

Thesis
R788es
c.2

AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ORION - IICA - CATIE

ESCUELA DE POSGRADUADOS

20 DIC 2001

RECIBIDO

Turrialba, Costa Rica

**ESTUDIO DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL EN CLONES DE HÍBRIDOS F1 DE
CAFÉ (*Coffea arabica* L.) REGENERADOS DE SUSPENSIONES CELULARES
EMBRIOGÉNICAS.**

POR

FREDY UBER ROSALES LONGO

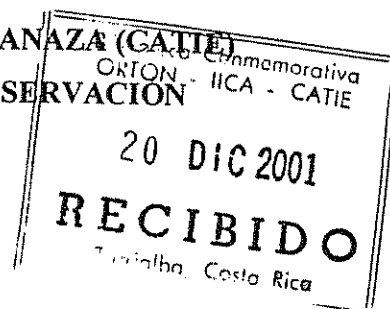
CATIE

Turrialba, Costa Rica
2001

Ministerio Costarricense de Agricultura y Ganadería
ORITON - IICA - CATIE
20 DIC 2001
RECIBIDO
Turrialba, Costa Rica

**ESTUDIO DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL EN CLONES DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) REGENERADOS DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS.**

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA (CATIE)
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO



ESTUDIO DE LA VARIACIÓN SOMACLONAL EN CLONES DE HÍBRIDOS F1 DE CAFÉ
(*Coffea arabica* L.) REGENERADOS DE SUSPENSIONES CELULARES EMBRIOGÉNICAS.

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el
Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, como
requisito parcial para optar por el grado de

Magister Scientiae

por

✓
Fredy Uber Rosales Longo

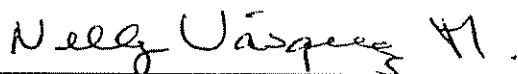
Turrialba, Costa Rica

2001

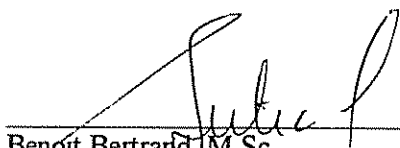
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

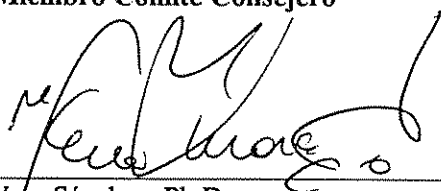


Nelly Vásquez, M.Sc.
Consejero Principal



Benoit Bertrand, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

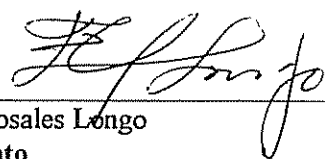
Philippe Vaast, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Vera Sánchez, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Ali Moslemi, Ph.D.
Director Escuela de Posgrado



Fredy Rosales Longo
Candidato

DEDICATORIA

A Dios
A mi esposa, Ruth Emilsa
A mi hijo, Juan Carlos
A mi hija, María Emilsa
A mi madre, Maurilia Angélica
A mi hermano, Juan Carlos
A mi patria, Guatemala, la tierna indiana de los pies descalzos

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por abandonar todo por seguirme y vivir conmigo momentos difíciles.

Al CATIE por enseñarme una manera distinta de encarar la investigación.

Al Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas, ICTA, de Guatemala, por darme esta oportunidad.

A los miembros de mi comité consejero.

A todo el personal de los laboratorios de Biotecnología del CATIE.

**A mis amigos y amigas de la promoción de maestría 2000-2001, por mostrarme nuevas rutas de
amistad y cariño.**

A la Dra. María Elena Aguilar y al Dr. Francois Anthony, por su preocupación, confianza y apoyo.

A todo el personal de la Biblioteca Conmemorativa ORTON.

A la escuela de posgrado del CATIE.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
CONTENIDO	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
<i>1. Introducción.....</i>	<i>1</i>
1.1. Caracterización del problema.....	1
1.2. Importancia de la investigación.....	2
1.3. OBJETIVOS.....	3
1.3.1. General	3
1.3.2. Específicos.....	3
1.4. Hipótesis	3
<i>2. Revisión de literatura</i>	<i>4</i>
2.1. La embriogénesis somática.....	4
2.2. La variación somaclonal	4
2.3. El origen de la variación somaclonal.....	5
2.4. Cambios en el cariotipo.....	6
2.5. Elementos transponibles	6
2.6. Metilación del ADN.....	7
2.7. Disturbios en el ciclo celular.....	7
2.8. Variaciones citológicas	8
2.9. Expresión Fenotípica.....	8
2.10. Factores de procesos de micropropagación que pueden estar involucrados en la generación de variación somaclonal.....	9
2.11. Variación somaclonal en café.....	10
2.12. Los factores morfológicos y fisiológicos de las mutaciones.....	10
2.13. Implicaciones de la variación somaclonal, en un proyecto de micropropagación comercial	11
2.14. Referencias bibliográficas.....	13
<i>3. Variación fenotípica en plantas adultas, relacionada con la variación somaclonal en clones de híbridos F1 de café Coffea arabica L. regenerados de suspensiones celulares embriogénicas.....</i>	<i>15</i>

3.1. Introducción.....	15
3.2. Materiales y métodos.....	16
3.2.1. Localización	16
3.2.2. Diseño del Experimento y Material Vegetal	16
3.2.3. Tamaño de la muestra	17
3.2.4. Variables medidas	18
3.2.5. Análisis de la información.....	19
3.3. Resultados y discusión.....	20
4. <i>Características anatómicas, morfológicas y fisiológica: Función diferencial en la variación somaclonal en clones de híbridos de café Coffea arabica L.</i>	40
4.1. Introducción.....	40
4.2. Materiales y métodos.....	41
4.2.1. Localización	41
4.2.2. Material Vegetal	41
4.2.3. Estudio de las Variables Fisiológicas.....	42
4.2.4. Estudios Histológicos y Microscopía Electrónica.....	42
4.2.5. Análisis de la Información	42
4.3. Resultados y discusión.....	43
4.3.1. Variables Fisiológicas	43
4.3.2. Estudio de los cortes histológicos y Microscopía Electrónica.....	45
4.4. Referencias Bibliográficas	50
5. <i>Evaluación fenotípica y molecular de la variación somaclonal en clones de híbridos de café en la fase de vivero.</i>	51
5.1. Introducción.....	51
5.2. Materiales y métodos.....	53
5.2.1. Material vegetal	53
5.2.2. Técnicas de muestreo	54
5.2.3. Variables medidas	55
5.2.4. Análisis de la información.....	55
5.2.5. Evaluación de los patrones de ADN por AFLP	56
5.3. Resultados y discusión.....	57
5.3.1. Evaluación Fenotípica	57
5.3.2. Evaluación de los patrones de ADN por AFLP en clones no conformes a su origen genético.....	64
5.4. Referencias bibliográficas.....	66
6. <i>Conclusiones</i>	68
7. <i>Recomendaciones</i>	70

Rosales-Longo, FU. 2001. Estudio de la variación somaclonal en clones de híbridos F1 de café (*Coffea arabica* L.) regenerados de suspensiones celulares embriogénicas Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica

Palabras claves: Variación Somaclonal, embriogénesis somática, suspensiones celulares embriogénicas, híbridos F1, *Coffea arabica* L, variación fenotípica, variación genotípica, clones.

RESUMEN

Se ha observado recientemente que en el proceso de embriogénesis somática a partir de suspensiones celulares embriogénicas, se generan variaciones somaclonales en individuos que son generalmente inutilizables para la comercialización. En este marco de trabajo, es necesario el conocimiento del problema de la variación somaclonal en el cultivo del café. Los objetivos del presente trabajo fueron: Caracterizar variantes somaclonales en plantas de café micropropagadas por embriogénesis somática, mediante el uso de indicadores morfológicos fisiológicos, en plantas adultas en campo definitivo. Estimar la probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales entre los diferentes híbridos F1 de café bajo estudio. Evaluar el efecto de la duración de las suspensiones celulares con respecto a la frecuencia de ocurrencia del fenómeno de variación somaclonal.

El trabajo se dividió en tres partes, a saber: a) el estudio de la variación somaclonal en campo definitivo en términos fenotípicos, que incluyó la caracterización por variables fenotípicas (altura del árbol, diámetro del tallo, número de domacios, densidad estomática y número de croloplastos en las células oclusivas de los estomas) b) Estudio anatómico y morfológico por microscopía de luz y electrónica, y el estudio diferencial de los mutantes en cuanto a Asimilación neta de CO₂ y Conductividad Estomática c) Estudio de la variación fenotípica en vivero para establecer las frecuencias de ocurrencia y la eficacia de las variables fenotípicas en identificación de variantes para el establecimiento de un control de calidad. Adicionalmente, se estudiaron molecularmente clones de un híbrido F1 de café, que no presentaba conformidad genética con respecto a sus progenitores, por medio de la técnica de AFLP (Fragmentos -de ADN- amplificados de longitud polimórfica)

Por medio de las técnicas de estadística de multivariantes en campo definitivo, en plantas adultas, se obtuvo que las observaciones se agrupan en dos grupos definidos, uno donde se ubican los variantes somaclonales más frecuentes y otro grupo donde se ubicaron las plantas normales y dos variantes que compartían características similares a las plantas normales, según las variables estudiadas. Los variantes somaclonales identificados fueron: "Gigante", "Angustifolia", "Dwarf", "Enano b", y "Variegata", todos fueron estudiados junto a una población de clones con expresión fenotípica conforme a la planta donante de explantes para el proceso de embriogénesis somática.

En vivero, la identificación por variables fenotípicas no resultó ser completamente efectiva, en virtud del escaso desarrollo de muchas plantas, lo que evita en términos generales la expresión fenotípica completa en las plantas. Los variantes identificados, se caracterizaron por baja talla y diámetros de tallo inferiores al promedio de las plantas normales. Muchas plantas con expresión fenotípica conforme al donante de explantes, no presentan un desarrollo completo por lo que muchas veces caen en la categoría que corresponde a las plantas anormales, según las variables estudiadas (altura de planta, diámetro de tallo, número de domacios, largo y ancho de las hojas). La categoría que en vivero es identificable con más precisión es la de las clones "Angustifolia".

Estudios en microscopio de luz indicaron que muestras provenientes de variantes somaclonales, no presentan diferencias anatómicas en cuanto a la forma y disposición de los mesófilos en la lámina foliar, así mismo tampoco se encontró diferencias en cuanto a la forma y disposición de células individuales. En microscopía electrónica de barrido, se determinó que las muestras provenientes de 6 categorías de plantas en función de la variación somaclonal, presentan diferencias importantes en cuanto a la forma, disposición y tamaño tanto de domacios como de estomas. Dos variables fisiológicas (asimilación neta de CO₂ y conductividad estomática), fueron estudiadas en 6 categorías de plantas en función de variación

somaclonal. No se encontró que estas variables fueran completamente diferenciales en el estudio. Se determinó que solo los variantes "gigantes" presentan una significativamente mayor conductividad estomática que el resto de categorías en un horario de 8:00 a 10:00 AM, en el estrato superior de los árboles, el cual se caracteriza por la no producción de grano

La frecuencia de ocurrencia de la variación somaclonal, es una función, tanto del material genético clonado, cómo de la edad de la suspensión celular de la cual provienen los embriones somáticos. Las diferencias fenotípicas en campo en plantas adultas, son tales que permiten caracterizar a los variantes somaclonales, los cuales son limitados en su número (cinco). En vivero se estudiaron clones del híbrido fl de café CR95 x RT6, ya que no presentaba conformidad fenotípica con sus progenitores en cerca del 30% de la población por medio de marcadores de ADN con la técnica de AFLP, se encontró que las plantas no son conformes genéticamente y que las diferencias de ADN, tampoco indican que sean producto de una variación somaclonal, por lo que se sugiere que las diferencias expresadas es debida a que los clones provienen de un híbrido diferente a CR95 x ET6.

Rosales-Longo, FU. 2001. Study of somaclonal variation in F1 hybrids clones of coffee, *Coffea arabica* L., regenerated by embryogenic cell suspensions. Thesis Mag Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Key words: Somaclonal variation, somatic embryogenesis, embryogenic cell suspensions, F1 hybrids, *Coffea arabica* L., phenotypic variation, genotypic variation, clones.

SUMMARY

It has been observed recently, that in the process of somatic embryogenesis starting from embryogenic cellular suspensions, variations somaclonales is generated in individuals that, are generally unusable for commercialization. The commercial liberation of plants of coffee taken place by the somatic embryogenesis should guarantee the genetic conformity of spread material, consequently a control of quality is required in the mass coffee plants production, previous to mass liberation to producers. In this work mark, it is necessary the knowledge of the problem of somaclonal variation in coffee cultivation.

