



**BIBLIOTECA ELECTRÓNICA**  
**de**  
**GEMINIS PAPELES DE SALUD**

<http://www.herbogeminis.com>

# EFFECTO DEL HERBICIDA GLUFOSINATO DE AMONIO EN DIFERENTES EXPLANTES DE *Coffea* *arabica* cv. Catimor

Rafael Fernandez Da Silva<sup>1</sup> y Andrea Menéndez Yuffá<sup>2</sup>

Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias. Instituto de Biología Experimental.

Postgrado en Botánica. Laboratorio de Clonación y Genética Vegetal.

Apartado 47114, Los Chaguaramos, Caracas 1041, Venezuela

e-mail: rafaelfer@telcel.net.ve<sup>1</sup>, amenendez@cantv.net<sup>2</sup>

Recibido: 30/03/04; Revisado: 20/06/04; Aceptado: 15/12/04

**RESUMEN:** Se evaluó la sensibilidad de distintos explantes (callo embriogénico, secciones foliares, embriones somáticos en estadio torpedo y células en suspensión) de *Coffea arabica* cv. Catimor al herbicida glufosinato de amonio (0,5; 1; 5 y 10 mg/L), con el fin de conocer la concentración óptima a utilizar de este agente selectivo en subsiguientes experimentos de transformación genética. Se determinó que, tanto en explantes foliares como en callo y en embriones somáticos, la inhibición del crecimiento se produce a partir de 1 mg/L del herbicida. Las células en suspensión presentaron una mayor resistencia al agente de selección, ya que la concentración inhibitoria del crecimiento fue de 5 mg/L. **Palabras clave:** café, callo embriogénico, embriones somáticos, células en suspensión, glufosinato de amonio.

## EFFECT OF THE HERBICIDE GLUFOSINATE AMMONIUM IN EXPLANTS OF *Coffea arabica* cv. Catimor

**ABSTRACT:** The sensitivity of different explants (embryogenic calli, leaf sections, somatic embryos in torpedo stage and cell suspensions) of *Coffea arabica* cv. Catimor to the herbicide glufosinate ammonium (0.5; 1; 5 and 10 mg/L) was determined. This will allow the establishment of optimal concentrations to be used in further genetic transformation experiments, using the gene *bar* as the selection marker. Growth of leaf sections, calli and somatic embryos was inhibited by 1 mg/L of the herbicide. Suspension-growing cells showed greater resistance to this selection agent, showing growth inhibition at glufosinate concentrations of 5 mg/L and higher. **Key Words:** Coffee, embryogenic callus, somatic embryos, cell suspensions, glufosinate ammonium.

## INTRODUCCION

El café (*Coffea arabica* L.) es un cultivo de gran importancia económica en el mundo, evidenciado por los millones de dólares que obtienen algunos países productores de Centro y Sur América, África y Asia<sup>11</sup>. Esta planta pertenece a la familia Rubiaceae y la especie más cultivada en Venezuela y en el mundo es *Coffea arabica* L.

El mejoramiento genético de esta planta puede abordarse tanto por métodos convencionales como biotecnológicos. Entre estos últimos se encuentra la ingeniería genética, que permite la incorporación de material genético foráneo específico a las plantas. El establecimiento de un sistema de transformación eficiente requiere de la disponibilidad de un explante competente para el proceso de transformación, un sistema de cultivo que permita una alta frecuencia de regeneración y un sistema de transferencia génica sencillo, exitoso, económico, reproducible, independiente del genotipo, y que inserte de manera estable la secuencia transgénica<sup>2</sup>.

En el café, los métodos de cultivo de tejidos están bien establecidos en las diversas especies y para los diferentes órganos excepto la raíz<sup>1</sup>. El sistema más eficiente es la inducción de embriogénesis somática a partir de secciones de hoja.

El establecimiento de un sistema de transformación genética requiere que la construcción genética a introducir tenga genes marcadores que permitan la selección de los tejidos transformados. El gen *bar* confiere resistencia al herbicida glufosinato de amonio y ha sido utilizado como gen de selección para la transformación genética de plantas.

