

Fundada en 1951 por Founded in 1951 by
Miguel Raggio & Nora Moro de Raggio
Editor-in-Chief: Dr. Carlos A. Busso

FUNDACION ROMULO RAGGIO
Gaspar Campos 861, 1638 Vicente López (BA), Argentina
www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar

ISSN 0031-9457

57° ANIVERSARIO

(2008) 77: 49-64

57th ANNIVERSARY

Estabilidad en los patrones de proteínas de plántulas de café regeneradas por embriogénesis somática (Con 6 Figuras)

Stability of protein patterns in coffee seedlings regenerated by somatic embryogenesis
(With 6 Figures)

Menéndez-Yuffá¹ A, L Ríos-Bolívar²

Resumen. El café (*Coffea arabica* L.) es una planta para la cual existen métodos eficientes de regeneración y multiplicación por embriogénesis somática. Sin embargo, es muy importante analizar las progenies obtenidas por dichos métodos, con el fin de determinar la estabilidad genética de las mismas. La presente investigación se realizó con el fin de (1) determinar los patrones electroforéticos unidimensionales de proteínas de hojas de vitroplantas de café regeneradas por embriogénesis somática, y (2) comparar los mismos con los de las plantas donantes de explantes. Se determinaron los patrones de proteínas de algunos genotipos de café para establecer si se detectaban diferencias por este método. Dichos patrones revelaron que cada genotipo analizado presentaba un conjunto de bandas de proteínas característico. Las separaciones electroforéticas de proteínas de las vitroplantas no mostraron diferencias significativas entre sí, ni tampoco hubo diferencias significativas al comparar el patrón con las plantas madres. Los resultados obtenidos muestran que de acuerdo al patrón electroforético de proteínas, las plantas de café Catimor regeneradas por embriogénesis somática presentan

¹ Universidad Central de Venezuela. Instituto de Biología Experimental. Calle Suapure. Colinas de Bello Monte. Caracas, Venezuela.

² FONACIT. Gerencia de Financiamiento / Investigación y Desarrollo. Esquina El Chorro, Av. Universidad, Torre MCT, piso 15.

Address Correspondence to: Andrea Menéndez-Yuffá, Universidad Central de Venezuela. Instituto de Biología Experimental. Calle Suapure. Colinas de Bello Monte. Caracas, Venezuela. e-mail: amenendez@cantv.net

Recibido/Received 14.VIII.2007. Aceptado/Accepted 17.X.2007.

niveles de variación muy bajos. Por lo tanto, la presente investigación aporta evidencia de la estabilidad genética en las plantas de café cv. Catimor regeneradas por embriogénesis somática. Además, se mostró que el método de electroforesis unidimensional de proteínas puede ser útil en la caracterización de genotipos de café.

Palabras clave: embriogénesis somática, variación somaclonal, electroforesis de proteínas, estabilidad genética, cultivo *in vitro*.

Abstract. Regeneration and multiplication of coffee (*Coffea arabica* L.) through somatic embryogenesis can be efficiently achieved through different methods. However, it is very important to analyze the progenies obtained by these methods in order to establish their genetic stability. The objectives of this research were (1) to determine the protein electrophoretic patterns in leaves of coffee vitroplants which were regenerated through somatic embryogenesis, and (2) to compare these patterns with those of the explant donor plants. The protein patterns of some coffee genotypes were initially determined to detect possible differences among them. Each analyzed genotype showed a characteristic set of protein bands. The protein electrophoretic separation in vitroplants did not show significant differences neither among vitroplants nor between them and the mother plants. According to the protein electrophoretic patterns, the Catimor coffee plants regenerated through somatic embryogenesis have very low levels of variation. These results support evidence of genetic stability in plants of coffee cv. Catimor regenerated by somatic embryogenesis. Additionally, it was shown that the method of one-dimensional electrophoresis of proteins can be useful in the characterization of coffee genotypes.

Key words: somatic embryogenesis, somaclonal variation, protein electrophoresis, genetic stability, *in vitro* culture.

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea sp.*) es una planta para la cual están bien desarrollados los métodos de propagación clonal masiva *in vitro*. El método de propagación *in vitro* más eficiente es la embriogénesis somática. Sin embargo, debe estudiarse la estabilidad genética de las plantas regeneradas por dicho método, ya que, cuando un tejido pasa por las condiciones de cultivo *in vitro*, sobre todo cuando la regeneración ocurre pasando por una etapa de callo, pueden originarse variaciones genéticas; dicho fenómeno se denomina variación somaclonal (Rani et al., 1965; Larkin y Scowcroft, 1981; Medina et al., 2004). Este tipo de variación puede considerarse ventajosa

si el fin que se pretende es obtener mayor variación genética para seleccionar plantas con mejores características; sin embargo, si el objetivo requiere fidelidad genética, como en el caso de la propagación masiva de un individuo, variedad o especie de interés o la regeneración de productos de transformación genética, tal variación sería desfavorable. Esto es debido a que en el caso de las plantas propagadas, se obtendrían productos diferentes a la planta original que se deseaba reproducir. En el caso de la ingeniería genética, esto constituiría un factor de variación no controlado y por lo tanto indeseable. En tal sentido, Ray et al. (2006) señalan que en la industria comercial, donde se ha desarrollado la tecnología de la micropropagación, la mayor preocupación es el mantenimiento de la fidelidad genética en las plantas micropropagadas.