The objectives of the present work were: To characterize somaclonal variants in coffee plants micropropagated by somatic embryogenesis in liquid medium, by means of the use of physiologic, morphologic and molecular markers, in mature plants in definitive field. Also, to estimate the probability of occurrence of somaclonal variation among the different ones clones of F1 hybrids under study. And, To evaluate the effect of cellular suspensions duration among the different ones clones of F1 hybrids of coffee plants, with regard of somaclonal variation phenomenon.

The work was divided in three parts, that is: a) The study of somaclonal variation in definitive field, in phenotypic terms that included the characterization for phenotypic variables (height of the tree, diameter of the principal stem, domatia number, stomatal density and chloroplasts number in the stomata guard cells. b) Anatomical and morphologic studies in light and electronic microscopy, and the differential study of mutants in terms of net assimilation of CO₂ and stomatal conductance. c) Study of phenotypic variation in nurseries, to establish the occurrence frequencies and the effectiveness of the phenotypic variables in identification of variants, in order to establish a quality control. Additionally, were studied clones of a hybrid one, molecularly, that it didn't present genetic conformity with regard to their progenitors, by means of the technique of AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

All plants used in this study, were produced by means of somatic embryogenesis. The processes included embryogenic cellular suspensions, using grow regulators as 2-4 dichlorophenoxyacetic acid for inducing the dedifferentiation of cells and its next development as somatic embryo.

By means of multivariate statistics techniques in definitive field, in mature plants, it was obtained two defined groups, one where the somaclones were more frequent and another group were located the normal plants and also two variants were located, shared similar characteristics to the normal plants, according to the studied variables. The somaclonal variants identified were: "Gigante", "Angustifolia", "Dwarf", "Enano b", and "Variegata", all were compared with a population of clones with phenotypic expression according to the plant donor of explants for the process of somatic embryogenesis

In nursery, the identification of variants by phenotypic variables didn't turn out to be totally effective, due to lack of development of many plants, this situation didn't permit the complete phenotypic expression in plants. The variants identified, was characterized by drop it carves and inferior stem diameters to the average of the normal plants. Many plants with phenotypic expression according to the explants donor, didn't present a complete development and many times fall in the category that corresponds to the abnormal plants according to the studied variables (plant height, stem diameter, domatia number, long and wide of the leaves) The category that is identifiable in nursery with more precision is "Angustifolia" clon

Studies in microscope of light indicated that samples coming from somaclonal variants, don't present anatomical differences as for the form and disposition of mesophylls in the leaves, likewise neither was differences as for the form and disposition of individual cells. In scanning electronic microscopy, it was

determined that the samples coming from 6 categories of plants, in function of the somaclonal variation, present important differences in as for the form disposition and so much size of stomata and stomata. Two physiologic variables (net assimilation of CO₂ and stomatal conductance), were studied in 6 categories of plants in function of somaclonal variation. It was not found that these variables were totally differential in the study. It was determined that only the giant variants present a bigger significant stomatal conductance with respect to the rest of categories in a 8:00 at 10:00 AM horary, in the superior stratum of the trees, which is characterized by no grain production.

It was concluded that the somaclonal variation frequency of occurrence, is a function of cloned material genetic, as well of the cellular suspension age, which the somatic embryos come. The phenotypic differences in field and in mature plants allows characterize the somaclonal variation, which are limited in their number (five).

In nursery, a clone of the F1 hybrid one of coffee (CR95 x RT6) studied, didn't present phenotypic conformity with its progenitors, near 30% of total population. The study was carried out by means of markers of DNA with the AFLP technique. It was found that the plants are not genetically conform with their progenitors. It was found many differences of DNA, neither indicate that they are product of a somaclonal variation. This result suggested that the expressed differences are due that the clones come from a different hybrid to CR95 x ET6.

In nursery the exact identification of somaclonal variation is related with the plants development. In smaller plants development, the identification is less effective. The phenotypic expression in nursery is not sufficiently developed in many plants, consequently, the identification of plants with regard to this expression can be difficult if the identification process is carried out in early stages of clones.

LISTA DE CUADROS

CUADRO 3 1	Valores promedio de las variables medidas para el estudio de la variación fenotípica de los variantes somaclonales identificados	20
CUADRO 3 2	Niveles de correlación entre cuatro variables diferenciales de plantas de café.	26
CUADRO 3.3.	Agrupamiento de las categorías de variantes según el conglomerado al que pertenecen.	28
CUADRO 3 4.	Discriminación de promedios por componente principal según su ubicación en cada conglomerado	29
CUADRO 3 5	Número de Observaciones y Porcentaje clasificados en cada Conglomerado.	30
CUADRO 3 6	Estimación Del error de clasificación para cada conglomerado.	30
CUADRO 3 7	Agrupamiento de categorías según el conglomerado al que pertenecen, sin el concurso de los variantes Gigante y Variegata	32
CUADRO 3 8	Número de observaciones y porcentaje clasificada dentro de los conglomerados	32
CUADRO 3 9	Estimación del error de alocaación por conglomerado.	33
CUADRO 3 10.	Frecuencias de Ocurrencia para tres categorías de plantas	40
CUADRO 3 11	Frecuencia de ocurrencia de tres categorías de plantas en clones de tres híbridos F1 de café	41
CUADRO 3 12	Valores de Ji-cuadrado por categorías de materiales genéticos de café y por edad de proliferación de suspensiones celulares	37
CUADRO 4 1.	Correlación entre variables fisiológicas en variantes somaclonales	43
CUADRO 4 2	Promedios de Tasa fotosintética y Conductividad Estomática para variantes somaclonales en el estrato alto y en el horario de 8:00 a 10 :00 AM.	44

CUADRO 5 1 Combinaciones de imprimadores según la enzima de restricción, para la amplificación de segmentos polimórficos de ADN.	56
CUADRO 5 2 Frecuencia de ocurrencia de Variación somaclonal en clones de 7 híbridos de café	57
CUADRO 5 3. Valores promedio de las variables medidas para la evaluación de la variación somaclonal en la etapa de vivero	59
CUADRO 5 4 Correlación entre las 5 variables estudiadas	60
Cuadro 5.5. Agrupamiento de las categorías de variantes según el conglomerado al que pertenecen	61
CUADRO 5 6 Número de observaciones y porcentaje clasificado en cada conglomerado	62
CUADRO 5 7. Tasas de error de ubicación de las observaciones en cada conglomerado.	63
CUADRO 5 8 Patron de polimorfismos por AFLP, según presencia (1) o ausencia (2) de bandas de ADN en un gel de poliacrilamida	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1	Características de un clon “Normal”, micropropagado a partir de suspensiones celulares	22
Figura 3.2	Características de un clon “Angustifolia”, micropropagado a partir de suspensiones celulares	22
Figura 3.3	Características de un clon “Dwarf”, micropropagado a partir de suspensiones celulares	23
Figura 3.4	Características de un clon “Enano b”, micropropagado a partir de suspensiones celulares	23
Figura 3.5	Características de un clon “Gigante”, micropropagado a partir de suspensiones celulares	24
Figura 3.6	Características de un clon “Variegata”, micropropagado a partir de suspensiones celulares	24
Figura 3.8	Correlación de las variables seleccionadas con los componentes principales 1 y 2	25
Figura 3.9	Distribución de las categorías en dos conglomerados	27
Figura 4.1	Cortes Transversales de la lámina foliar de 3 diferentes tipos de variantes somaclonales 1, 3, 5, 7, detalle del tamaño y la disposición de los estomas en Angustifolia, Dwarf, Enano b y planta normal, respectivamente. Fotos 2, 4, 6, 8, Disposición del mesófilo en Angustifolia, Dwarf, Enano b y planta normal, respectivamente	46
Figura 4.2	Micrografías: Disposición y tamaño del domacio en 5 diferentes variantes, 3, 4, 5, 6, , Variegada, Dwarf, Gigante, Enano b y Angustifolia, respectivamente. Micrografías 1 y 2 plantas normales. Micrografías 8 y 9, vista desde la sección adaxial de la hoja. Mostrando la protuberancia característica del domacio.	47
Figura 4.3	Disposición de los estomas en la superficie abaxial de las hojas de café. Micrografías 1, 2, plantas “normales” Micrografías 3, 4, 5, 6, 7, 8, Dwarf, Enano b, Gigante, Variegada, respectivamente. Micrografías 7 y 8, Angustifolia	49
Figura 5.1	Correlación de las variables seleccionadas con los componentes principales 1 y 2	60

1. Introducción

1.1. Caracterización del problema

Recientemente, se ha demostrado que para el café, la propagación masal de café por embriogénesis somática con el uso de biorreactores para inmersión temporal, es una forma eficiente de multiplicación de materiales vegetales heterocigóticos a gran escala (Etienne et al 1999). En el CATIE se ha desarrollado, con el apoyo del CIRAD, un proceso de propagación masal de embriones somáticos en biorreactores con inmersión temporal y métodos de siembra directa de estos embriones en substrato hortícola, lo que ha permitido la producción de grandes cantidades de embriones y reducción de costos (Etienne et al. 1999, Etienne-Barry et al. 1999). Sin embargo, se ha observado recientemente que en el proceso se generan variaciones somaclonales en individuos que son generalmente inutilizables para la comercialización (Etienne y Bertrand, 2001). La liberación comercial de plantas de café producidas por la embriogénesis somática debe garantizar la conformidad genética de material propagado, por consiguiente se requiere un estricto control de calidad en la producción masal de plantas de café, previo a la liberación comercial que garantice el producto que se le entrega a productores. En este marco de trabajo, es necesario el conocimiento detallado del problema de la variación somaclonal en el cultivo del café.

El estudio de variantes en café producido por embriogénesis somática ha sido tratado por varios autores (Sondahl y Luritis, 1992; Etienne y Bertrand, 2001; Menéndez-Yuffa et al 2000; Rani et al, 2000) desde diferentes puntos de vista. Sin embargo, aún el conocimiento detallado del problema es todavía insuficiente para controlar el problema de la variación somaclonal, particularmente en cuanto a las descripciones fenotípicas de los diferentes tipos de variantes tanto en campo definitivo como en vivero. Lo cual es un paso primario para comprender el fenómeno, antes de buscar soluciones prácticas.

Se acepta que el uso de reguladores de crecimiento puede inducir variación durante la micropropagación. Se presume que el uso de auxinas durante la producción de callo embriogénico y su proliferación en suspensión embriogénica, específicamente el ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D), está involucrado en la aparición del fenómeno de variación somaclonal, sin que se haya determinado esto con exactitud (Duncan, 1997; Larkin y Scowcroft, 1981; Skirvin et al. 1994). El primer evento causante de la inducción de variabilidad por cultivo de tejidos puede ser la alteración en el ciclo celular, quizá causado por un desbalance en los juegos de nucleótidos o efectos de hormonas exógenas requeridas (Peschke y Phillips, 1992; Klug, 1999). Por otro lado, el tiempo durante el cual los cultivos

se han mantenido *in vitro* está entre los más importantes factores involucrados en la inducción de la variación somaclonal (Skirvin, 1994).

Como consecuencia de la falta de información sobre el origen y conocimiento de la variación somaclonal y los variantes somaclonales y de la importancia de su frecuencia de ocurrencia en el cultivo del café, no se ha desarrollado un protocolo que establezca un adecuado sistema de control de calidad en las diversas fases del proceso de multiplicación, semillero de embriones somáticos, vivero y almácigo, que permita sistemáticamente controlar el problema de la variación somaclonal

1.2. Importancia de la investigación.

Actualmente, dentro del marco del proyecto regional centroamericano de mejoramiento de la caficultura, PROMECAFE, , es prioritario el desarrollo de variedades de café de alto potencial de rendimiento y características de resistencia a plagas y enfermedades, así como buen gusto en la catación. Al momento, se han desarrollado varios híbridos F1 de buenas características agronómicas (Bertrand et al 1999).

El café (*Coffea arabica* L.) es una especie con alto grado de autofertilidad y una estrecha base genética, por lo menos en cultivares que se siembran en América (León, 2000). En plantas autógamias, para la fijación de caracteres luego de la hibridación, las generaciones F1, heterocigóticas, requieren alrededor de 8 a 10 autofecundaciones para alcanzar un nivel de homocigosis del 90% (Allard, 1980). Para obtener una variedad estable capaz de lograr propagación masiva por semilla, se requieren unos 30 años en este cultivo (Bertrand et al 1999). Puede lograrse ahorro en tiempo y recurso mediante el uso de la micropropagación o mediante el uso de plantas androestériles (Bertrand et al 1999).