El Bialaphos y la fosfotricina (PPT) son potentes herbicidas. El Bialaphos es un antibiótico tripéptido producido por *Streptomyces hygroscopicus*. Consiste de L-PPT (también conocido como glufosinato de amonio), un análogo del ácido L-glutámico, y dos residuos de L-alanina. Al remover estos residuos por peptidasas, PPT es un potente inhibidor de la glutamina sintetasa (GS). Esta enzima tiene un papel esencial en la asimilación de amonio y en el metabolismo del nitrógeno en las plantas. Esta es la única enzima en las plantas que puede destoxificar el amonio liberado por la

reducción de nitrato, la degradación de aminoácidos y la fotorespiración. La inhibición de la GS por PPT causa una acumulación rápida de amonio que lleva a la muerte de las células de la planta. PPT es sintetizado químicamente (Basta<sup>®</sup>, Hoechst AG) mientras que el bialaphos es producido por fermentación de *S. hygroscopicus* (Herbiace<sup>®</sup>, Meiji Seika Ltd). El gen *bar* (por "bialaphos resistance gene") fue clonado de *S. hygroscopicus* y está involucrado en la biosíntesis de bialaphos. Este gen codifica una fofinotricin acetiltransferasa (PAT) que acetila el grupo NH<sub>2</sub> libre de la PPT, y así evita la autotoxicidad en el organismo productor<sup>4</sup>.

La utilización del gen *bar* como marcador de selección en experimentos de transformación genética de café requiere que primero se determinen las dosis adecuadas de glufosinato de amonio para observar el efecto inhibitorio del crecimiento sobre diferentes explantes. Por lo tanto el objetivo de el presente trabajo fue determinar las dosis mínimas de glufosinato de amonio que inhiben el crecimiento de diferentes tejidos de café, con el fin de usar este herbicida como agente selectivo de tejidos de café transformados con el gen *bar*.

## MATERIALES Y METODOS

Se emplearon plantas de *Coffea arabica* cv. Catimor, del cruce *C. arabica* cv. Caturra x Híbrido de Timor (cruce natural entre *Coffea arabica* x *Coffea canephora*), el cual es un cultivar que presenta resistencia a la roya del café y ha mostrado un buen rendimiento agronómico en las condiciones agroecológicas existentes en Venezuela.

Como explantes se utilizaron secciones de hoja, callo embriogénico, embriones somáticos en fase torpedo y células en suspensión (cultivos de 4 semanas) en presencia de distintas concentraciones del herbicida Glufosinato de Amonio (0.5 (T1); 1 (T2); 5 (T3) y 10 (T4) mg/l). Como fuente de glufosinato de amonio se utilizó el herbicida comercial Finale<sup>®</sup> (AgrEvo, Venezuela, Maracay-Edo.Aragua). Se sembraron 30 secciones foliares, embriones somáticos y trozos de callo embriogénico (0,2 g c/u) por tratamiento y 3 cultivos celulares de 50 ml c/u (1 g de inóculo) para cada tratamiento. Los tres primeros explantes fueron cultivados en un medio de inducción de callo<sup>6</sup> constituido por: sales de Murashige y Skoog<sup>10</sup> diluidas a la mitad, 10 mg/l Tiamina-HCl, 100 mg/l Mio-Inositol, 35 mg/l Cisteina-HCl, 30 g/l de sacarosa, 1 mg/l de ácido 2,4-dicloro-fenoxiacético (2,4-D), 8 mg/l de Bencilaminopurina (BA) y 8 g/l de agar, ajustándose el pH a 5,8. Los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C. Los cultivos de células en suspensión se obtuvieron siguiendo el protocolo de Hermoso-Gallardo y Menéndez-Yuffá<sup>8</sup>, y fueron cultivadas en 50 ml de un medio líquido con la misma composición básica sin 2,4-D y suplementado con 8 mg/l de BA. También se evaluó el efecto de las mismas concentraciones del herbicida

sobre la germinación de embriones somáticos tipo torpedo, cultivados en un medio sin hormonas.

El efecto del herbicida glufosinato de amonio se evaluó según se describe a continuación:

*Secciones foliares y embriones somáticos tipo torpedo colocados en medio de inducción de callo:* se cuantificaron los explantes que desarrollaron callos y aquellos que se necrotizaron durante el período de observación de 4 semanas.