Cuando se establecen métodos para evaluar la variación genética en plantas de café regeneradas *in vitro*, es importante tener presente que ésta es una planta de ciclo largo, que tarda varios años en llegar a la etapa reproductiva y productiva comercialmente. Es por ello que, aunque la evaluación agronómica no puede ser sustituida, se han buscado métodos que permitan detectar temprano los niveles de variación generados por el método de cultivo *in vitro*. Hay una serie de nuevos enfoques, como la tecnología de marcadores moleculares, que ha sido adoptada para estimar la fidelidad genética. Entre ellos, los marcadores isoenzimáticos han sido utilizados recientemente para determinar la estabilidad genética de clones de cultivo de tejidos. Por ejemplo, las investigaciones realizadas por Ray et al. (2006) concluyeron que los marcadores isoenzimáticos pueden ser una herramienta valiosa para un registro rápido de la estabilidad genética de vitroplantas. Además, Burg et al. (1989) determinaron la variación fenotípica y realizaron enfoque isoeléctrico de proteínas de tubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje) derivadas de protoplastos.

Los trabajos que informan la evaluación de la estabilidad genética en café propagado *in vitro* son escasos. Entre ellos, Söndhal y Lauritis (1992) reportan la determinación de variación somaclonal por evaluación morfológica en diferentes variedades de café regeneradas por embriogénesis somática.

En café hay pocos informes de estudios de isoenzimas y proteínas. Acuña et al. (1999) [que citan a Macrae (1985), Centi-Grossi et al. (1969) y Underwood y Deatherage (1952)], Menéndez-Yuffá et al. (1994) y Menéndez-Yuffá y García (1996) no han utilizado la electroforesis de proteínas para eva-

luar la estabilidad genética o la taxonomía vegetal. Solamente Bustamante (1996) informó el uso de geles discontinuos de poliacrilamida (DISCPAGE) para determinar diferencias entre cultivares de café.

El objetivo de este trabajo fue evaluar los niveles de estabilidad genética en plantas de café regeneradas por embriogénesis somática. En la primera etapa se llevó a cabo un estudio a nivel citogenético, cuyos resultados fueron informados en el año 2000 (Menéndez-Yuffá et al.). La presente investigación constituye la segunda etapa, en la cual se evaluó la aplicación de patrones unidimensionales de proteínas para detectar variaciones en plantas de café regeneradas *in vitro*. Inicialmente, se determinaron los patrones electroforéticos de proteínas para plantas de café de distintos genotipos obtenidas por métodos convencionales. Esta fase de la investigación se hizo para determinar si el método aplicado era capaz de detectar diferencias entre genotipos similares. Van der Bank et al. (2001) concluyeron que el uso de datos electroforéticos en taxonomía y sistemática está limitado para distinguir o confirmar especies, y para medir la divergencia entre poblaciones o entre especies y géneros relacionados. Basándonos en los resultados preliminares de los patrones de proteínas presentados para diferentes variedades y especies relacionadas de *Coffea sp.*, presentamos los resultados del estudio de los patrones electroforéticos de proteínas solubles en una dimensión en plántulas de café, *Coffea arabica* cv. Catimor, regeneradas por embriogénesis somática. Nuestros estudios permitieron evaluar si el análisis de patrones electroforéticos unidimensionales de proteínas es aplicable para detectar diferencias entre los genotipos de café estudiados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de tejidos. La inducción de embriogénesis somática se realizó utilizando plantas de café, *Coffea arabica* cv. Catimor, siguiendo el procedimiento informado por Menéndez-Yuffá y García (1997). Secciones de hojas adultas fueron cultivadas durante cuatro meses en un medio compuesto de sales de Murashige y Skoog (1962) diluídas a la mitad, 30 g/l de sacarosa, 10 mg/l de tiamina, 100 mg/l de mio-inositol, 1 mg/l de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y 8 mg/l de Benciladenina (BA). Los callos obtenidos fueron transferidos a un medio con la misma composición, excepto por el agregado de 0,8 mg/l de ácido naftalenoacético (ANA) como único regulador de crecimiento.