La clonación de los mejores híbridos es la forma más eficaz de garantizar el progreso genético máximo por unidad de tiempo (Bertrand et al 1999; Dufour y Pereira, 1995). La heterosis se puede fijar de esta manera en forma rápida si se compara con el proceso de selección genealógica (Bertrand, 1999). Gran parte del efecto de la heterosis, se perdería en un régimen de continuas autofecundaciones, en especies autógamias (Allard 1980). Si bien la micropropagación representa una herramienta de grandes potencialidades, debe cuidarse celosamente las garantías de conformidad genética en un proceso de micropropagación masal comercial, que se brinda a los industriales, propagadores y productores. El estudio de la variación somaclonal es particularmente importante, por cuanto se desea perfeccionar la producción masal comercial de híbridos F1 de alto potencial de rendimiento. El estudio de la variación somaclonal es un paso básico y necesario en el proceso de control de calidad

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

Contribuir al desarrollo de información útil para la obtención de un protocolo de detección de variantes somaclonales en semillero de embriones somáticos y almácigo de café, a fin de establecer las bases de un adecuado control de calidad

1.3.2. Específicos

- Caracterizar variantes somaclonales en plantas de café micropropagadas por embriogénesis somática, mediante el uso de indicadores morfológicos y fisiológicos, en plantas adultas en campo definitivo
- Estimar la probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales entre los diferentes híbridos F1 de café bajo estudio.
- Evaluar el efecto de la duración de las suspensiones celulares con respecto a la frecuencia de ocurrencia del fenómeno de variación somaclonal.

1.4. Hipótesis

- La probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales en las poblaciones de plantas de café producidas por embriogénesis somática, no es significativa.
- Los tipos de variantes son en número limitados, además caracterizables mediante el uso de indicadores morfológicos y fisiológicos y moleculares
- La frecuencia de ocurrencia de la variación somaclonal no es función de los materiales genéticos, híbridos F1 en estudio.
- La edad de las suspensiones celulares, no es factor inductor de la variación somaclonal.

2. Revisión de literatura

2.1. La embriogénesis somática

En las plantas con flores, la reproducción sexual involucra la “doble fertilización” donde un núcleo espermático se une con la célula huevo para formar el cigoto, el cual llega a formar el “embrión”. La meiosis precede a la formación de los gametos y la fecundación reestablece el número somático de cromosomas. El otro núcleo espermático se une a los núcleos polares, los cuales usualmente se funden en un núcleo central, resultando en células “triploides” las cuales conforman el endospermo. Sin embargo, en muchas plantas vasculares la reproducción sexual es regularmente combinada o reemplazada parcialmente con diferentes formas de reproducción asexual. La reproducción asexual en plantas con semillas (apomixis) puede dividirse en dos grandes grupos: reproducción vegetativa y agamospermia. La agamospermia incluye a los “embriones adventicios” y la “apomixis gametofítica” y resultan en la formación de uno o más embriones asexuales juntos o no, con el embrión cigótico que lleva a la poliembrionía (Sharma y Thorpe, 1995).

Los embriones adventicios incluyen la formación de un embrión directamente de una célula somática en el óvulo del esporofito materno como los tejidos nucleares o de los integumentos, los cuales crecen sin la intervención o formación del saco embrionario y las células huevo (Sharma y Thorpe, 1995).

Con base en los fenómenos naturales de embriogénesis adventicia se explota la embriogénesis somática. La embriogénesis es el proceso de iniciación y desarrollo del embrión (Finer, 1994). La embriogénesis somática en tanto, es aquella provocada experimentalmente en cultivo *in vitro* a partir de células somáticas, entendidas éstas como células diploides comunes, que constituyen los tejidos vegetales (Etienne et al 1999).

El cultivo de células y callos que tienen el potencial de producir plántulas vía embriogénesis somática son referidos como cultivos embriogénicos. Los cultivos embriogénicos son ampliamente utilizados para la obtención de plantas transgénicas, variantes somaclonales y variantes (Franklin y Dixon, 1994).

2.2. La variación somaclonal

La variación somaclonal (VS) es aquella variación que se genera en plantas como resultado de algún tipo de cultivo *in vitro* (Skirvin et al 1994; Larkin y Scowcroft, 1981). Puede suceder por variación preexistente o bien por la inducción de la misma. Algunos científicos agregan que la variación

somaclonal debe ser heredable a través del ciclo sexual. Sin embargo, no siempre es factible demostrar la heredabilidad debido a un complejo de incompatibilidades sexuales, escasés de semilla, poliploidía o prolongados periodos de regeneración (Skirvin et al. 1994).

En general no hay acuerdo sobre el concepto de la variación somaclonal. Esta no debe ser considerada como exclusivo producto del cultivo de tejidos ya que el concepto de mutación es mucho más antiguo y en general, contiene al concepto de variación somaclonal: toda o cualquier modificación que conduzca a un cambio en las estructuras autoreproductoras (Allard, 1980). Las mutaciones incluyen variaciones en los genes, cromosomas, citoplasma, etcétera (Krug, 1949). En este estudio se considera que la variación somaclonal no es un concepto que pueda considerarse exclusivo producto de la micropropagación *in vitro*, si bien se estudia la variación somaclonal producida por los procesos de propagación *in vitro*. En lo sucesivo en este documento se entenderá a la variación somaclonal, según el primer concepto enunciado en este apartado.

En sus principios, la aplicación del cultivo de tejidos, fue considerada una metodología de propagación vegetativa rápida y confiable con la premisa de que las plantas derivadas de una planta madre eran genéticamente idénticas a la planta madre original, si el explante contiene meristemos preformados. Sin embargo, cuando se empleaban vías alternas de regeneración adventicia *in vitro* (procesos organogénicos) la desuniformidad clonal fue la respuesta predominante (Duncan, 1997). Es importante entender que el cultivo *in vitro per se* es extremadamente estresante sobre las células vegetales e involucra procesos altamente mutagénicos durante el establecimiento del explante, la inducción de callo, mantenimiento, inducción de embriones y regeneración de plantas (Duncan, 1997; Larkin y Scowcroft, 1981; Peschke y Phillips, 1992; Côte et al, 1998)

2.3. El origen de la variación somaclonal

Las causas de la variación somaclonal no son bien comprendidas y no están completamente dilucidadas. Sin embargo entre los tipos de variación heredable, han sido encontrados cambios simples en un par de bases, deleciones cromosómicas, translocaciones y cambios en la ploidía. Las variaciones no están limitadas al genoma nuclear; se han utilizado análisis de enzimas de restricción de ADN mitocondrial aislado, para demostrar variación en la esterilidad controlada por la mitocondria (Skirvin, 1994; Rani et al, 2000)

2.4. Cambios en el cariotipo

En el pasado reciente fue usual asumir que los variantes entre los somaclones eran consecuencia de un cambio significativo en el cariotipo, tal el caso de aneuploides o poliploides (Larkin y Scowcroft, 1981). Se ha asumido que la poliploidía en el cultivo de tejidos toma lugar gracias a mecanismos similares a aquellos observados *in vivo*; este fenómeno ha sido explicado como el producto de, o la poliploidización o de la fusión nuclear (Peschke y Phillips, 1992, Skirvin et al , 1994). La aneuploidía es más difícil de entender, debido a que es menos frecuente *in vivo* como parte natural del desarrollo de las plantas. Otra aberración cromosómica es la ruptura de cromosomas. Debido al hecho de que la ruptura de cromosomas y la variación fenotípica son resultados comunes del cultivo de tejidos, los estudios muestran pequeñas correlaciones entre los dos eventos (Lee y Phillips, 1988). Las deleciones, duplicaciones e inversiones cromosómicas son eventos aberrantes comunes, y están muchas veces relacionados con la replicación tardía de los cromosomas en el cultivo de tejidos (Duncan, 1997; Peschke y Phillips, 1992; Skirvin et al , 1994).

2.5. Elementos transponibles

Un elemento transponible o “elemento IS”, es una secuencia de ADN con la capacidad de moverse a través del genoma por un proceso de corte y reintegración (Klug y Cummings, 1999). La activación de elementos transponibles puede generar mutaciones estables o inestables de genes simples, lo que adicionalmente puede provocar ruptura de cromosomas, provocando así la variación somaclonal (Peschke y Phillips, 1992; Duncan, 1997). La activación de un elemento transponible autónomo, puede ser síntoma de inestabilidad genética en plantas regeneradas por cultivo *in vitro* o su progenie. Los elementos transponibles se mueven de una posición a otra, interrumpiendo la función génica cuando se inserta entre genes. La inserción de un elemento transponible en un sitio en particular adiciona nucleótidos al genoma. La secuencia de nucleótidos alterada, resulta en un evento de restricción por endonucleasas, afectando el marco de lectura de un gen y consecuentemente el patrón de ADN, suficiente para cambiar la codificación de una proteína (Duncan, 1997). Si los elementos transponibles están involucrados en las mutaciones derivadas del cultivo de tejidos, podría esperarse la transposición en el callo, lo cual ha sido demostrado en maíz (Peschke y Phillips, 1992). No obstante las anteriores consideraciones, hasta hace algunos años la evidencia de que los elementos transponibles estuvieran involucrados en la variación somaclonal era escasa (Peschke y Phillips, 1992).

2.6. Metilación del ADN

El ADN de la mayoría de los organismos eucarióticos se modifica después de la replicación mediante la adición enzimática de grupos metilo a las bases y los azúcares. En la mayoría de casos, la base implicada en la metilación es la citosina. Aproximadamente el cinco por ciento de los residuos de citosina del genoma de cualquier especie eucariótica están metilados, aunque el grado de metilación puede ser específico del tejido y puede variar de menos del dos por ciento a más del siete por ciento (Klug y Cummings, 1999)

La actividad de los elementos transponibles está correlacionada en muchos casos con la metilación reducida. La actividad de algunos genes en plantas está correlacionada con la metilación, mientras que en otros no. La habilidad de cambiar la regulación génica por la alteración de la metilación *in vitro* no prueba que este es el mecanismo normal de las plantas para tal efecto. Sin embargo, la abundante información sugiere una relación entre la metilación y la regulación génica. Por lo que se piensa que el cultivo de tejidos puede ser la causa de los cambios en la metilación del ADN (Peschke y Phillips, 1992)

La estructura del cromosoma, la metilación del ADN y el fenotipo están complejamente interconectados. La expresión génica puede ser alterada durante la embriogénesis somática. La metilación puede incrementar la variación de características debido a que muchos genes pueden ser afectados simultáneamente. El incremento de la metilación *in vitro* puede inducir una escalada en la actividad génica y la regulación. La metilación de un gene inactiva su transcripción (heterocromatina) y por lo tanto controla la expresión génica durante la embriogénesis somática. Un estado de hipometilación del ADN es esencial para la adquisición y liberación del potencial en células embriogénicas somáticas (Duncan, 1997). La hipometilación del ADN en células somáticas induce tempranamente un estado diferenciado de embrión cigótico. El ADN en los primeros estados de desarrollo en la embriogénesis somática contiene bajos niveles de ADN metilado, comparado con estados tardíos de los embriones cigóticos (Munksgaard et al , 1995)

2.7. Disturbios en el ciclo celular

La naturaleza del ciclo celular, que incluye la mitosis, es fundamentalmente la misma en todos los organismos eucarióticos. La semejanza de los hechos que conducen a la duplicación celular en muchos organismos evolutivamente distintos, sugiere que el ciclo celular está bajo un estricto control genético y que el programa genético que regula el ciclo celular se ha conservado a lo largo de la evolución. La

explicación de este programa genético no sólo proporciona información básica para comprender la naturaleza de los seres vivos, sino que, debido a la interrupción de dicha regulación, puede dar lugar a una división celular incontrolada, que caracteriza a las células malignas, por lo que ha sido grande el interés en conocer cómo los genes regulan el ciclo celular (Klug, 1999; Lewin, 2000).

El primer evento causante de variabilidad inducida por el cultivo de tejidos puede ser el disturbio del ciclo celular, provocado quizá por el desbalance de los juegos de nucleótidos o los efectos de hormonas exógenas. En los casos extremos, la poliploidía puede resultar en la terminación inapropiada de la mitosis. En extremas instancias, la inusual replicación tardía de la heterocromatina puede resultar en la ruptura y conducir (directa o indirectamente) a la aneuploidía. Los posibles efectos en un nivel génico de la alteración del ciclo celular fueron discutidos en los apartados anteriores. En general, la aparición de la variación somaclonal implica una etapa de crecimiento celular desorganizada, de tipo callo o meristemo adventicio (Karp, 1991).

2.8. Variaciones citológicas

Es importante señalar que el cultivo *in vitro* no es siempre el factor que induzca variación *per se*. Algunas variaciones citológicas pueden ya existir en el explante, especialmente para especies polisómicas. En estas especies y quizá en aquellas especies no polisómicas, la selección del explante es un factor determinante de la variación citológica (Lee y Phillips, 1988).

Menéndez -Yuffa et al. (1999) encontraron diferentes tipos de células en callos embrigénicos de café, incluyendo aquellos que no se encontraban en proceso de división con un pequeño y redondeado núcleo. Estos autores encontraron que muchas células meristemáticas eran pequeñas con citoplasmas teñidos y prominentes núcleos con la cromatina condensada, así mismo las células del parénquima tenían formas alargadas. Lo importante de estos hallazgos es la relación entre las diferencias morfológicas de las células y sus contenidos con los sucesos de variación. Estas células estudiadas mostraron, en un 25% mitosis anormales incluyendo cambios en el número de cromosomas tales como aneuploides con un número menor de cromosomas que los del café ($2n=2x=44$), así como poliploides.