*Callo:* se determinó el peso fresco (PF) y peso seco (PS) inicial y final de los explantes durante cuatro semanas, se calculó la diferencia entre el peso inicial y final. Con estos valores se estimó el crecimiento por porcentaje de incremento de peso.

*Embriones somáticos tipo torpedo colocados en medio de germinación:* se determinó el porcentaje de germinación y se observó la oxidación de los tejidos transcurridas cuatro semanas de cultivo.

*Suspensiones celulares:* se evaluó el crecimiento celular por peso fresco, tomando diariamente, por cinco días, tres muestras de 1 ml (en tubo eppendorf) por cada tratamiento. De igual forma en estas muestras se determinó el porcentaje de viabilidad mediante el método del MTT [1% de bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium], incubando las células por 2 horas a 38°C, siguiendo el protocolo experimental de Tisserat y Manthey<sup>12</sup> y Fernandez-Da Silva<sup>5</sup>.

## RESULTADOS Y DISCUSION

Uno de los factores importantes en el establecimiento de un sistema de transformación genética, es contar con un agente eficaz de selección del tejido transgénico, para así seleccionar aquellas células que presenten los genes foráneos. Estos agentes pueden ser antibióticos o herbicidas como el Glufosinato de Amonio. En este sentido, la selección de tejidos y plantas transgénicas mediante el gen *bar* es una alternativa a la prueba histoquímica para determinar la actividad del gen *gus*, ya que esta última a menudo es interferida por compuestos presentes en las plantas arbóreas<sup>3</sup>. A continuación se presentan los resultados que se obtuvieron al evaluar el efecto del herbicida Glufosinato de Amonio en distintos explantes de café.

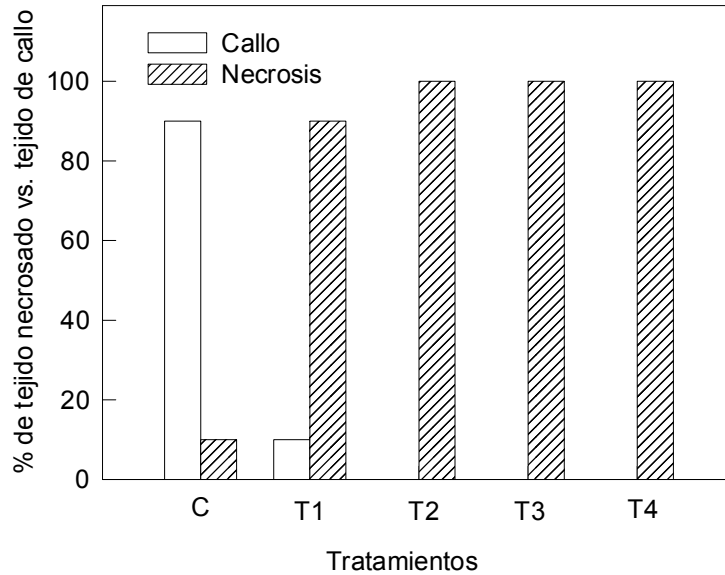
En los controles, los tres tipos de explantes ensayados (hoja, callo embriogénico y embriones somáticos torpedo) en medio de inducción de callo, mostraron un elevado crecimiento de callo friable de color blanco crema (Figura 5:IA, IIA y IIIA).

En secciones foliares se encontró que el herbicida inhibió totalmente el desarrollo del callo y el tejido foliar se necrotizó fuertemente a partir de 1 mg/l (T2), formándose poco callo y sólo en el 10% de los explantes a la menor concentración del Glufosinato de Amonio (0,5 mg/l, T1) (Figura 1 y Figura 5IB). A concentraciones de 10 mg/l (T4) del herbicida, el crecimiento de callo fué inhibido totalmente, y adicionalmente se presentó una marcada necrosis (Figura 5IC).