Extracción de Proteínas. La extracción de proteínas se realizó según el procedimiento informado por Menéndez-Yuffá et al. (1994). El extracto se obtuvo pulverizando 0,3 g de hojas jóvenes totalmente expandidas con nitrógeno líquido (excepto para las vitroplantas). Luego se efectuó una homogeneización con amortiguador de extracción (2,3 ml por gramo de tejido). Éste estuvo constituido por 50 mM Tris (pH 8); 5% (V/V) glicerol; 0,1 mM EGTA; 0,2 M KCl; 1,5% (P/V) polivinilpirrolidona, y 1% (V/V) β -mercaptoetanol. El extracto se centrifugó durante 20 minutos a 13.000 r.p.m. en microcentrífuga y se recogió el sobrenadante que fue centrifugado 10 minutos a 13.000 r.p.m. Las proteínas fueron precipitadas durante 2 horas a -20 °C utilizando 7 volúmenes de acetona fría con 1% (V/V) de β -mercaptoetanol. Las proteínas se recogieron por centrifugación durante 10 minutos a 5.000 r.p.m. a 4 °C, y fueron resuspendidas en amortiguador Laemmli (1970) 2X [250 mM Trizma Base (pH 6,8); 40% (V/V) glicerina; 4% (P/V) SDS; 0,005% (P/V) Azul de Bromofenol y 2% (V/V) β -mercaptoetanol].

La estimación del contenido de proteínas en las muestras se hizo siguiendo el microensayo de proteínas de Bradford (1976), utilizando 50 μ l del sobrenadante que se obtuvo antes de precipitar con acetona.

Electroforesis. La electroforesis se llevó cabo en minigeles (8,6 x 6,8 cm) de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 14% (P/V) bajo condiciones reductoras de acuerdo a Laemmli (1970) y tinción con azul de Comassie [Comassie Brilliant Blue R-250 al 0,2% (P/V); metanol al 46,6% (V/V) y ácido acético al 7% (V/V)] durante 45 minutos. El gel se lavó con agua destilada y se colocó en una solución para remover la tinción [ácido acético glacial al 7% (V/V); metanol al 5% (V/V)] hasta que se visualizaron las bandas. La digitalización y el análisis de los perfiles electroforéticos se llevó a cabo con el programa Quantity One – 4.01 de Bio-Rad.

Antes de colocarlas en el gel, las muestras fueron calentadas a 95 °C durante 3 minutos. Se colocaron aproximadamente 50 μ g de proteína en cada pocillo del gel.

Análisis electroforéticos. Se realizaron extracciones y separaciones electroforéticas de proteínas de las siguientes plantas:

- a) Plantas de invernáculo de los genotipos *Coffea arabica* cv. Catimor [*C. arabica* cv. Caturra rojo x Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*)], *C. canephora* var. Robusta; Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*);

UCV 143 (*C. arabica* “Blue Mountain”) y UCV 230 [Icatu (*C. arabica* x *C. canephora*) x *C. canephora*].

b) Plantas de invernáculo del cv. Catimor utilizadas como donantes (o plantas madres) para la iniciación de los cultivos *in vitro*. La extracción y corrida se realizaron dos veces para las plantas madres con el fin de verificar la reproducibilidad del método.

c) 5 vitroplantas de Catimor regeneradas por embriogénesis somática indirecta. La extracción y corrida se realizaron dos veces para cada vitroplanta con el fin de verificar la reproducibilidad del método.

d) 50 vitroplantas de Catimor regeneradas por embriogénesis somática indirecta. Con estos datos se elaboró una matriz de presencia y ausencia de bandas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

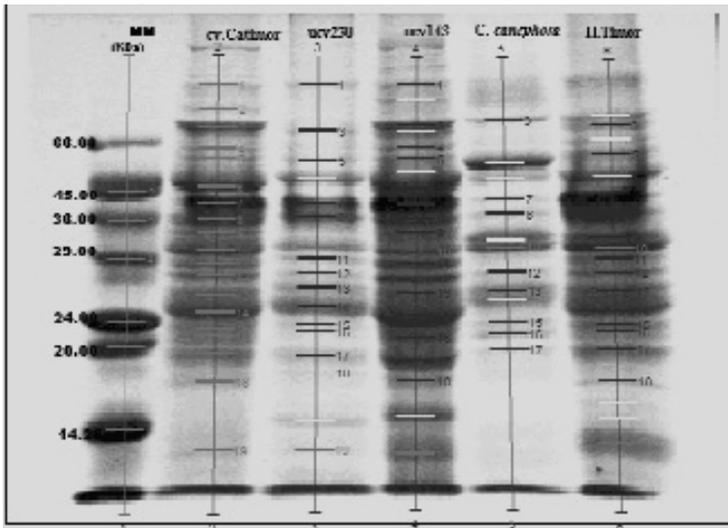
La Fig. 1 muestra que hay diferencias evidentes en los patrones generados por la corrida electroforética de proteínas para las diferentes especies, cultivares e híbridos del género *Coffea* sp. El mayor número de bandas se encontró entre los pesos de 20-80 kDa para todos los genotipos. El programa Quantity One elabora un esquema de las bandas, y realiza un ajuste mediante el cual les asigna el mismo número a las que tienen pesos moleculares similares.