2.9. Expresión Fenotípica

La expresión del gen se considera a menudo como si los genes actuasen en un sistema cerrado, de “caja negra”, en el que la presencia o ausencia de productos funcionales determina directamente el fenotipo conjunto de un individuo. La situación es en realidad mucho más compleja. La mayoría de los productos génicos actúan en el medio interno de la célula; las células interactúan unas con otras de varios modos y el organismo debe sobrevivir en diversas situaciones ambientales. La expresión del gen

y el fenotipo resultante es modificada a menudo mediante la interacción entre el genotipo concreto del individuo y el ambiente interno y externo (Klug, 1999).

Algunos fenotipos variantes se expresan siempre con un fenotipo concreto, mientras que otros dan lugar a una proporción de individuos cuyos fenotipos no se pueden distinguir del normal (tipo silvestre). El grado de expresión de un carácter concreto se puede estudiar cuantitativamente, determinando la “penetración” y la “expresividad” del genotipo en estudio. El porcentaje de individuos que muestran, al menos en algún grado, la expresión de un genotipo mutante define la penetración de la mutación. Por otro lado, el *rango de expresión* define la expresividad del genotipo mutante, es decir si las mutaciones se presentan en grados de severidad para la misma característica (Klug, 1999). Un organismo que tiene un genotipo mutante, puede presentar una variación considerable en la expresión del fenotipo correspondiente. En algunos casos, un porcentaje de individuos variantes puede no expresar el fenotipo en absoluto (Allard, 1980; Klug, 1999; Lewin, 2000).

2.10. Factores de procesos de micropropagación que pueden estar involucrados en la generación de variación somaclonal.

La presencia de 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), para la inducción y proliferación de embriones somáticos puede afectar la estabilidad genética de las células embriogénicas, ya que este regulador de crecimiento es considerado el responsable de algunas variaciones somaclonales observadas en plantas regeneradas, en varias especies. El efecto es principalmente una reducción en ploidía en los cultivos embriogénicos. Alteraciones en la ploidía son asociadas con la pérdida de embriogenicidad. Se considera que la incidencia de la aparición de la variación somaclonal puede aumentarse con el incremento de la concentración de 2,4-D empleado en el medio de cultivo (Merkle et al. 1995), así como el tiempo de exposición al mismo (Skirvin et al. 1994; Merkle et al. 1995). Otro factor involucrado es la fuente del explante. Tejidos altamente diferenciados (como raíces, hojas y tallos) causan más variabilidad que explantes con meristemos preexistentes como yemas axilares y ápices (Skirvin et al. 1994; Peschke y Phillips, 1992; Duncan, 1997). La edad del cultivo, también se considera como un factor involucrado en la variación somaclonal (Duncan, 1997), el cual está asociado al tiempo de exposición al 2,4-D.

2.11. Variación somaclonal en café

Varios autores reconocen que la variación somaclonal puede ser una fuente importante de variabilidad, que puede ser usada por los mejoradores de plantas (Larkin y Scowcroft, 1981; Peschke y Phillips, 1992; Skirvin et al, 1994; Duncan, 1997;) En café los trabajos de la Nestlé, en Ecuador sugieren variaciones beneficiosas (Álvarez, 1996) Este autor indica que la variación somaclonal es importante fuente de variabilidad genética aplicable en mejoramiento, para características de extractabilidad de carbohidratos o aceites, mejoramiento en la calidad de la taza, mejoramiento de las características organolépticas de Robusta (*C. canephora*) y mejoramientos o por lo menos la no pérdida de características agronómicas deseables. Si bien en los trabajos de Álvarez (1996) se encontró diferencias fenotípicas como vigor, arquitectura del planta y rendimiento en variantes somaclonales de café arábigo, no se establece si estas diferencias son estadísticas; en general el trabajo no es concluyente respecto a las bondades de la variación somaclonal

Etienne et al (1999) indican que en general existen pocos datos disponibles sobre el comportamiento en el campo y la conformidad genética de las plantas provenientes de embriogénesis somática; varios trabajos tratan el tema (Sondhal y Luritis, 1991; Etienne y Bertrand, 2001; Menéndez-Yuffa et al 2000, Rani et al, 2000) En trabajos de Sondhal (1991) se encontró un 10% de variabilidad en plantas de café arábigo evaluadas; entre las variantes se hallaron modificaciones en la morfología de las ramas, el tamaño de las plantas, el color y la forma del fruto, aumento de la producción, variabilidad en la precocidad y susceptibilidad o tolerancia a enfermedades

Los trabajos de Etienne y Bertrand (2001), han arrojado información importante que abre el camino para el desarrollo de un estudio más profundo de la variación somaclonal en café como producto de la aplicación de la embriogénesis somática como medio de propagación masal comercial. En este sentido, se entiende que la variación somaclonal no es deseada en virtud de que la mayoría de variantes son indeseables (Finer, 1995; Sandoval, 2000), y es el mismo criterio que se emplea en la ejecución del presente estudio

2.12. Los factores morfológicos y fisiológicos de las mutaciones.

Allard (1980) planteó que la efectividad en la mejora de plantas por mutaciones identificadas por las variaciones morfológicas y fisiológicas favorables queda limitada por la eficiencia con que se pueden identificar dichos cambios. Se han conseguido en muchas ocasiones mutaciones clorofilicas (plantas variegatas), probablemente porque son fáciles de detectar en el estado de plántula, en donde es fácil de

examinar un gran número de plantas. Probablemente por razones semejantes se han publicado frecuentemente alteraciones morfológicas notables, tales como variantes con el carácter enano o gigante, inflorescencias de tamaño o forma diferentes y similares. También es común la obtención de tipos tempranos o tardíos, pero las alteraciones fisiológicas con baja alterabilidad (como la tolerancia al frío o al calor) se publican raras veces. Los refinamientos en los métodos experimentales podrán facilitar la búsqueda de caracteres que son menos fáciles de identificar en la actualidad.

2.13. Implicaciones de la variación somaclonal, en un proyecto de micropropagación comercial

En café, las especies más cultivadas, *C. arabica* (planta autógama, $2n=4x=44$) y *C. canephora* (planta alógama, $2n=2x=22$), no poseen los mismos esquemas de mejoramiento genético. En ambos casos, un método de multiplicación vegetativa es deseable, con el fin de multiplicar de manera fiable las plantas que representan un interés económico y plantas híbridas sobresalientes espontáneas o procedentes de los programas de mejoramiento genético (Dufour y Pereira, 1995).

Desde 1992, PROMECAFE inició un programa de mejoramiento de *C. arabica*, cuyo principio se fundamenta en la hibridación de cultivares de orígenes silvestres provenientes de Etiopía y de Sudán. Las técnicas de micropropagación *in vitro* y más particularmente la embriogénesis somática representan el mejor medio de multiplicación masiva de los híbridos F1 seleccionados. Se espera que en el 2005, cuando se liberen los híbridos de mejores características, será necesario un método rápido y eficiente que en un nivel comercial garantice el suministro constante de tales híbridos (Bertrand et al 1999).

Para que lo anterior sea posible deben darse cuatro condiciones (Etienne et al 1999):

- a. Productividad elevada con costos de producción baja
- b. Propagación rutinaria en todos los híbridos seleccionados por los mejoradores
- c. Producción continua de vitroplantas en el laboratorio con un esquema escalonado de producción para evitar congestiones.
- d. Evitar la aparición de variantes somaclonales

“El objetivo inherente de la clonación de germoplasma élite, es la producción en masa de copias exactas, en un período de tiempo tan corto como sea posible. La variación somaclonal, en consecuencia, no es considerada deseable para este tipo de esfuerzos (Finer, 1994)”

La propagación masal de plantas por organogénesis o embriogénesis somática en el marco de un proceso comercial exige garantías en la conformidad genética del material propagado. Como se mencionó antes, el objetivo inherente de la clonación de germoplasma élite, es la producción en masa de copias exactas, en un período de tiempo tan corto como sea posible. Es una preocupación general encontrar métodos que minimicen o controlen la aparición de los variantes somaclonales considerados limitantes para la producción en gran escala y para el manejo de los bancos de germoplasma (Sandoval, 2000) En café cada planta en campo definitivo debe empezar a producir formalmente a los 3 años y tener una vida productiva de 10 a 15 años (ICAFE, 1989; Cardoso, 1994), por lo que plantas fuera de tipo pueden causar costos adicionales en reposición de plantas, producción atrasada, baja producción. Pero no solo el productor se afecta sino los mismos propagadores que pueden llegar a tener problemas serios por distribuir material no conforme (Sandoval, 2000)

2.14. Referencias bibliográficas

1. Allard, R. 1980. Principios de la mejora genética de las plantas Barcelona Omega
2. Álvarez 1996. Variación somaclonal en café. *Café y Cacao* 1(1): 1-5.
3. Bertrand, B; Aguilar, G; Santacreo, R; Anzueto, F 1999. El mejoramiento genético en América Central. *In* Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafios de la Caficultura en Centroamérica. San José, C.R. IICA, PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR. FRANCIA. p 57-496.
4. Côte, F; Sandoval, J; Marie, P; Auboiron, E 1998. Phenotypic variation in micropropagated bananas and plantains. *CORBANA* 23(50): 177-198.
5. Dufour, M; Pereira, A. 1995. La embriogénesis somática del cafeto: una herramienta para el mejoramiento genético. *In* Vasquez, N; Escalant, JV. eds. Simposio CIRAD/CATIE. Mejoramiento genético y desarrollo de cultivos tropicales. Turrialba, C.R. CIRAD/CATIE. p 56-57.
6. Duncan, RR. 1997. Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Advances in Agronomy* 58:201-240.
7. Etienne, H; Barry-Etienne, D; Vásquez, N; Berthouly, M. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café: el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. *In* Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafios de la Caficultura en Centroamérica. San José, C.R. IICA, PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR. FRANCIA. p 457-496.
8. Etienne, H; Bertrand, B. 2001. Truenes-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. *Tree Physiology* 21:1031-1038.
9. Etienne H., Anthony F., Dussert S., Fernandez D., Lashermes P., Bertrand B., 2001. Biotechnological applications for the improvement of coffee (*Coffea arabica* L.) (review). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*. En prensa.
10. Finer, JJ. 1994. Plant regeneration via embryogenic suspensión cultures. *In* Dixon, RA; González RA eds. *Plant cell culture. A practical approach.* 2 ed. Oxford University Press. Gran Bretaña. p 99-127.
11. Franklin, CI; Dixon, RA. 1994. Initiation and maintenance of callus and cell suspensión cultures. *In*
12. Dixon, RA; González RA eds. *Plant cell culture. A practical approach.* 2 ed. Oxford University Press. Gran Bretaña. p 1-26.
13. Karp, A. 1991. On the current understanding of somaclonal variation. *Oxford Surveys of plant molecular and cell biology* 7:1-58.
14. Klug, WS; Cummings, MR. 1999. *Conceptos de genética*. Prentice Hall. Madrid, España. 840 p.

15. Krug, CA. 1949. Mutacoes em *Coffea arabica* L. *Bragantia* 9(1-4): 1-10.
16. Larkin, PJ; Scowcroft, WR. 1981. Somaclonal variation – a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical Applied Genetics* 60: 197-241.
17. León, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. San José, C R. IICA. 522 p.
18. Lewin, B. 2000. *Genes* vii. Oxford University Press. New York. 990 p.
19. Menéndez-Yuffa, A; Da Silva, R; Ríos, L; De Enrech, NX. 2000. Mitotic aberration in coffee (*Coffea arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli (en línea).
20. *Electronic Journal of Biotechnology*. Consultado 13 nov. 2000. 3(2). Disponible en: <http://http://www.ejb.org/content/vol3/issue2/full/1/index.html>
21. Merkle, SA; Parrot, WA; Flinn, BS. 1995. Morphogenic aspects of somatic embryogenesis. *In*
22. Thorpe, AT ed. *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. Holanda p 155-204.
23. Munksgaar, D; Marrsson, O; Okkels, FT. 1995. Somatic embryo development in carrot is associated with an increase in levels of S-adenosylmethionine, S-adenosilhocysteine and ADN methylation. *Physiologia Plantarum*. 93: 5-10.
24. Peschke, VM; Phillips, R. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. *Advances in Genetics* 30: 41-71.
25. Sandoval, JA. 2000. Consideraciones sobre la variación somaclonal de *Musa* a partir de la organogénesis y la embriogénesis somática. Métodos potenciales para su identificación. Sin publicar.
26. Sharma, KK; Thorpe, TA. 1995. Asexual Embryogenesis in vascular plants in nature. *In* Thorpe, AT ed. *In vitro* embryogenesis in plants. Kluwer Academic Publishers. Holanda p 17-72.
27. Skirvin, RM; Mcpheeters, KD; Norton, M. 1994. Sources and frequency of somaclonal variation. *Hortscience* 29(11): 1232-1237.
28. Sondahl, MR; Lauritis, JA. 1992. Coffe. *In* *Biotechnology of perennial fruti crops*. p 401-420.

