

ESTUDIO DE LA RECALCITRANCIA A LA REGENERACIÓN CELULAR EN *Coffea arabica* (L).

Margarita Ivonne Garrido Gutiérrez*, Elba Reyes Maldonado e Iris Elvira Citlali Estrada García
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, IPN, Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Casco de Santo Tomás,
C.P. 11340. maguigarrido@yahoo.com*

Palabras clave: regeneración celular, café, DDRT-PCR.

Introducción. Las plantas o líneas celulares en las que no es posible obtener (regenerar a) embriones somáticos y/o brotes adventicios se denominan recalcitrantes. En *Coffea arabica* (L.), desde hace más de 20 años atrás, se informan metodologías para obtener embriones somáticos de la especie (1) debido a que la formación de éstos no es reproducible y pronto los cultivos *in vitro* se convierten en recalcitrantes (Loyola-Vargas, comunicación personal). Durante la inducción de embriones somáticos, por la vía indirecta, en varias especies vegetales (mono y dicotiledóneas, incluyendo a *C. arabica*), se obtienen dos tipos de callos: regenerables-disgregables y recalcitrantes-no disgregables. Hasta la fecha, no se ha determinado qué eventos moleculares son los que promueven tal efecto. La respuesta obtenida en los cultivos *in vitro* de café, da muestra de que existen etapas previas determinantes para alcanzar él o los estados que promuevan la aparición de células que sean capaces de regenerar.

El trabajo tiene la finalidad de analizar la expresión diferencial de algunos genes en los dos tipos de callos (regenerables-disgregables y recalcitrantes-no disgregables) derivados de hojas de *Coffea arabica* por medio de la técnica *differential display reverse transcription-polymerase chain reaction* (DDRT-PCR, 2).

Metodología. Los cultivos en suspensión de callos de *C. arabica* var. Gárnica se obtuvieron con el método propuesto por 3. El RNA de los mismos se extrajo siguiendo el procedimiento modificado del TRIzol®. Después de realizado el análisis del DDRT-PCR (2) con el iniciador de anclaje de una base T₁₁C y el arbitrario HOPA 20 (5'-GTTGCGATCC-3'), algunas bandas expresadas diferencialmente se clonaron en un vector TA (Original TA Cloning® Kit, Invitrogen). Posteriormente se secuenciaron con el estuche comercial Sequenase® 2.0 USB (Amersham) y la verificación de la expresión diferencial de las bandas se realizó por la técnica Dilución Limitante RT-PCR.

Resultados y discusión. En la figura 1 se muestran los tipos de callos obtenidos en los cultivos *in vitro* de *C. arabica* var. Gárnica. Callos que se disgregaron con facilidad (derecha) y callos cuyas células permanecieron unidas (izquierda) y así crecieron en los cultivos (Garrido-Gutiérrez, resultados no publicados). Los primeros mostraron células cuya morfología fue redonda, oblonga, ovalada, muy pocas células cilíndrico-alargadas. Los callos no disgregables se caracterizaron porque sus células fueron cilíndricas, muy alargadas en su gran mayoría, y en menor proporción con respecto a las células de los callos disgregables.

En la fig. 2 se muestra un acercamiento de una autorradiografía de un DDRT-PCR de los genes de los callos regenerables y recalcitrantes de café. Resultó evidente que existe una



Fig. 1. Callos no disgregables (izquierda) y disgregables (derecha).

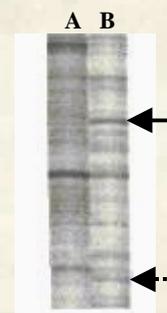


Fig. 2. Autorradiografía de un análisis DDRT-PCR de callos regenerables (A) y recalcitrantes (B).

expresión genética diferente en los callos regenerables y no regenerables. Éstos últimos expresaron mayor número de genes (fig. 2, B) con respecto a los callos regenerables (fig. 2, A). Algunos de las bandas (genes) expresadas diferencialmente (flechas en la fig. 2) se eluyeron de los geles del DDRT-PCR y, después de su clonación, se secuenciaron manualmente. El análisis de las secuencias obtenidas de las bandas arrojó que existen genes del metabolismo secundario en los callos recalcitrantes a la regeneración.

Conclusión. El metabolismo celular en los callos está relacionado con la recalcitrancia observada en los cultivos de café, particularmente la adquisición del metabolismo secundario. La alteración metabólica parece incidir en la obtención de callos no disgregables y recalcitrantes en los cultivos *in vitro* de café.

Agradecimiento. Esta investigación fue sustentada por una beca otorgada por el CONACyT a Garrido Gutiérrez.

Bibliografía. 1. Sondahl, M.R. y Sharp, W.R. 1977. High frequency induction of somatic embryos in cultured leaf explants of *Coffea arabica* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 81:395-408.

2. Liang, P., y Pardee, A. B. 1992. Differential display de eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Sci.* 257:967-971.

3. Van Bostel, J., y Berthouly, M. 1996. High frequency somatic embryogenesis from coffee leaves. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 44:7-17.