El primer patrón corresponde al cv. Catimor, presentando un total de 17 bandas claramente definidas entre los pesos moleculares de 12-109 kDa. El segundo patrón pertenece al híbrido UCV 230 que presentó un total de 10 bandas entre los pesos de 12-102 kDa. El tercer patrón corresponde a UCV 143, que presenta el mayor polimorfismo de bandas y una mayor resolución de las mismas a lo largo de todo el patrón dentro de los pesos moleculares de 12-109 kDa. *Coffea canephora* (4° carril) presentó el patrón con menor número de bandas resueltas (Menéndez-Yuffá y García de García, 1996) y las mismas se encontraron entre los pesos de 19-78 kDa. El 5° carril correspondió al Híbrido de Timor, el cual presentó 17 bandas claramente resueltas y comprendidas entre los pesos de 13-109 kDa.

La Fig. 2 muestra una matriz de presencia-ausencia de las bandas más representativas para cada genotipo. Se puede apreciar que hay un número mayor de bandas en común presentes en la mayoría de los genoti-

Fig. 1. Perfiles electroforéticos de proteínas solubles de distintas variedades de café. MM, estándares de pesos moleculares: 66.00 kDa (Albúmina bovina), 45.00 kDa (Ovoalbúmina), 36.000 kDa (Gliceraldehído deshidrogenasa), 29.000 kDa (Anhidrasa Carbónica), 29.000 (Tripsinógeno tratado con PMSF), 20.000 kDa (inhibidor de la Tripsina), 14.200 KDa (α -Lactoalbúmina). En los otros carriles se cargaron los siguientes genotipos de *Coffea*: cv. Catimor [*C. arabica* cv. Caturra rojo x Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*)], UCV 230 [Icatu (*C. arabica* x *C. canephora*) x *C. canephora*], UCV 143 (*C. arabica* "Blue Mountain"), *C. canephora* var. Robusta, H. Timor (Híbrido de Timor) (*C. arabica* x *C. canephora*).

Fig. 1. Soluble protein electrophoretic profiles in different coffee varieties. MM, molecular weight standards: 66.00 kDa (bovine serum albumin), 45.00 kDa (Ovalbumin), 36.000 kDa (glyceraldehyde dehydrogenase), 29.000 kDa (carbonic anhydrase), 29.000 (trypsinogen treated with PMSF), 20.000 kDa (trypsin inhibitor), 14.200 KDa (α -lactalbumin).



pos (por ejemplo, las bandas N° 6, 13, 14, 15, 19, 20 y 22). Son pocas las bandas que aparecen en un solo genotipo. Con esta matriz se calculó el porcentaje de similitud de los genotipos, comparándolos con UCV-143 que es *C. arabica*. Catimor tuvo el mayor porcentaje (57,7%) de similitud. Esto se

Fig. 2. Matriz de presencia-ausencia de bandas de la Fig. 1.**Fig. 2.** Matrix of presence-absence of bands in Fig. 1.

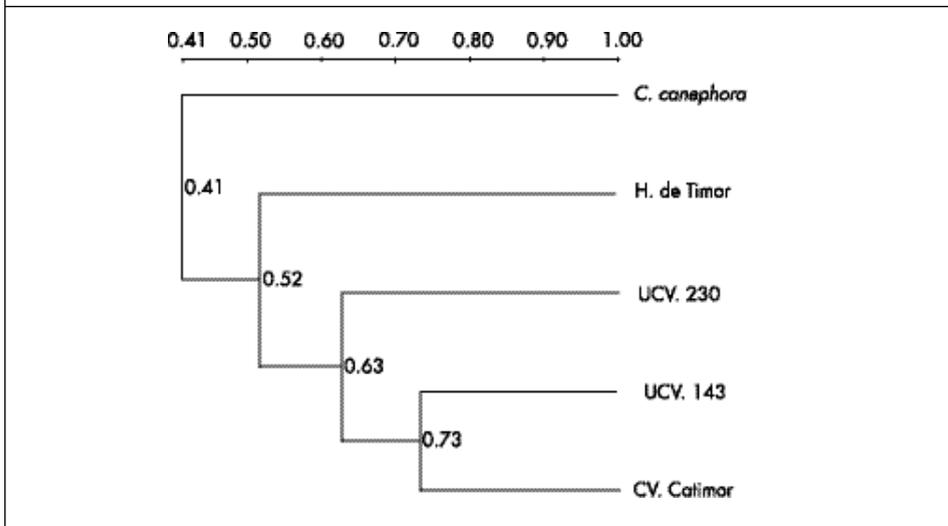
Banda	Catimor	UCV-230	UCV-143	<i>C. canephora</i>	Híbrido de Timor
1	+	-	+	-	-
2	-	-	+	-	-
3	+	+	+	-	+
4	-	-	+	-	-
5	+	-	-	-	-
6	+	-	+	+	+
7	-	+	-	-	+
8	+	-	+	-	+
9	+	+	+	-	+
10	-	-	-	+	-
11	-	+	-	+	+
12	+	-	+	-	-
13	+	+	+	-	+
14	+	-	+	+	+
15	+	-	+	+	+
16	-	+	-	-	-
17	+	-	+	-	+
18	+	-	+	-	+
19	+	+	-	+	+
20	+	+	+	+	+
21	-	-	-	+	+
22	+	+	+	+	+
23	+	+	+	-	+
24	-	+	+	-	-
25	-	-	-	-	-
26	+	+	+	-	+