3. *Variación fenotípica en plantas adultas, relacionada con la variación somaclonal en clones de híbridos fl de café Coffea arabica L. regenerados de suspensiones celulares embriogénicas.*

3.1. Introducción

En el ámbito de trabajo sobre variantes somaclonales, tanto en café como en otras especies vegetales cultivadas, se han realizado estudios sobre las implicaciones cariológicas o citológicas de la variación somaclonal (Lapitan et al. 1984; Fluminhan y Aguiar-Perecin, 1998; Fluminhan y Kameya 1996; Menéndez-Yuffa et al. 2000). También hay varios estudios dedicados a la determinación de las variaciones del ADN de los variantes somaclonales (Al-Zahim et al, 1999; Rani et al. 2000). En todos se han logrado resultados que indican que existen diferencias notables entre variantes, ya sea en el nivel celular, ya sea en el nivel de planta adulta. Sin embargo pocos trabajos se refieren a las expresiones fenotípicas de los variantes (Sondhal y Luritis, 1991; Cote et al. 1998; Etienne et al. 1999). Las expresiones fenotípicas de los variantes son importantes, por cuanto éstas, en muchos de los casos, indican si las variaciones son a tal nivel que realmente afectan los aspectos importantes sobre el cultivo, como vigor en general, rendimiento y apariencia, que son en definitiva aspectos evaluados directamente por los viveristas o por los productores

Por otro lado, salvo el trabajo de Etienne y Bertrand (1991), no se ha caracterizado a los variantes en función de sus expresiones fenotípicas y en consecuencia, tampoco ha habido clasificación de los mismos, de tal suerte que puedan establecerse grupos de individuos, caracterizados por una serie de variables. El conocimiento de las variaciones fenotípicas de la variación somaclonal, permitirán una mejor comprensión del fenómeno y en el caso de producción comercial, el manejo y control de la variación somaclonal.

En el presente trabajo fueron evaluadas características fenotípicas a fin de realizar agrupamientos de los variantes somaclonales. Se evaluó en términos de frecuencias las probabilidades de ocurrencia de los variantes somaclonales y su relación con respecto al material genético (híbridos). Del mismo modo fue estudiada la variación somaclonal con respecto a las edades de suspensión celular utilizadas para la regeneración posterior de embriones somáticos. Adicionalmente, se evaluaron variables fenotípicas con el fin de establecer si pueden ser usadas como medidas diferenciales entre variantes somaclonales.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Localización

El trabajo fue llevado a cabo dentro de las instalaciones del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE (Canton Turrialba, Distrito de Cartago, Costa Rica, C.A.), a una altitud de 602 msnm Latitud 9° 53' norte Longitud: 83° 38' Oeste La precipitación promedio es de 220 mm mensuales La temperatura promedio mensual es de 21.8° C y la humedad relativa promedio mensual de 88.1%. Se realizaron las evaluaciones en el ensayo de variantes somaclonales ubicado en la finca "La Montaña".

3.2.2. Diseño del Experimento y Material Vegetal

El ensayo fue sembrado en 1998 y 1999. Fue diseñado para estudiar el efecto de la duración de las suspensiones celulares embriogénicas sobre la ocurrencia de variación. Se utilizaron clones de tres Híbridos F1 de café, *Coffea arabica*, L, producto de los siguientes cruces CATURRA7*ETÍOPE531, CATIMOR 8667* RUME SUDAN y SARCHIMOR5296* RUME SUDAN Todos provenientes del programa de mejoramiento genético de PROMECAFE. Los árboles están sembrados a una distancia de 1.5 m entre surcos por 0.75 m entre plantas. La fertilización corresponde al manejo que la administración del CATIE realiza normalmente, esto es: 200 kg/ha de Nitrógeno, 60 kg/ha de fósforo y 90 kg/ha de potasio, Calcio y Magnesio se aplican 36 y 12 kg/ha respectivamente; todo el fertilizante se aplica dos veces por año. No se practica aplicaciones para el control de plagas y enfermedades. El control de malezas se realiza con glifosato también en dos aplicaciones por año. La sombra de los cafetales es de plátano (*Musa AAB*), sembrada a 3 m por 3 mt.

Adicionalmente se incorporó a la evaluación, plantas de la variedad introgresada CATIMOR CR95 (Costa Rica 95), para ser utilizadas como plantas testigos, éstas fueron propagadas por procedimientos sexuales convencionales. Las plantas bajo estudio están organizadas en función de la edad de la suspensión celular de las cuales provienen. Así, las plantas están sembradas en lotes que corresponden a plantas derivadas de suspensiones celulares embriogénicas con duración de 0, 3, 6, 9 y 12 meses de proliferación celular, con 740, 765, 460, 577 y 1256 posturas por lotes respectivamente. Adicionalmente fue estudiado un lote de 210 plantas que provienen de embriones regenerados directamente de callo embriogénico.

Los clones de los híbridos fl de café, fueron regenerados a partir de suspensiones celulares embriogénicas, según el siguiente manejo: Primera fase: Esterilización superficial de los explantes, obtenidos de hojas juveniles. Cultivo de los explantes por un mes en medio sólido con un contenido de 2.26 µM de 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 4.92 µM de IBA (Ácido Indol 3 Butírico) y 9.84 µM de iP (Iso-penteniladenina). Los cultivos son transferidos por 6 meses más a otro medio sólido con contenidos de 2,4-d de 4.52 µM y 17.76 µM de BAP (Bencilaminopurina). Un callo embriogénico es obtenido de los explantes. En la Segunda Fase, el tejido embriogénico es ubicado en medio líquido con 4.52 µM de 2,4-D y 4.65 µM de Cinetina hasta producir una suspensión celular de agregados embriogénicos. Se realizaron ciclos de proliferación de un mes, los cuales variaron así: 0, 3, 6, 9 y 12 meses. Tercera fase: Los agregados celulares embriogénicos son situados en biorreactores (RITA®, CIRAD, Francia), en un medio de regeneración con 17.76 µM de BAP. Las plántulas fueron obtenidas, luego de 2 meses de subcultivo en los biorreactores y seguidamente plantadas en campo definitivo.

3.2.3. Tamaño de la muestra

El proceso de la ejecución del muestreo inició con un censo de las plantas sujetas a estudio. En total en el ensayo fueron inspeccionadas 4023 plantas. Se clasificó en un inicio a las plantas en dos categorías, a saber: normal y anormal, a fin de determinar el universo sobre el cual se partiría para realizar el muestreo.

La técnica de muestreo empleada fue la de *Muestreo aleatorio estratificado*, (Sheaffer et al. 1987) donde se aplicó la siguiente ecuación para determinar el tamaño de muestra:

$$n = \frac{\left(\sum_{i=1}^6 N_i \sigma_i \right)^2}{N^2 D + \sum_{i=1}^6 N_i \sigma_i^2}$$

i = número de estratos, 6 estratos, estos corresponden a los lotes de organización, según la edad de la suspensión celular empleada para derivar a partir de ellas, los embriones somáticos
 N = población de plantas anormales por cada estrato (797 en total para todos los estratos).

σ = Desviación estándar, ésta fue calculada sobre una base de inspección de 10 árboles con respecto a la altura de los mismos en cm, donde las desviaciones por estrato para esta variable fueron: 0 meses: 25.66; 3 meses: 27.28; 6 meses: 25.40; 9 meses: 25.11; 12 meses: 34.66; testigo callo: 22.23. Este muestreo con base a la altura de las plantas fue realizado solamente para el cálculo del tamaño de la muestra y no posee ninguna implicación específica o determinante.

El error de estimación fue establecido en 5 cm. Si bien el error de medición nunca alcanzó tal límite. El tamaño de la muestra calculado en global fue de: 130, se muestreó en total 142 plantas variantes, con asignación proporcional en función de la desviación calculada previamente.

3.2.4. Variables medidas

Se presentan entre paréntesis los códigos que identifican a las variables.

- Altura del árbol en cm. (*alt*)
- Diámetro del fuste del árbol en mm. (*diam*)
- Número de domacios por hoja (promedio de 5 hojas adultas) (*Ndom*)
- Largo de la hoja (promedio de 5 hojas adultas) (*lhoj*)
- Ancho de la hoja (promedio de 5 hojas adultas) (*lhoj*)
- Razón de largo de la hoja por ancho de la hoja (*la*).
- Hábito de ramificación, escala de 1 a 3, relacionado con el número de ramas secundarias y terciarias. (*hara*)
- Color del brote. (*br*)
- Número de cloroplastos en las células oclusivas de los estomas (promedio de 15 estomas) (*nclo*)
- Densidad Estomática, Número de estomas por mm² en la lámina foliar (*Dstom*)
- Índice de granos vanos, de una muestra de 100 granos o la totalidad de ellos cuando fue menor de 100 la producción del 5to corte (*vano*)
- Peso de grano en pergamino a una humedad de entre 0 y 1%, medida en gramos. (*per*)
- Peso de los frutos en gramos. (*cereza*)

3.2.5. Análisis de la información

Inicialmente se llevó a cabo un análisis estadístico individual (SAS Institute, 1989) para cada variable, a fin de establecer la consistencia de los datos y el grado de variabilidad de las observaciones para cada una de las variables estudiadas. Las variables cuantitativas presentaron mejor consistencia (en términos de variabilidad y distribución normal) y se emplearon para los subsiguientes análisis. Las variables categóricas y binomiales se emplearon únicamente para realizar una descripción del perfil de cada variante, el cual se presenta en el catálogo de referencia.

Se aplicaron Análisis de Variación (Montgomery, 1991), para las variables con mayor consistencia, las cuales fueron: alt, diam, ndom y destom.

Para alcanzar la maximización de la variancia y la reducción del número de variables, se usó un análisis de Componentes Principales, también para reducir el número de variables. Posteriormente, se analizaron las salidas de Componentes Principales con la aplicación de un análisis de Conglomerados y la aplicación de la Función lineal Discriminante, a fin de buscar agrupamientos y clasificaciones. Finalmente se realizaron tablas de frecuencia de ocurrencia de variantes y pruebas de Ji-cuadrado, a fin de establecer la correspondencia de la frecuencia de ocurrencia de las variantes con cada uno de los grupos ordenados, ya sea por material genético, ya sea por la duración de la suspensión celular (SAS Institute, 1989; Hernández, 1988; Gnanadesikan, 1977, Steel y Torrie, 1985).

3.3. Resultados y discusión

Fueron identificados por expresión fenotípica las siguientes categorías de plantas: Normales (nor), Dwarf (enano), Enano b, Angustifolia, Gigante, Variegada, los que se presentan en las figuras 3 1., 3.2., 3 3., 3 4. 3.5 y 3 6. Estas figuras corresponden al catálogo de referencia

En el Cuadro 3 1. se presentan los valores promedio de las variables finalmente empleadas en los análisis correspondientes, los cuales pertenecen a aquellas variables cuantitativas. Se conservaron las variables cuantitativas ya que presentaron consistencia en cuanto a variabilidad y distribución normal, a la vez que fueron criterios diferenciales entre las categorías de plantas identificadas

CUADRO 3.1. Valores promedio de las variables medidas para el estudio de la variación fenotípica de los variantes somaclonales identificados.

Categoría	Altura del árbol (cm) (alt)	Diámetro en del fuste (mm) (diam)	Densidad estomática (No./mm ²) (dstom)	Número de domacios (ndom)	Relación largo por ancho de la hoja (la)	Número de cloroplastos en las células oclusivas de los estomas (ncla)	Índice de granos en los vanos (vano)	Peso del grano en pergamino del quinto pase de cosecha. (tg) (per)
Normal	113.69 b	32.87 b	217.51 a	12.47 ab	2.70 a	15.91 a	0.11 a	29.19 ab
Dwarf	86.91 cb	22.79 cd	208.77 a	10.031 b	2.76 a	15.95 a	0.17 a	16.63 b
Enano B	61.43 c	17.72 d	199.33 a	12.23 ab	2.88 a	16.01 a	0.13 a	9.14 b
Angusti-Folia	81.74 cb	19.87 d	208.85 a	3.57 c	2.91 a	15.82 a	0.15 a	11.70 b
Gigante	185.67 a	32.87 a	44.87 b	13.67 a	2.54 a	16.48 a	0.04 a	43.07 a
Variegada	105.00 b	29.11 cb	213.07 a	12.50 ab	2.83 a	17.03 a	0.09 a	9.81 b
C.V. %	19.17	24.11	17.39	25.71	13.76	7.11	88.70	71.20
R ²	0.3947	0.44	0.401	0.53	0.05	0.01	0.04	0.1874

Promedios con la misma letra no son estadísticamente diferentes (P 0.05), prueba de Duncan.