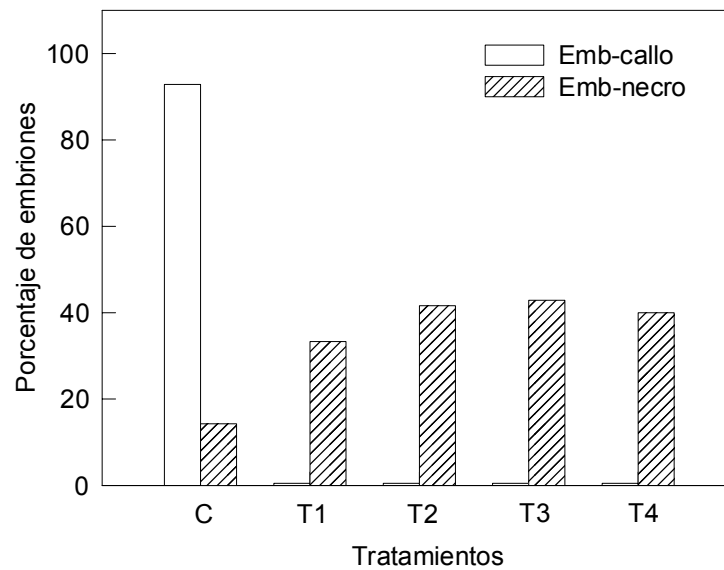
Los embriones somáticos cultivados en medio con 2,4-D y BA presentaron la misma tendencia, encontrándose una mayor sensibilidad de estos explantes al herbicida, ya que sólo se formó callo en el medio control (Figura 2 y Figura 5II).

El crecimiento de los cultivos de callo (Figura 5IIIB) fue inhibido por 0,5 mg/l del herbicida. Se observó una

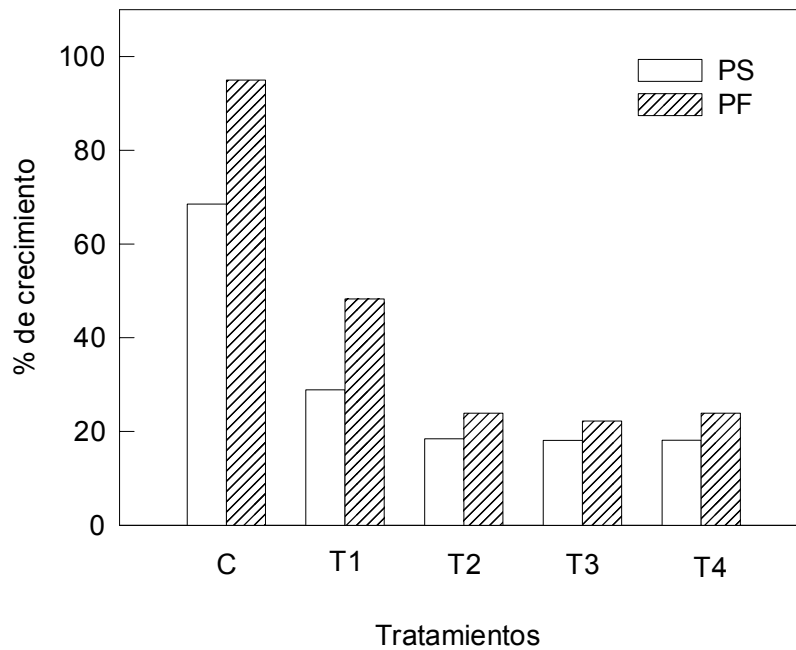
disminución del 50% en el crecimiento (PF y PS) en 0,5 mg/l (T1), un 70-80% a partir de 1 mg/l (T2) con respecto al control (Figura 3). En 10 mg/l se redujo fuertemente el crecimiento y se observó cierto grado de necrosis (Figura 5 III C).



**Figura 1.** Efecto del glufosinato de amonio sobre la formación de callo e inducción de necrosis en secciones foliares cultivadas por 4 semanas (n=30). Control (0 mg/l), T1 (0.5 mg/l), T2 (1 mg/l), T3 (5 mg/l) y T4 (10 mg/l).



**Figura 2.** Efecto del glufosinato de amonio sobre la formación de callo (Emb-callos) e inducción de necrosis (Emb-necro) en embriones somáticos cultivados por 4 semanas (n=30). Control (0 mg/l), T1 (0.5 mg/l), T2 (1 mg/l), T3 (5 mg/l) y T4 (10 mg/l).