esperaba ya que Catimor proviene de retrocruces sucesivos con *C. arabica*, seguido por el Híbrido de Timor (50%). Los menos parecidos fueron *C. canephora* (19,23%) y UCV-230 (19,23%). Esto también se esperaba porque *C. canephora* es una especie diferente, y UCV-230 proviene del retrocruce entre (*C. arabica* x *C. canephora*) y *C. canephora*.

Con los patrones obtenidos en la corrida electroforética se llevó a cabo un análisis de cluster en los genotipos estudiados, según el índice de UPGMA (Fig. 3). Los genotipos más relacionados fueron el cv. Catimor y el UCV-143 (*C. arabica*). Este grupo se unió al UCV-230 (retrocruce del

Fig. 3. Análisis de cluster según el índice de UPGMA, utilizando los perfiles electroforéticos de proteínas de los distintos genotipos de café. cv. Catimor [*C. arabica* cv. Caturra rojo x Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*)], UCV 230 [Icatu (*C. arabica* x *C. canephora*) x *C. canephora*], UCV 143 (*C. arabica* "Blue Mountain"), *C. canephora* var. Robusta, H. Timor (*C. arabica* x *C. canephora*).

Fig. 3. Cluster analysis using the UPGMA index. It was determined utilizing the protein electrophoretic profiles of different coffee genotypes. cv. Catimor [*C. arabica* cv. Caturra rojo x Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*)], UCV 230 [Icatu (*C. arabica* x *C. canephora*) x *C. canephora*], UCV 143 (*C. arabica* "Blue Mountain"), *C. canephora* var. Robusta, H. Timor (*C. arabica* x *C. canephora*).



C. arabica x *C. canephora* con *C. canephora*), seguido por el Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*). El menos parecido con el resto de los genotipos fue *C. canephora*. También se realizó un análisis de cluster según Wards, el cual produjo un resultado similar al anterior, confirmando que la electroforesis de proteínas solubles puede ser una herramienta útil en la caracterización de genotipos del género *Coffea*. Estos resultados coinciden con lo reportado por Burg et al. (1989), quienes mostraron que el enfoque isoelectrico de proteínas de tubérculos de papa les permitió distinguir claramente entre los cultivares estudiados.

Bustamante (1996) evaluó la composición de proteínas totales en geles discontinuos de poliacrilamida (DISCPAGE: 8-16%) en 20 cultivares de *Coffea arabica*. Este autor no encontró diferencias en el número de bandas entre los cultivares pero sí en la intensidad de las mismas. Reportó un total de 23 bandas para todos los tejidos foliares analizados (hojas con o sin nervaduras, y hojas jóvenes o viejas). Dicho autor informó que las diferencias en intensidad de las bandas se podrían deber al carácter tetraploide de *C. arabica*. Debido a esto, podría aparecer una banda más o menos concentrada. Sin embargo, el autor informó que las diferencias en intensidad no fueron consistentes entre las muestras.

Posteriormente se realizaron dos separaciones electroforéticas de las proteínas solubles de 5 plantas madres (que no habían pasado por cultivo *in vitro* y fueron la fuente para iniciar la regeneración) haciéndose dos extracciones y corridas diferentes. La Fig. 4 muestra la corrida electroforética de proteínas de plantas madre de café cv. Catimor y su réplica, en

Fig. 4. Corrida electroforética de las plantas madres con su réplica (extracción y corrida diferente de cada planta):. M:M, marcadores de peso molecular; PM1* es la réplica de PM1, PM2* es la réplica de PM2, y así sucesivamente.

Fig. 4. Electrophoresis of mother plants and their replicates (different extraction and running for each plant). MM, molecular markers; PM1* is the replica of PM1, PM2* is the replica of PM2, and so on.