Se advierte en el Cuadro 3.1 que, las variables relacionadas con el rendimiento (vano y per), así como la relación entre el largo por el ancho de las hojas no presentan variabilidad relacionada con el efecto de variación somaclonal. En consecuencia estas variables no pueden explicar o al menos caracterizar en

forma consistente a los variantes somaclonales. La explicación más apropiada en el caso de las variables relacionadas con el rendimiento es que la dinámica de producción del café es tal que muchas plantas normales pueden no producir o producir poco (CICAFE, 1988). No todas las plantas producen en el mismo año o el mismo ciclo. Además es importante considerar que la variable de rendimiento no fue medida en su totalidad, sino que se hizo la medición de un solo pase (el 5to pase) en la cosecha del 2001.

Si bien se aprecia en el Cuadro 3.1 la tendencia de los variantes somaclonales (VS) a producir mucho menos que las plantas normales, también es cierto que la variabilidad no está relacionada con el efecto de mutación. En el caso de los variantes denominados “gigantes”, se observa un mayor rendimiento, lo cual parece estar relacionado inversamente con su densidad estomática y directamente con su mayor conductividad estomática (Rosales-Longo, 2001).

Por otro lado, parecen discriminar significativamente a los variantes de las plantas normales, por lo que pueden ser empleadas como medidas diferenciales entre variantes. Las variables más relacionadas con esta circunstancia son aquellas que tienen que ver con el vigor de las plantas (alt y diam). Se observa que las plantas normales y las “gigantes”, están caracterizadas por un mejor porte y vigor. Las variables diam y alt diferencian estadísticamente a los “angustifolia”, “dwarf” y “enano b” de las plantas normales.

A partir de estos resultados se procedió a un análisis de Componentes Principales (SAS Institute, 1989). Los componentes principales explican en forma resumida el comportamiento de las variables seleccionadas así como también ayudan a maximizar la variancia y en consecuencia a establecer mejores condiciones para diferenciar los grupos. En la figura 3.8, se aprecia que las variables más relacionadas con cada uno de los Componentes Principales, según los valores de las *vectores característicos* (Gnanadesikan, 1977), son: la altura del árbol, el diámetro del fuste y el número de domacios en hojas adultas, esta relacionado con el componente principal 1. En tanto que, el componente principal 2 está caracterizado principalmente por la densidad estomática.

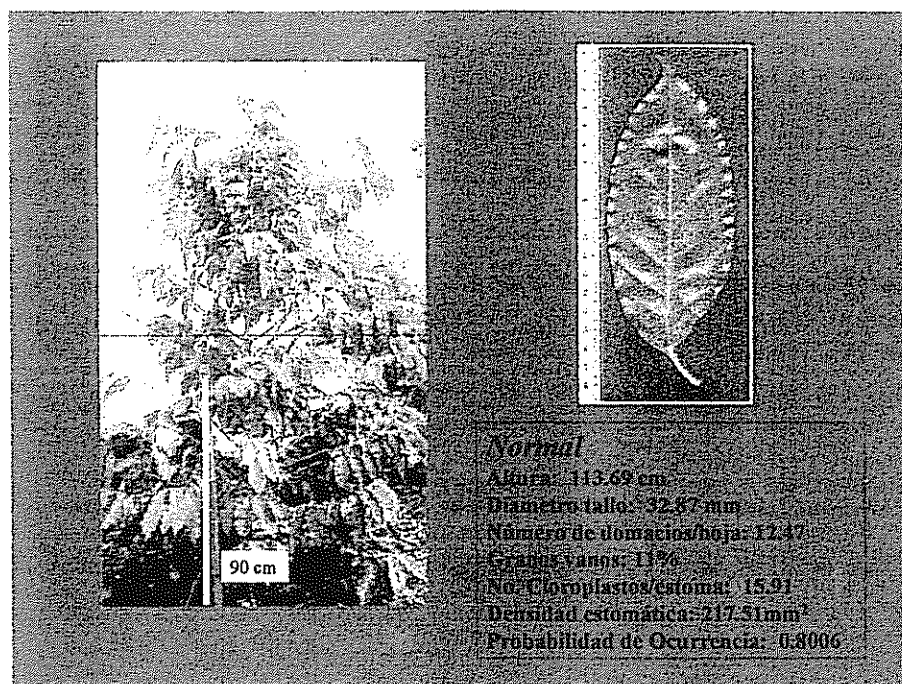


Figura 3.1. Características de un clon "Normal", micropropagado a partir de suspensiones celulares embriogénicas.

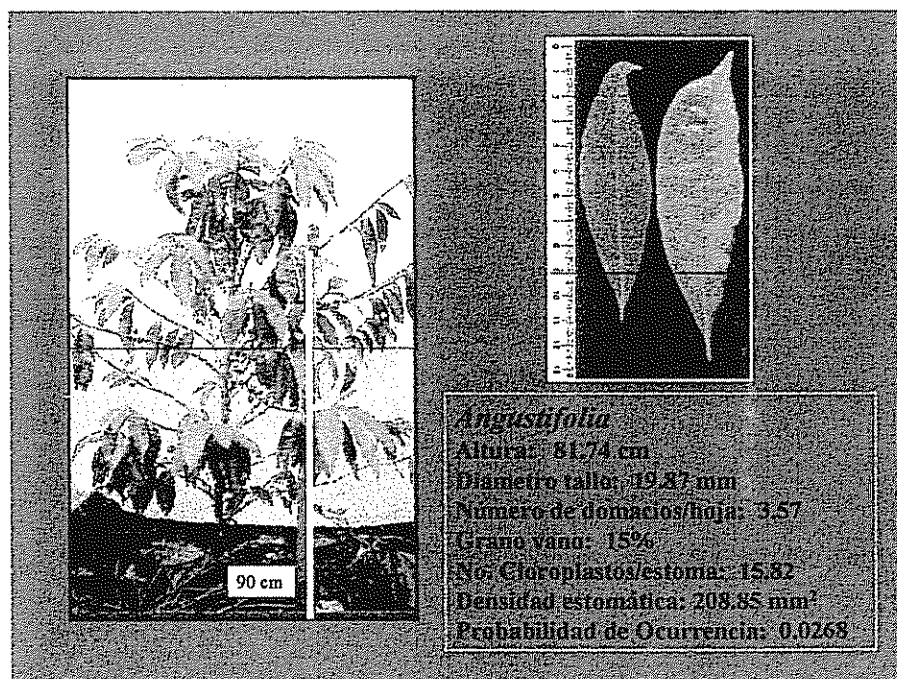


Figura 3.2. Características de un clon "Angustifolia", micropropagado a partir de suspensiones celulares embriogénicas.

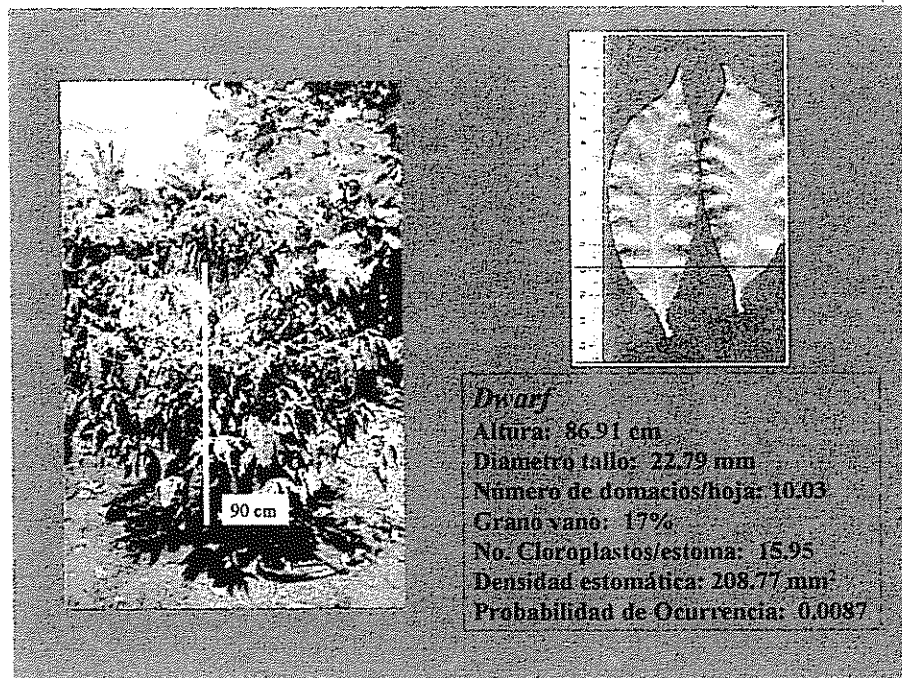


Figura 3.3. Características de un clon "Dwarf", micropropagado a partir de suspensiones celulares embriogénicas.

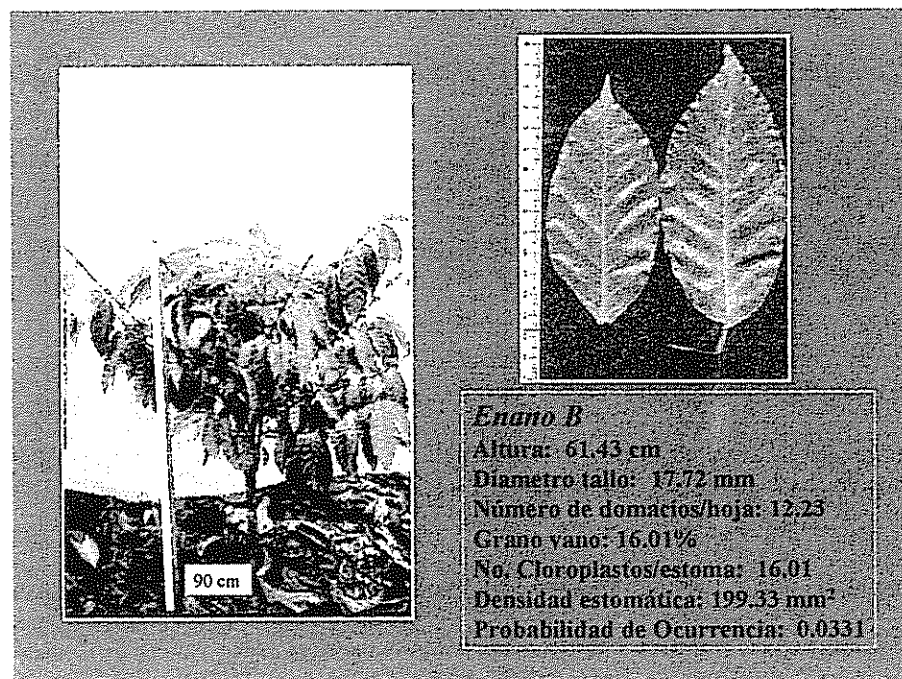


Figura 3.4. Características de un clon "Enano b", micropropagado a partir de suspensiones celulares embriogénicas.

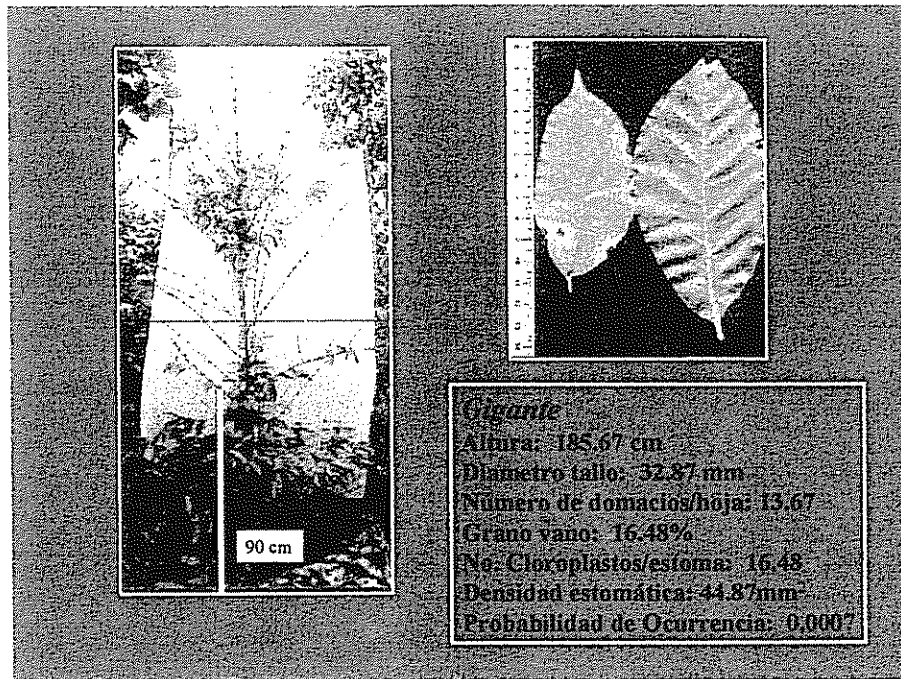


Figura 3.5. Características de un clon "Gigante", micropropagado a partir de suspensiones celulares embriogénicas