**Figura 3.** Efecto del glufosinato de amonio sobre el crecimiento de callo embriogénico. El % de crecimiento fue calculado como el incremento en peso en el período de observación de 4 semanas (n=30). PS (peso seco), PF (peso fresco). Control (0 mg/l), T1 (0.5 mg/l), T2 (1 mg/l), T3 (5 mg/l) y T4 (10 mg/l).

En los embriones somáticos sembrados en medio de germinación (sin hormonas), se observó una tendencia similar, encontrándose que estos germinaron en un 64% sin oxidación alguna sólo en el medio control. La germinación se inhibió totalmente a 0.5 mg/l del herbicida (T1) y los embriones se oxidaron, distinguiéndose una oxidación creciente de 53-93% (T1 y T4 respectivamente) a medida que se incrementaba la concentración del herbicida (Figura 4), necrotizándose fuertemente en la mayor concentración (Figura 5 IV).

Coincidiendo con estos resultados, en otras especies se observa que el nivel de inhibición así como la concentración varía de acuerdo al genotipo y al explante de la especie estudiada. Así, en tres géneros de orquídeas (*Brassia*, *Catleya* y *Doritaenopsis*) con el gen *bar*, se encontró que 3 mg/l del herbicida BASTA (un nombre comercial del Glufosinato de Amonio) es el nivel óptimo para seleccionar las plantas genéticamente transformadas, indicándose que a dicha concentración, las secciones de hoja no transformadas se tornaron entre marrones y negras en pocas semanas<sup>9</sup>. Sin embargo, el nivel de tolerancia es mayor en plantas como *Picea abies*, donde la concentración óptima de selección es 100 mg/l del herbicida BASTA, bajo cuyo efecto las plantas no transgénicas se tornan amarillas<sup>3</sup>.

En café, se han realizado investigaciones con miras de escoger un agente de selección adecuado. En secciones foliares, y embriones somáticos de café Catimor tratados con el antibiótico kanamicina, se encontró que bajas concentraciones inhiben parcialmente la germinación de los embriones<sup>7</sup>. Mientras que en una investigación<sup>13</sup> con

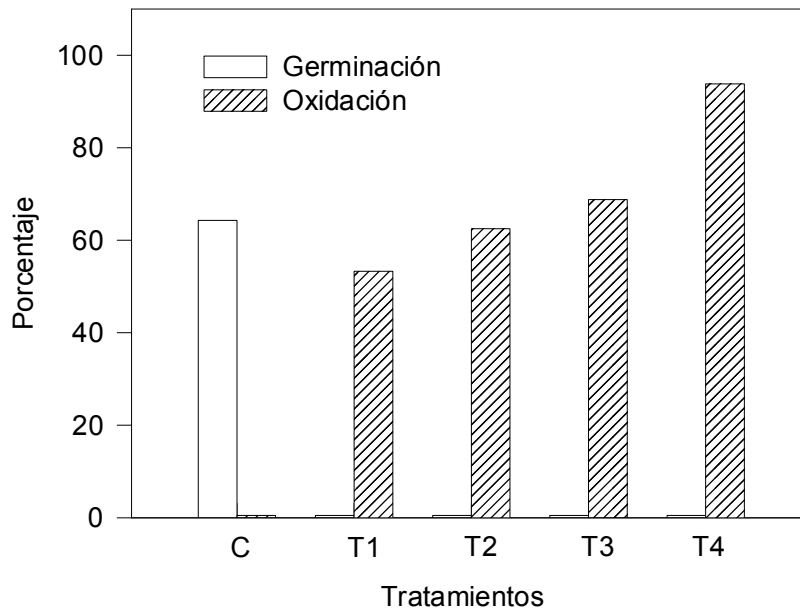
otros agentes de selección diferentes (Higromicina, Kanamicina, Glifosato y Glufosinato de Amonio) en hojas de *C. arabica* (cv Catuai, cv KF21) y *C. canephora*, presentaron inhibición del desarrollo de callo debido a que actúan interfiriendo en la biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Glifosato), síntesis de proteínas (Higromicina), daño del cloroplasto (Kanamicina), o como inhibidor de la Glutamina Sintetasa (Glufosinato de Amonio), en la investigación citada se señala que el herbicida Glufosinato de Amonio a 3 mg/l es el mejor agente de selección, debido a que inhibe la formación de callo en secciones foliares (de plantas crecidas *in vivo* como *in vitro*) generando menos necrosis<sup>13</sup>. Los resultados anteriores son consistentes con los obtenidos en la presente investigación, donde se observó que tanto en explantes foliares como en callo y en embriones somáticos la inhibición se logró a un 1 mg/l, diferencia que se debe probablemente a una respuesta diferencial del genotipo, ya que en dichos artículos se ensayó el efecto del herbicida con cultivares distintos al Catimor empleado en este trabajo.