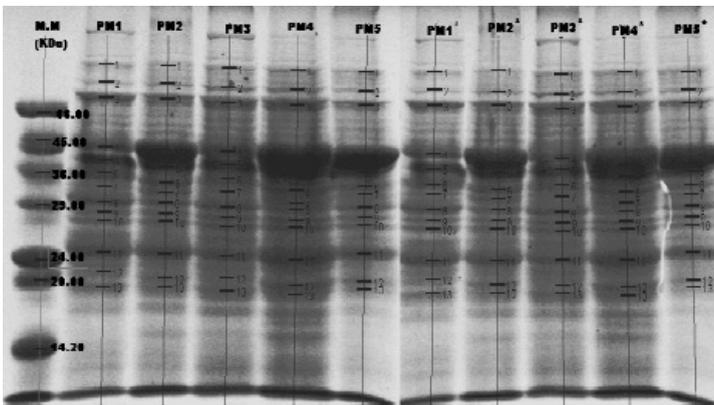
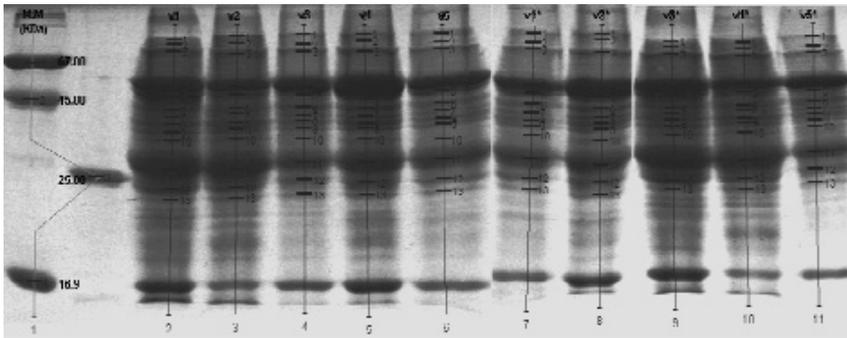


Fig. 5. Corrida electroforética de 5 vitroplantas con su réplica (extracción y corrida diferente de cada planta): M.M, marcadores de peso molecular; V1* es la réplica de V1, V2* es la réplica de V2, y así sucesivamente.

Fig. 5. Electrophoresis of five vitroplants with their replicates (different extraction and running for each plant). MM, molecular markers; V1* is the replica of V1, V2* is the replica of V2, and so on..



donde los carriles 2-6 corresponden a la primera corrida, y los carriles 7-11 a la segunda corrida. Se puede observar a simple vista la semejanza entre las dos corridas. Mediante este ensayo se confirmó la reproducibilidad del patrón electroforético de proteínas para plantas de café del mismo genotipo, y para una extracción y corridas diferentes de la misma planta. Este mismo ensayo se realizó con dos réplicas de cinco vitroplantas, realizadas en extracciones y corridas diferentes (Fig. 5). Ésto permitió confirmar la reproducibilidad del patrón electroforético de proteínas para el mismo individuo cuando se trabaja con vitroplantas. En desacuerdo con lo hallado por Bustamante (1996), encontramos que las diferencias en intensidad en las bandas de las distintas muestras correspondientes a la misma especie y variedad eran reproducibles.

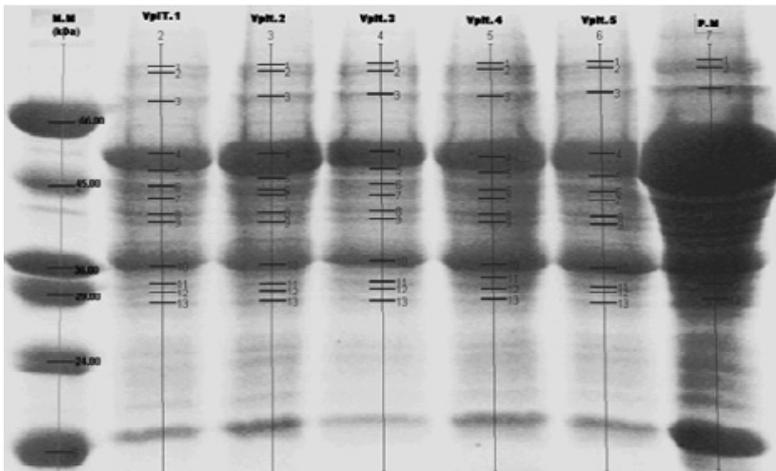
La Fig. 6 muestra los patrones electroforéticos de cinco vitroplantas y la planta madre (*C. arabica* cv. Catimor). Se puede observar que no hay diferencias cualitativas entre la planta madre y las vitroplantas. Se encontró que las bandas de bajo peso molecular (<20 KDa) se presentaban en menor concentración con respecto a las de alto y mediano peso molecular

(>30 KDa). Debido a ésto, las bandas de bajo peso molecular no se observaron con claridad en algunas muestras. Por lo tanto, dichas bandas no se incluyeron para realizar los análisis.