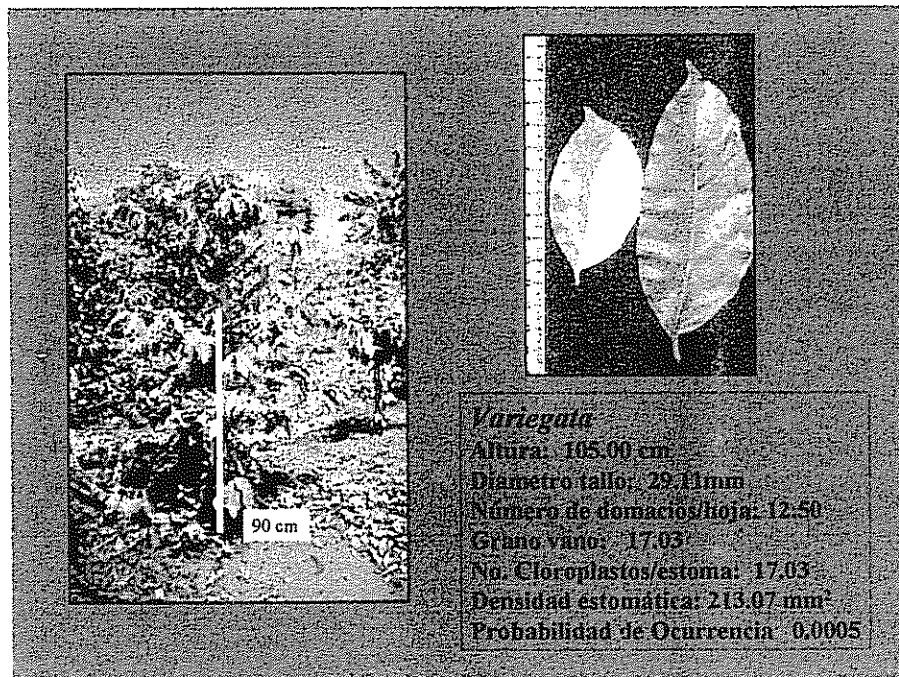


Figura 3.6. Características de un clon "Variegata", micropropagado a partir de suspensiones celulares embriogénicas.

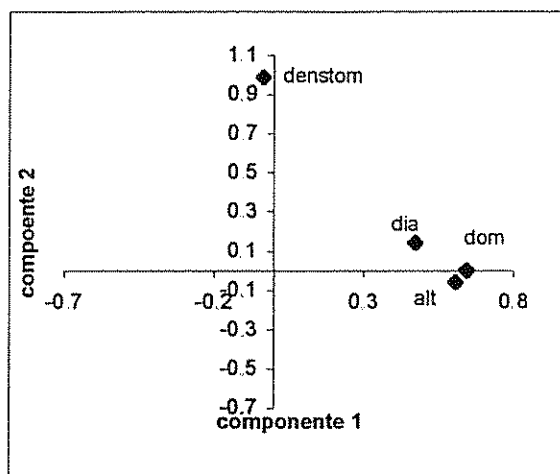


Figura 3.8. Correlación de las variables seleccionadas con los componentes principales 1 y 2.

Los componentes principales 1 y 2, explicaron el 76% de la variabilidad del conjunto de datos, por lo que puede interpretarse que no habrá pérdida importante de información si se trabaja solamente con estos dos componentes, los cuales individualmente explican el 51% y 25% del total de la variabilidad, respectivamente.

La densidad estomática, una variable anatómica, muestra ser independiente de las otras tres variables, por lo que como característica diferencial entre plantas parece actuar de manera independiente a las otras tres variables. Lo anterior es notable si se observa los valores de correlación entre variables en el Cuadro 3.2

Lo anterior es importante por cuanto puede estudiarse esta variable en forma aislada y mantener un nivel aceptable de confiabilidad en sus resultados de diferenciación entre muestras, tal que, pueda usarse como un procedimiento rutinario para establecer las diferencias entre plantas, en términos de la variación somaclonal

CUADRO 3.2. Niveles de correlación entre cuatro variables diferenciales de plantas de café

R	Altura del árbol	Diámetro del fuste	Densidad Estomática	Numero de domacios
Prob>r HO: Rho=0				
Altura del árbol	1.00			
Prob				
Diámetro del fuste	0.744	1.00		
Prob	<0.001			
Densidad estomática	-0.047	-0.025	1.00	
Prob	0.43	0.67		
Numero domacios	0.30	0.45	0.019	1.00
Prob	<0.0001	<0.0001	0.75	

Cómo se muestra adelante, las frecuencias de Gig y Var no son altas (0.07% y 0.05% respectivamente). Se realizó un análisis de componentes principales sin el concurso de estas dos categorías. Se encontró también que dos componentes principales explicaban la mayor parte de la variabilidad (75.5%), 50% y 24% respectivamente para los componentes principales 1 y 2. Al igual que en el primer análisis la densidad estomática muestra ser una variable independiente que, correlaciona 99% con el componente principal 2.

La densidad estomática se considera por algunos autores como una característica genética cualitativa relacionada con el cariotipo (Franco, 1939; Orozco y Cassalet, 1974). En el presente trabajo se encontró, que los variantes gigantes, mostraron la menor densidad estomática (44.87 estomas/mm²), esto es particularmente importante si se considera que, son las plantas que mostraron la más alta tasa de conductividad estomática en el estrato alto de las mismas en un horario de 8:00 a 10:00 AM (Rosales-Longo, 2001). Se considera por varios autores que esta característica está relacionada con altos niveles de ploidía (Franco, 1939; Orozco y Cassalet, 1974).

Etienne y Bertrand (2001), no reportaron diferencias entre los variantes identificados por estos autores en cuanto al número de estomas por unidad de área en la hoja. Esto se debe en principio a que dichos autores no identificaron al variante tipo gigante entre la población sujeta de su estudio. Ya en años anteriores (Franco, 1939; Orozco y Cassalet, 1974) se ha reportado que esta característica está

inversamente relacionada con los niveles de ploidía, así a menor densidad estomática, se observan mayor número de cromosomas, si bien esto se ha observado entre distintas especies de coffeea; así, individuos tetraploides (tal el café arábigo) tienen menor densidad estomática que aquellos diploides como *C. canephora*. Etienne y Bertrand, (2001), no encontraron por estudio de citometría de flujo ninguna diferencia entre los montos de ADN para las muestras, provenientes de los clones usados para el estudio de variación somaclonal de estos autores

Los resultados del presente trabajo, sugieren que para la categoría Gigante, puede haber una relación entre su baja densidad estomática y su nivel de ploidía.

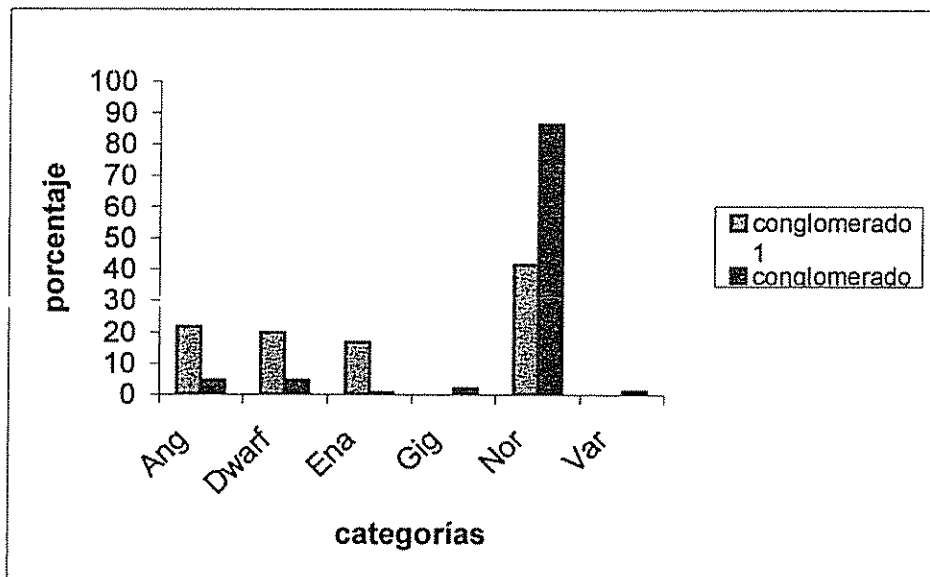


Figura 3.2. Distribución de las categorías en dos Conglomerados.

Con los valores de componentes principales se obtuvieron agrupaciones de las observaciones en dos diferentes conglomerados, luego de aplicar el procedimiento estadístico correspondiente (SAS, Institute, 1989)

En la figura 3.2 se aprecia la distribución de las observaciones, según el tipo de mutación. Los variantes Angustifolia, Dwarf y Enano B, son agrupados en el primer conglomerado, compartiendo la posición con una proporción de plantas normales, sin embargo, las plantas normales son agrupadas en su mayoría en el conglomerado 2, junto con los variantes Variegada y Gigante. En el caso del segundo

conglomerado, es notorio que las variables estudiadas no diferencian entre variegatas, gigantes y normales. Sin embargo, para el caso de las variegatas no es necesario el uso de las variables propuestas en virtud de que su diferenciación es fácil al comparar la coloración de las hojas, ya que las variegatas poseen porciones albinas en sus láminas foliares. Para el caso de los gigantes tampoco es difícil en virtud de que su altura es notable en el campo, según se observa también en su promedio de altura, el cual se muestra en el Cuadro 3.1, así también su densidad estomática fue también particular y diferencial.

En el siguiente Cuadro se especifica las frecuencias de ocurrencia de las categorías de plantas en función de su pertenencia a cada conglomerado.

El número de conglomerados elegido fue de dos, según la prueba de Pseudo "T", (datos no mostrados) (SAS Institute, 1989).

CUADRO 3.3. Agrupamiento de las categorías de variantes según el conglomerado al que pertenecen.

Categoría	Conglomerado 1			Conglomerado 2		
	Frecuencia	Porcentaje	% acumulado	Frecuencia	Porcentaje	% acumulado
Angustifolia	27	21.70	21.60	7	4.70	4.70
Dwarf	25	20	41.60	7	4.70	9.40
Enano B	21	16.8	58.40	1	0.67	10.07
Gigante	-	-	-	3	2.01	12.08
Normales	52	41.60	100	129	86.58	98.66
Variegadas	-	-	-	2	1.34	100

En el Cuadro 3.3 se ve que, los variantes que en promedio poseen las más bajas alturas y diámetros del fuste menores (ver Cuadro 3.1), se agrupan en el conglomerado 1. En tanto que la mayor proporción de plantas normales se agrupa en el conglomerado 2. Los variantes "gigante" y "variegata", se ubican en el conglomerado 2.

Se puede derivar de estos resultados que existen dos grupos bien diferenciados de variantes, aquellos que presentan menos vigor, en función de las variables altura y diámetro de fuste, y aquellos que presentan mayor vigor, en función de las mismas variables. Es importante destacar que esta clara diferenciación es útil en función de características agronómicas y que la posibilidad de poder clasificar bien a un variante está bien relacionado con las variables que caracterizan al vigor.

Para el caso de densidad estomática y número de cloroplastos, según se observa en el Cuadro 3.1, estas dos variables son útiles para diferenciar a los variantes “gigantes” en el caso de densidad estomática y a las “angustifolias” en el caso de la variable Número de domacios en las hojas adultas”.

Para establecer si las diferencias entre conglomerados es tal, que pueda considerarse estadística se realizaron dos tipos de pruebas, la primera una separación de promedios para cada componente principal mediante la aplicación de la prueba de Duncan (Montgomery, 1991) y la segunda, la aplicación de la Función Lineal Discriminante (Hernández, 1988; Gnanadesikan, 1977)

CUADRO 3.4. Discriminación de promedios por componente principal según su ubicación en cada conglomerado

Componente Principal 1			Componente Principal 2		
Promedio	N	Conglomerado	promedio	N	Conglomerado
1.0495 a	149	2	0.04197 a	149	2
-1.2192 b	125	1	-0.05325 a	125	1
R^2 0.64			R^2 0.00223		

Promedios con la misma letra no son diferentes significativamente (P 0.05).

La diferenciación entre conglomerados está bien establecida solo en el componente principal 1 explicado por Altura, Diámetro del Fuste y Número de Domacios; en tanto que el componente principal 2 explicado por la variable densidad estomática, no establece ninguna diferenciación entre conglomerados. Esto es explicado por dos circunstancias: a. La frecuencia de gigantes es baja y b. la variable que explica a este componente es la densidad estomática y que está relacionada solo con los variantes “gigantes”. En consecuencia, puede decirse que la mayor parte de las alocaiones de las observaciones en los conglomerados está definida por las variables Altura de planta, Diámetro del Fuste y Número de Domacios. No obstante, la variable Densidad Estomática sigue estando altamente asociada al tipo de variación “gigante”.

Al aplicar la Función Lineal Discriminante se obtiene el siguiente resultado

CUADRO 3 5. Número de Observaciones y Porcentaje clasificados en cada Conglomerado.