Los resultados obtenidos muestran que en las suspensiones celulares fue más difícil observar el efecto del herbicida. Se observó cierta inhibición del crecimiento a una concentración de 1 mg/l (T2) y una disminución marcada del crecimiento a partir de 5 mg/l (T3) (Figura 6), coincidiendo con lo observado respecto al efecto de la kanamicina sobre suspensiones celulares de café Catimor<sup>7</sup>, donde se requirieron concentraciones mucho mayores (400 mg/l) para inhibir el crecimiento de las suspensiones celulares. De igual forma, es similar a

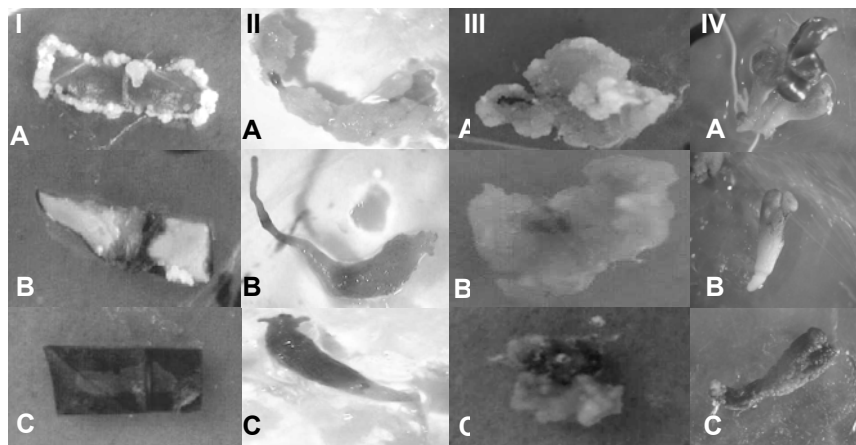
los resultados presentados por otros investigadores<sup>13</sup> quienes evaluaron suspensiones celulares de café tratadas con Higromicina, Kanamicina, Glifosato y Glufosinato de Amonio, encontrando que el Glufosinato de Amonio inhibía el crecimiento a 3 mg/l, en el mismo intervalo señalado en la presente investigación (5 mg/l). La diferencia probablemente se debe a una respuesta varietal.

Otro parámetro utilizado para evaluar el efecto del Glufosinato de Amonio sobre las suspensiones celulares

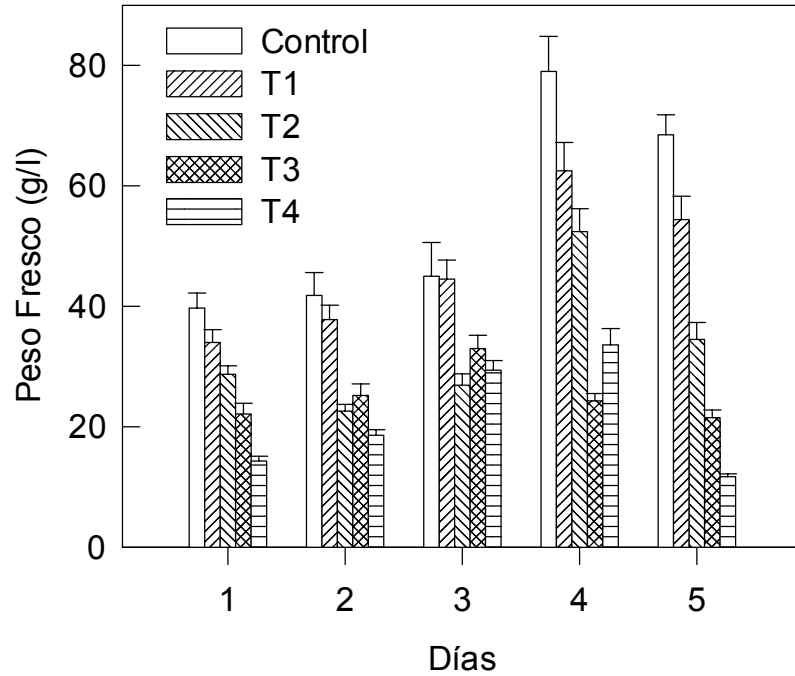
fue la estimación de la viabilidad celular mediante el método del MTT. Con estos ensayos se determinó que en el medio control y con 0,5 mg/l (T1) había más del 50% de células viables, 45% con 1 mg/l (T2) y menos de 30% a mayores concentraciones (5 y 10 mg/l) (Figura 7). En todas las concentraciones aplicadas el herbicida inhibió la formación de embriones somáticos, cuya diferenciación sólo se observó en el medio control después de 4 semanas de iniciado el ensayo.