En función de los patrones de bandas establecidos se procedió a realizar una matriz de presencia-ausencia de bandas en las 50 vitroplantas evaluadas, la cual se comparó con el patrón de la planta madre. Se calculó el porcentaje de aparición de las bandas en el total de las muestras. Se encontró que para la mayoría de las bandas analizadas el porcentaje de aparición estaba en un 100%. Sólo para la banda II se encontró un porcentaje de aparición menor (94%), coincidiendo con los resultados de Burg et al. (1989) para tubérculos de papa derivados de protoplastos. Las diferencias encontradas en los patrones de proteínas fueron cualitativas y no cuantitativas.

Fig. 6. Patrón electroforético de las vitroplantas (vplt. 1 a 5) y la planta madre *C. arabica* cv. Catimor (P.M.). M.M. (marcadores de peso molecular igual a las figuras anteriores). En total se determinó el patrón de 50 vitroplantas.

Fig. 6. Electrophoretic patterns of vitroplants (vplt. 1 to 5) and the mother plant *C. arabica* cv. Catimor (P.M.). M.M. (molecular markers are the same as in previous figures). Shown patterns were determined for 50 vitroplants.



El porcentaje de bandas monomórficas (la misma banda en todas las muestras) fue de un 99,55%. En función de este valor se calculó un porcentaje de variación de un 0,45% ($100\% - 99,55\% = 0,45\%$). Este valor es bajo al compararlo con el 9,6% de variación morfológica reportado por Söndhal y Lauritis (1992) para plantas del cv. Catimor regeneradas por embriogénesis somática. Los resultados de estos autores pueden compararse con los reportados por Burg et al. (1989), quienes encontraron que los tubérculos de papa regenerados de protoplastos presentaron un 3,6% de variación en las proteínas, y de un 27% a un 55% de variación fenotípica en tubérculos de plantas regeneradas después de la primera o segunda transferencia *in vitro*, respectivamente. Comparando nuestros resultados con los hallados por Burg et al. (1989) y Söndhal y Lauritis (1992) llama la atención que la variación encontrada en los patrones de proteínas fue menor a la hallada en los caracteres morfológicos. En la presente investigación no se realizaron ensayos para determinar el origen de las variaciones encontradas. Al respecto, sin embargo, es de interés citar la revisión publicada por Kaeppler et al. (2000) respecto a factores epigenéticos de la variación somaclonal en plantas. Estos autores señalan, que la variación en los patrones de proteínas de almacenamiento o de isoenzimas sugiere que el cambio de secuencias de ADN ocurre mucho más frecuentemente que la delección genética; esto es debido a que los patrones de migración son alterados, pero los alelos nulos son raros. En la misma revisión se cita otros trabajos en los que se ha establecido una relación directa entre proteínas variantes y cambios en la secuencia de ADN.

A partir de la matriz de datos se procedió a calcular el índice de similitud de Jaccard para comparar los patrones de la planta madre con los de las diferentes vitroplantas. Esto se realizó con el programa Multi Variate Statistical Package (MVSP) versión 3,01. Cuarenta y siete de las 50 vitroplantas analizadas mostraron un coeficiente de similitud de 1. La excepción fueron las vitroplantas 15, 17 y 20 que presentaron un coeficiente de 0,92 debido a que no presentaron la banda N° 11.

La metodología empleada para extraer las proteínas solubles y su posterior corrida electroforética en condiciones desnaturizantes, puede ser de gran utilidad en el análisis de estabilidad genética o para comparar genotipos similares. Para ello es necesario que se tome la precaución de estandarizar las condiciones de trabajo. En primer lugar, se debe elegir un

material que tenga la misma edad fisiológica y condiciones de cultivo similares. Estos aspectos fueron tomados en cuenta en la presente investigación ya que se utilizaron vitroplantas de la misma edad, obtenidas bajo condiciones físicas y químicas de cultivo idénticas. También es importante mantener las mismas condiciones de extracción de proteínas; es decir, trabajar en frío, correr los geles hasta el mismo nivel, y sobre todo tratar de colocar la misma cantidad de proteínas en cada carril, ya que esta metodología es muy susceptible a los cambios en la concentración. Esto último puede ocasionar que ciertas bandas no se detecten a concentraciones menores. También puede ocurrir que a una concentración excesiva, las bandas de proteínas que tienen pesos moleculares similares no sean resueltas.

Los resultados obtenidos muestran que de acuerdo al patrón electroforético de proteínas solubles, las plantas de café Catimor regeneradas por embriogénesis somática presentan niveles de variación muy bajos. Por lo tanto, el sistema embriogénesis somática utilizado para la regeneración y multiplicación de café Catimor puede ser aplicado en la propagación comercial y en la regeneración de productos transgénicos.

