo de determinar su viabilidad (Tabla 2). Los embriones somáticos formados en los tratamientos en medio de cultivo con kanamicina germinaron entre 44.0 y 48.0 % para los formados en medio de cultivo selectivo líquido; mientras que, germinaron 30 y 44.1 % los embriones somáticos formados en medio de cultivo selectivo semisólido, con respecto al control donde la germinación fue de un 60.0 %.

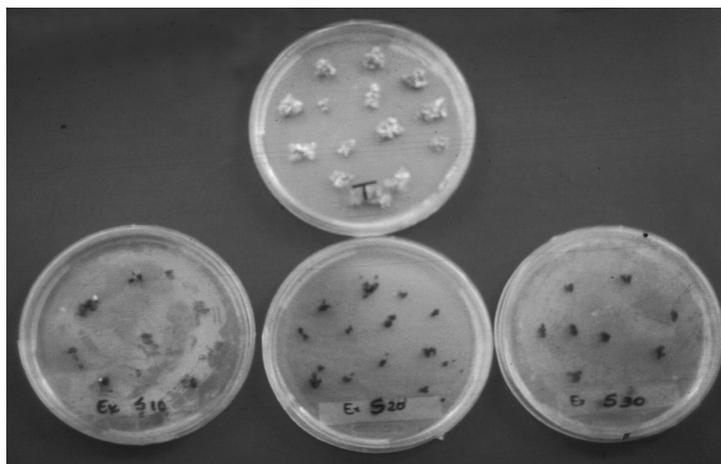


Figura 2. Agregados celulares embriogénicos de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo colocados en medio de cultivo semisólido a distintas concentraciones de Sulfadiacina (10, 20 y 30 mg.l⁻¹) a los 35 días de cultivo.

Tabla 2. Número de embriones somáticos germinados de *Coffea arabica* cv, Caturra rojo en medio de cultivo de germinación sin agentes selectivos de los embriones somáticos provenientes de los tratamientos con agentes selectivos a los 40 días de cultivo.

Tratamientos	Germinación				
	Concentración (mg.l ⁻¹)	Medio de cultivo Líquido		Medio de cultivo Semisólido	
		No. Emb. Somáticos	%	No. Emb. Somáticos	%
Control	0	3.0 a	60.0	2.8 a	56.0
	25	2.4 b	48.0	2.2 b	44.1
Kanamicina	50	2.2 b	48.0	2.2 b	44.1
	100	1.8 c	44.0	1.5 c	30.0
Sulfadiacina	10	0.2 d	4.0	0.16 d	3.2
	20	0 e	0	-	-
	30	0 e	0	-	-
	X+ E.E	1.37 + 0.08		1.77 + 0.03	
	C.V.	11.33 %		14.20 %	

* Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la Prueba de rangos múltiples de Duncan.

En el caso de la sulfadiacina, en los embriones somáticos procedentes del tratamiento con 10 mg.l⁻¹ el porcentaje de germinación fue muy bajo (4.2 % para los embriones somáticos obtenidos en medio de cultivo líquido y 3.2 % para los de medio de cultivo semisólido). Los tratamientos con 20 y 30 mg.l⁻¹ en medio de cultivo sólido no formaron embriones somáticos y los escasos embriones somáticos obtenidos en las concentraciones de 20 y 30 mg.l⁻¹ de sulfadiacina en medio de cultivo líquido (90 y 50 ES.l⁻¹ respectivamente) no germinaron, lo que confirma que estas concentraciones del agente selectivo resultaron letales.

Teniendo en cuenta estos resultados en los experimentos de transformación de cafeto, variedad Caturra rojo, se debe emplear como agente selectivo la sulfadiacina a una concentración de 30 mg.l⁻¹ donde el efecto inhibitorio del proceso embriogénico es total, tanto en medio de cultivo semisólido como en medio de cultivo líquido. Aunque desde el punto de vista

práctico el medio de cultivo líquido presenta mayores ventajas por la facilidad en su manipulación y la posibilidad de trabajar con grandes cantidades de agregados celulares y embriones somáticos en pequeños volúmenes de medio de cultivo.

Efecto de la sulfadiacina y la kanamicina en la germinación de los embriones somáticos

Los embriones somáticos expuestos a las diferentes concentraciones de kanamicina no presentaron ningún cambio o alteración morfológica debido a la acción del antibiótico. Los embriones somáticos del tratamientos control y con kanamicina adquirieron una completa coloración verde a las tres semanas de cultivo y se apreciaba el comienzo del proceso de desarrollo de los brotes apicales y radicales. A las ocho semanas, muchos embriones somáticos habían desarrollado los primeros pares de hojas. Los embriones somáticos expuestos a las diferentes

concentraciones de sulfadiacina, a los 15 días tomaron una coloración parda, la cual se mantuvo durante todo el cultivo, incluso aquellos embriones somáticos que germinaron.