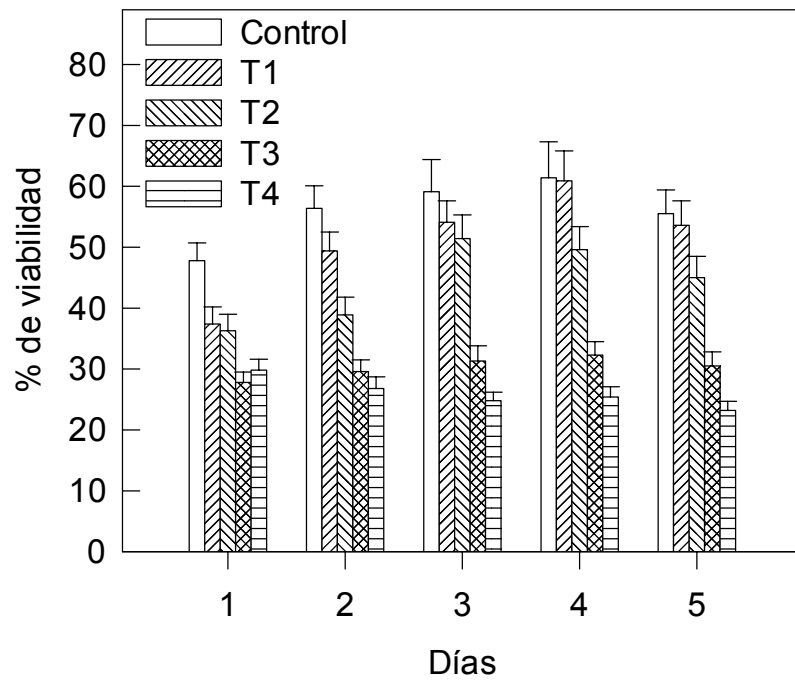
**Figura 4.** Efecto del glufosinato de amonio sobre la germinación y oxidación de embriones somáticos observados por un periodo de 4 semanas (n=30). Control (0 mg/l), T1 (0.5 mg/l), T2 (1 mg/l), T3 (5 mg/l) y T4 (10 mg/l).



**Figura 5.** Efecto del herbicida glufosinato de amonio en secciones de hoja (I), embriones somáticos en estadio de torpedo (II), callo embriogénico (III) y embriones somáticos tipo torpedo (IV) en medio de germinación (sin hormonas). Control (A), 0,5 mg/l (B) y en 10 mg/l (C) de herbicida.



**Figura 6.** Efecto del glufofato de amonio sobre el crecimiento de cultivos de células en suspensión medido como peso fresco en g/l. Los valores representados son el promedio de 3 muestras ( $X \pm DS$ ). Control (0 mg/l), T1 (0.5 mg/l), T2 (1 mg/l), T3 (5 mg/l) y T4 (10 mg/l).



**Figura 7.** Efecto del glufofato de amonio sobre la viabilidad en cultivos de células en suspensión, los valores son el promedio de 3 muestras ( $X \pm DS$ ). Control (0 mg/l), T1 (0.5 mg/l), T2 (1 mg/l), T3 (5 mg/l) y T4 (10 mg/l).