CONCLUSIONES

El presente estudio demostró la aplicabilidad del método de electroforesis de proteínas solubles extraídas de hojas de *Coffea sp.* para detectar diferencias entre genotipos y somaclones, así como también para la estimación de la estabilidad genética de estos últimos.

Los patrones electroforéticos unidimensionales de proteínas solubles presentaron reproducibilidad y permitieron detectar diferencias entre los genotipos de café estudiados: *Coffea*: cv. Catimor [*C. arabica* cv. Caturra rojo x Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*)]; UCV 230 [Icatu (*C. arabica* x *C. canephora*) x *C. canephora*]; UCV 143 (*C. arabica* “Blue Mountain”); *C. canephora* var. Robusta, e Híbrido de Timor (*C. arabica* x *C. canephora*). Un hallazgo importante fue que el análisis estadístico de las diferencias encontradas entre los híbridos, cultivares y especies estudiados fue consistente con la información previa de la constitución genética de los mismos.

Los patrones de proteínas solubles de hojas de vitroplantas de café se mantuvieron estables después de su paso por cultivo *in vitro*. Esto se evi-

denció al comparar las vitroplantas entre sí, y con las hojas de las plantas donantes, observándose muy poca variación. Por lo tanto, el presente estudio permite afirmar que las vitroplantas de café Catimor regeneradas por embriogénesis somática son estables a nivel de su patrón electroforético de proteínas solubles.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CDCH por el financiamiento para realizar esta investigación (Proyecto N° 03.33.4049.2000), a FONAIAP (Estación Experimental de Bramón), a la Estación Experimental Jaime Henao Jaramillo y al Dr. Carlos Ascanio, que donó las plantas para realizar esta investigación. También agradecemos a la Dra. Elizabeth Valdivieso por la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

- Acuña, R., R. Bassiner, V. Beilinson, H. Cortina, G. Cadena-Gómez, V. Montes y N.C. Nielsen (1999). Coffee seeds contain 11S storage proteins. *Physiologia Plantarum* 105: 122-131.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Burg, H.C.J., S. Ramulu, G.M.M. Bredejeijer, S. Roest, P. Dijkhuis, J.J. Van Hoogen y A. Houwing (1989). Patterns of phenotypic and tuber protein variation in plants derived from protoplasts of potato (*Solanum tuberosum* L. cv. Bintje). *Plant Science* 64: 113-124.
- Bustamante, J. (1996). Caracterización Molecular de Genotipos de Café. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Kaeppler, S.M., H.F. Kaeppler y Y. Rhee (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179-188.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Larkin, P.J. y W.R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation. A novel source of variability from cell cultures for Plant Improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 197-214.
- Medina, R., M. Faloci, M.A. Marassi y L.A. Mroginski (2004). Genetic stability in rice micropropagation. *Biocell* 28(1):13-20.
- Menéndez-Yuffá, A., R. Fernandez Da Silva, L. Rios y N. Xena de Enrech (2000). Mitotic aberrations in coffee *Coffea arabica* cv. 'Catimor' leaf explants and their derived embryogenic calli. *Electronic Journal of Biotechnology* 3 (2): www.ejbiotechnology.info/content/vol3/issue2/full/1/1.pdf.
- Menéndez-Yuffá, A. y E. García de García (1996). Análisis de patrones isoenzimáticos en callos embriogénicos y no embriogénicos de café. *Phyton, International Journal of Experimental Botany* 58 (1/2):15-22.

- Menéndez-Yuffá, A. y E. García de García (1997). Morphogenic events during indirect somatic embryogenesis in coffee "Catimor". *Protoplasma* 199: 208-214.
- Menéndez-Yuffá, A., E. García de García y M. Segura-Nieto (1994) Comparative study of protein electrophoretic patterns in different stages of somatic embryogenesis in *Coffea arabica* cv. Catimor. *Plant Cell Reports* 13: 197-202.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Rani, V., A. Parida y S. N. Raina (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in micropropagated plants of *Populus deltoids* Marsh. *Plant Cell Reports* 14: 459-462.
- Ray, T., P. Saha y S.C. Roy (2006). Commercial production of *Cordyline terminalis* (L.) Kunth. from shoot apex meristem and assessment for genetic stability of somaclones by isozyme markers. *Scientia Horticulturae* 108: 289-294.
- Söndhal, M. y J. Lauritis (1992). Coffee. En: Hammerschlag, F.A. and Linz, R.E. (eds.), p. 401-419. *Biotechnology in agriculture*. CAB International, Walling.
- Van der Bank, H., M. Van der Bank y B.E. Van Wyk (2001). A review of the use of allozyme electrophoresis in plant systematics. *Biochemical Systematics and Ecology* 29: 469-483.