La germinación de los embriones somáticos en medio de cultivo con kanamicina alcanzó valores de un 56.6 %, con una germinación entre un 30.1 – 40.0 % con respecto al control, que tuvo un 84.0% de supervivencia y una germinación de 52.0 % (Tabla 3). En el caso de la sulfadiacina, aunque hubo una supervivencia en las concentraciones de 10 y 20 mg.l⁻¹ con valores entre 12.0 y 6.6% respectivamente, no se logró la total germinación de los embriones somáticos. Mientras que con 30 mg.l⁻¹ de sulfadiacina hubo una inhibición total de la germinación.

De acuerdo con Spiral (1993), el cual describe la obtención de plántulas de *Coffea canephora* P. cv.

Robusta transformada mediante *Agrobacterium rhizogenes* y seleccionados los embriones somáticos transformados con el antibiótico kanamicina a una concentración de 400 mg.l⁻¹, observó que los embriones somáticos de café son altamente tolerantes a altas concentraciones de kanamicina. Resultados similares obtuvieron Pesticelli y Sukhapinda (1995), al utilizar una concentración de 300 mg.l⁻¹ en callos tipo II sin que hubiera inhibición del crecimiento.

Estos resultados confirmaron que la kanamicina no es un antibiótico apropiado para ser utilizado como agente selectivo para los experimentos de transformación genética en esta especie. Sin embargo, la sulfadiacina, a una concentración de 30 mg.l⁻¹, resultó un agente selectivo efectivo tanto para la fase de diferenciación y germinación de los embriones somáticos de cafeto en la variedad Caturra rojo.

Tabla 3. Número de embriones somáticos de *Coffea arabica* cv. Caturra rojo germinados a diferentes concentraciones de antibióticos (sulfadiacina y kanamicina) durante 40 días de cultivo.

Tratamientos	Concentración (mg.l ⁻¹)	Supervivencia		Germinación	
		No. Emb. Somáticos	%	No. Emb. Somáticos	%
Control	0	4.2 a	84	2.60 a	52
	25	2.83 b	56.6	2.00 b	40
Kanamicina	50	2.83 b	56.6	1.83 b	36.6
	100	2.66 b	53.2	1.50 c	30.1
Sulfadiacina	10	0.6 c	12.0	0 d	0
	20	0.33 d	6.6	0 d	0
	30	0 e	0	0 d	0
	X+E.E		1.92 + 0.11		1.13 + 0.06
	C.V.		12.33 %		9.87 %

* Medias con letras distintas en una misma columna difieren estadísticamente para $p < 0.05$ según la Prueba de rangos múltiples de Duncan.

CONCLUSIONES

Teniendo en cuenta estos resultados en los experimentos de transformación de cafeto, variedad Caturra rojo, se debe emplear como agente selectivo la sulfadiacina a una concentración de 30 mg.l⁻¹ donde el efecto inhibitorio del proceso embriogénico es total, tanto en medio de cultivo semisólido como en medio de cultivo líquido. Aunque desde el punto de vista práctico el medio de cultivo líquido presenta mayores ventajas por la facilidad en su manipulación y la posibilidad de trabajar con grandes cantidades de agregados celulares y embriones somáticos en pequeños volúmenes de medio de cultivo. La kanamicina no es un antibiótico apropiado para ser utilizado como agente selectivo para los experimentos de transformación genética en esta especie. Sin

embargo, la sulfadiacina, a una concentración de 30 mg.l⁻¹, resultó un agente selectivo efectivo tanto para la fase de diferenciación y germinación de los embriones somáticos de cafeto en la variedad Caturra rojo.

REFERENCIAS

- Barna KS, Mehta SL (1995) Genetic transformation and somatic embryogenesis in *Lathyrus sativus*. J. Plant Biochemistry and Biotechnology 4: 68-71
- Barton CA, Adams TL, Zarowitz MA (1991) Stable transformation of foreign DNA into *Coffea arabica* plants. Biotechnology. ASIC 14^o Colloque, pp. 460 – 464. San Francisco
- De García, E, Menéndez A (1995) Propagación *in vitro* del cafeto híbrido 'Catimor', Caracas, Ven. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. 110 p.

- Du S, Erickson L, Bowley S (1994) Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Report 13: 330-334
- 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. Acta Científica Venezolana 54: 284-287
- Fitch M M (1990) Growth inhibition of embryogenic sugar cane callus culture by antibiotics. Ann. Rpt. Expt. Sta. Hawaiian Sugar Planters. Assoc.
- Hermoso-Gallardo L y Ménéndez-Yuffa (2000) Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. Acta Cient. Venez. 51:90-95
- Pescitelli SM y Sukhapinda K (1995) Stable transformation via electroporation into maize type II callus and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell Reports 14: 712-716
- Spiral J, Thierry C, Paillard M, Petiard V (1993) Obtention de plantules de *Coffea canephora* Pierre (Robusta) transformées par *Agrobacterium rhizogenes*. C.R. Acad. Sci. Paris, t. 316, Série III