En conclusión, los distintos explantes de cafeto evaluados responden diferencialmente al glufosinato de amonio como agente de selección. El herbicida a una concentración de 0,5 mg/l inhibió parcialmente el crecimiento de las secciones foliares y el callo, y en alto porcentaje o totalmente a 1 mg/l. A diferencia de los embriones somáticos colocados en medio de inducción de callo y en medio de germinación cuyo crecimiento y germinación se inhibió totalmente con 0,5 mg/l. En las suspensiones celulares la inhibición notable del crecimiento evaluada por viabilidad celular se observó a partir de 5 mg/l del herbicida.

Los experimentos realizados permiten recomendar el uso de embriones somáticos en futuros experimentos de transformación con el agente selectivo glufosinato de

amonio ya que éstos fueron los que presentaron una respuesta más definida al herbicida y a menores concentraciones (0,5 mg/l). Adicionalmente, cabe destacar que los embriones somáticos de café tienen una elevada capacidad para la embriogénesis somática secundaria, siendo ésta otra ventaja, ya que permite una regeneración eficiente de los productos de transformación genética.

#### AGRADECIMIENTOS

Al FONACIT por el financiamiento de la investigación Proyecto S1-98003209.

#### REFERENCIAS

1. **Baumann, T. W.** and **Neuenschwander, B.** Tissue culture in coffee biotechnology. *Café Cacao Thé* **24**: 159-164, 1990.
2. **Birch, R. G.** Plant transformation: problems and strategies for practical application. *Ann. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* **48**: 297-236, 1997.
3. **Brukhin, V., Clapham, D.** and **Von Arnold, M. E.** Basta tolerance as a selectable and screening marker for transgenic plants of Norway spruce. *Plant Cell Rep.* **19**: 899-903, 2000.
4. **De Block, M., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gosselé, V., Rao Movra, N., Thompson, C., Van Montagu, M.** and **Leemans, J.** Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* **6**: 2513-2518, 1987.
5. **Fernandez Da Silva, R.** Establecimiento de un método para la transformación genética del café (*Coffea arabica* cv. Catimor) e incorporación del gen *bar* que confiere resistencia al herbicida "Glufosinato de Amonio". Tesis de Doctorado en Botánica, Universidad Central de Venezuela, Caracas Noviembre 2002, 193 pags.
6. **García, E.** y **Menéndez, A.** Embriogénesis somática a partir de explantes foliares del cafeto "Catimor". *Café Cacao Thé* **31**: 15-22, 1987.
7. **Giménez, C. A., Menéndez-Yuffa, A.** y **García, E.** Efecto del antibiótico Kanamicina sobre diferentes explantes del híbrido de café (*Coffea* sp) Catimor. *Phyton* **59**: 39-46, 1996.
8. **Hermoso-Gallardo, L.** y **Ménendez-Yuffa, A.** Multiplicación masiva del café (*Coffea arabica* L. cv. Catimor) mediante cultivo de suspensiones celulares embriogénicas. *Acta Cient. Venez.* **51**: 90-95, 2000.
9. **Knapp, J. E., Kausch, A. P.** and **Chandlee, J. M.** Transformation of three genera of orchid using the bar gene as a selectable marker. *Plant Cell Rep.* **19**: 893-898, 2000.
10. **Murashige, T.** and **Skoog, F.** A revised medium for rapid growth on bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497, 1962.
11. **Söndahl, M. R.** and **Lauritis, J. A.** Coffee. In: Biotechnology of perennial fruit crops, edited by F. A. Hammerschlag and R.E. Litz C. A. B. International, England, UK, Biotechnology in Agriculture n° 8; pp. 401-419; 1992.
12. **Tisserat, B.** and **Manthey, J. A.** *In Vitro* sterile hydroponic culture to study iron chlorosis. *J. Plant Nutr.* **19**:129-143, 1996.
13. **Van Boxtel, V. J., Eskes, A.** and **Berthouly, M.** Glufosinate as an efficient inhibitor of callus proliferation in coffee tissue. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* **33**: 6-12, 1997.