Del conglomerado	1	2	total
1	121 96.80	4 3.20	125 100.00
2	2 1.34	147 98.66	149 100.00
Total	123 44.89	151 55.11	274 100
Probabilidad a priori de clasificación	0.5	0.5	

Del Cuadro anterior se desprende que, en general, la clasificación de las observaciones fue hecha con adecuada precisión. En consecuencia puede afirmarse que las variables empleadas definen con bastante la clasificación de las observaciones en el conglomerado correcto, en función de las categorías de variantes empleadas.

Para determinar la probabilidad de una clasificación errónea con el mismo procedimiento de SAS, SAS DISCRIM (SAS Institute, 1989), se obtuvo las siguientes tasas de error para una clasificación incorrecta de las observaciones realizadas.

CUADRO 3 6. Estimación Del error de clasificación para cada conglomerado

Conglomerados			
	1	2	Total
Tasa de error	0.0320	0.0134	0.023
Tasa de error a priori	0.5	0.5	

Como se mencionó anteriormente, es claro que la clasificación de las observaciones es, en general, adecuada y que en consecuencia las variables empleadas para la definición de los componentes principales son medidas que pueden ser empleadas para la diferenciación entre categorías de variantes

Las pruebas llevadas a cabo en el conjunto inicial de datos, arrojaron resultados que establecen que desde el punto de vista morfológico puede realizarse la caracterización de las plantas variantes, según a

la categoría que pertenezcan. También es importante señalar que estas mismas variables pueden ser usadas para el estudio y determinación de los tipos de variantes, si los variantes Gigante y Variegata son incluidos en los análisis.

A manera de recapitulación, puede entonces afirmarse que en términos de probabilidad, puede deducirse que encontrar un variante estará en función de ciertas características, así, Los tipos "Angustifolia" se observaron en función del diámetro del fuste, la altura del árbol y el número de domacios en las hojas adultas. En tanto que los variantes "Dwarf", se caracterizaron en función de la talla del árbol, y el diámetro del fuste. Los "Enanos b" podrán ser descritos en función de la talla y el diámetro del fuste. Otras características adicionales, que por su escasa variabilidad o tipo de medida no ofrecieron ajuste para la caracterización, pueden sin embargo, ser usadas como fuentes adicionales de discriminación para poder clasificar adecuadamente a los variantes en estudio, tal es el caso de largo y ancho de la hoja y hábito de ramificación.

Los mismos análisis realizados para el total del conjunto de datos fue realizado para cada híbrido por separado así como para cada edad de la suspensión celular (datos no mostrados). Los resultados son en términos generales similares y pueden aceptarse como la tendencia específica de los resultados aquí presentados.

Considerando la baja frecuencia de los variantes Gig y Var, también se realizó un análisis de conglomerados sin la participación de las observaciones correspondientes a estas categorías. Al revisar los datos (Cuadro 3.4), se advierte que ahora la clasificación no resultó tan obvia. En particular la categoría Dwarf no parece responder a un patrón específico de clasificación. Es decir, las variables empleadas para su clasificación no se adecuan para esos fines. El resto de categorías si mostró un patrón más definido para su clasificación.

CUADRO 3.7. Agrupamiento de categorías según el conglomerado al que pertenecen, sin el concurso de los variantes Gigante y Variegata

Categoría	Conglomerado 1			Conglomerado 2		
	Frecuencia	Porcentaje	% acumulado	Frecuencia	Porcentaje	% acumulado
Angustifolia	7	3.89	3.89	27	31.76	31.76
Dwarf	11	6.11	10	21	24.70	56.46
Enano B	5	2.78	12.78	17	20	76.45
Normales	157	87.22	100	20	23.59	100

Al aplicar la función lineal discriminante a los datos del análisis de conglomerados (SAS Institute, 1989), se obtuvo que los grupos no se diferencian claramente. Los errores de asignación se incrementaron. Se deriva entonces que las variables empleadas en el análisis no discriminaron correctamente a los grupos. Como se mencionó antes, el variante Dwarf no se diferencia claramente del resto de categorías en función de las variables Alt, Diam, Ndom y Destom. En consecuencia, debe recurrirse a otras variables como el hábito de ramificación y el largo de la hoja para diferenciar a este mutante en particular. En el Cuadro 3.5 se pueden observar los valores de asignación para cada conglomerado y en el Cuadro 3.6 las tasas de error, las cuales se incrementaron al no incluir en los datos, las observaciones correspondientes a las categorías Gigante y Variegata.

CUADRO 3.8. Número de observaciones y porcentaje de clasificación dentro de los conglomerados

Desde el conglomerado	1	2	
1	128	52	180
	71.11	28.89	100
2	20	65	85
	23.53	76.47	100
Total	148	117	265
	55.85	44.15	100
Probabilidad a priori de clasificación	0.05	0.05	

Se observa que la función lineal discriminante no encontró mayores diferencias entre conglomerados, por lo que su separación no es tan clara como en el caso donde se incluye a las categorías Gigante y Variegata. En términos de importancia práctica esto puede ser particularmente importante si se considera que la identificación por características cuantitativas no es tan clara. Rosales-Longo (2001), encontró además que en un estudio en vivero, la dificultad de la identificación de variantes somaclonales por medidas cuantitativas es difícil, si bien se aclara que en este caso se debe al poco desarrollo en cuanto a la expresión fenotípica de los árboles.

En el Cuadro 3.8. se confirma lo anterior y se observa que las tasas de error para la alocaación se incrementaron. Así, se puede aceptar que las variables discretas como forma de la hoja y hábito de ramificación son variables adicionales que pueden ser empleadas para hacer una identificación más precisa

Cuadro 3.9. Estimación del error de alocaación por conglomerado

	Conglomerado 2	Conglomerado 2	Total
Tasa de error	0.29	0.23	
Errores a priori	0.5	0.5	

Para la estimación de las frecuencias y las probabilidades de ocurrencia, se desarrolló una serie de tablas de frecuencias (SAS Institute, 1989). Para el estudio de frecuencias se estudiaron más tipos de variantes, que si bien no ofrecen altas frecuencias se presentan y en el caso del denominado "Letal", puede estar asociado a variantes como los "angustifolias", "enanos a" o "enanos b".

Luego de realizar continuas evaluaciones de las características más sobresalientes de los variantes y en relación a los resultados ya presentados y discutidos, se realizó un segundo censo en el ensayo de "La Montaña", para determinar en definitiva las frecuencias de ocurrencia de los variantes somaclonales.

Si se eliminan de los análisis las siguientes categorías: Gigante, Variegata, muertas y Letal, una categoría adicional "multieje" se acepta como un problema de manejo agronómico y por tanto se clasifica como normal. Además, se elimina del análisis al testigo empleado (CR 95), así se obtuvieron los resultados presentados en el Cuadro 3.10

Cuadro 3.10. Frecuencias de Ocurrencia para tres categorías de plantas

Categoría	Frecuencia	Porcentaje	Frecuencia acumulada	Porcentaje acumulado
Angustifolia	103	3.26	103	3.26
Dwarf	35	1.11	138	4.37
Enano b	124	3.92	262	8.29
normal	2899	91.71	3161	100

Al observar el Cuadro 3.10, se nota que, el porcentaje de variantes en la población objeto de estudio es de 8.29. Este dato por cuanto se fundamenta en tres categorías de variantes que muestran la más alta frecuencia de ocurrencia y en consecuencia refleja el hecho más relevante de la variación somaclonal en plantas adultas.

Se estudiaron las frecuencias de ocurrencia en función tanto del material genético del que se trataba (clones de híbridos), así como en función de las edades de las suspensiones celulares a partir de las cuales provenían los embriones somáticos, que regeneraron a las plantas sembradas en el ensayo. Hecha esta consideración, se discuten los siguientes resultados.

Cuadro 3.11. frecuencia de ocurrencia de tres categorías en clones de tres híbridos f1 de café

Híbrido	Angustifolia	Dwarf	Enano b	Normal	Total
T5296 x RS					
Valor observado	42	2	39	610	n= 693
Valor esperado	22.58	7.67	27.185	635.56	
Ji-cuadrado	16.699	4.194	5.134	1.028	
% del total	1.33	0.06	1.23	19.30	21.92
% por híbrido	6.06	0.29	5.63	88.02	
% por categoría	40.78	5.71	31.45	21.04	
T8667 x RS					
Valor observado	30	28	45	1221	n=1324
Valor esperado	43.14	14.66	51.93	1214	
Ji-cuadrado	4.00	12.39	0.9268	0.0374	
% del total	0.95	0.89	1.42	38.63	41.89
% por híbrido	2.27	2.11	3.40	92.22	
% por categoría	29.13	80.00	36.29	42.12	
CAT7 X E531					
Valor observado	31	5	40	1068	
Valor esperado	31	12.667	44.87	1049.2	n=1144
Ji-cuadrado	1.056	4.64	0.53	0.3376	
% del total	0.98	0.16	1.27	33.79	36.19
% por híbrido	2.71	0.44	3.50	93.36	
% por categoría	30.10	14.29	32.26	36.84	
TOTAL	103	35	124	2899	N=3161
% del total	3.26	1.11	3.92	91.71	100

Se aplicó una prueba de ji-cuadrada (Steel y Torrie, 1980), para someter a prueba la hipótesis de independencia de las frecuencias de las categorías de plantas con respecto al material genético. El valor de ji-cuadrada fue de 50.72 y su probabilidad fue <0.0001 , con estos resultados se rechaza la hipótesis y se acepta que la frecuencia de ocurrencia de las categorías de plantas es una función del material genético. En este mismo Cuadro se aprecian los valores de Ji-cuadrado para cada una de las celdas. Se observa el aporte de cada celda en el total de Ji-cuadrado. Estos valores indican que los variantes "angustifolia" están más relacionados en su frecuencia con los híbridos 5296 x rs y 8667 x rs. En tanto que la categoría "dwarf", está más relacionado con el híbrido 8667 x rs, ambas relaciones son significativas al 0.05.

La categoría de “normales” no se relaciona en particular con ningún híbrido, asimismo los “enanos b”, que no parece ser función de ningún híbrido en particular. Etienne y Bertránd (2001), encontraron que las frecuencias de ocurrencia de determinados variantes estaba ligada al material genético. Con estos resultados se confirma de otra manera, que los materiales genéticos están ligados a la frecuencia de ocurrencia de determinados tipos de variantes.

Otra prueba de ji-cuadrada fue aplicada a las frecuencias de ocurrencia de las categorías de plantas (datos no mostrados), con respecto a la edad de la suspensión celular, el valor de ji-cuadrada fue de 162.27 y la probabilidad del valor fue <0.0001 . En consecuencia se acepta que también la frecuencia de ocurrencia de las categorías de plantas está en función de la suspensión celular. Estos resultados concuerdan con aquellos que se presentan para los análisis realizados para todas las categorías inicialmente estudiadas. Para el caso de las edades de las suspensiones celulares, la categoría “angustifolia”, está más relacionada con edades de 9 y 12 meses de las suspensiones celulares. La categoría “dwarf” se relacionan con edades de suspensiones celulares de cero y seis meses. La categoría “enanos b”, no muestra un patrón definido y su ocurrencia parece ser aleatoria. Las plantas de la categoría “normal” no muestran una relación específica con respecto a las edades de la suspensión celular. Por tanto puede pensarse que las dependencias entre categorías y edades de suspensión celular, están en función de las frecuencias de ocurrencia de las observaciones que corresponden a los variantes somaclonales.

Los coeficientes de contingencia para cada comparación son:

Material genético vrs. Categorías: 0.1257

Edad de la Suspensión celular vrs. Categorías: 0.2210

Estos valores indican que el suceso de variación somaclonal está más ligado a la edad de la suspensión celular que a la influencia del material genético estudiado.

Adicionalmente se realizaron pruebas de Ji-cuadrado por dos diferentes agrupamientos, a saber: material genético (híbridos f1) y de acuerdo a las edades de proliferación en las suspensiones celulares, estos valores se presentan en el Cuadro 3.15.

Cuadro 3.12. Valores de Ji cuadrado por categorías de Materiales Genéticos de Café y por edad de proliferación de las suspensiones celulares

	Normal	angustifolia	Dwarf	Enano b	Total variación
Ji cuadrado según híbridos (2 gl)	1.447 NS	20.60 **	20.69**	6.83*	15.02 **
Ji cuadrado suspensiones celular (5 gl)	7.60 NS	71.70 **	36.23**	47.13**	86.36 **

NS: No significativo; *: significativo al 0.05 de probabilidad; **: significativo al 0.01 de probabilidad

Se aprecia en el Cuadro 3.15 que los valores de Ji-cuadrado muestran que las frecuencias de ocurrencia de variantes (Angustifolia, Dwarf y Enano B), están ligadas a las categorías estudiadas y que son las que establecen la relación funcional entre las categorías de plantas estudiadas y los agrupamientos según material vegetal o suspensión celular. En tanto que, las plantas normales no tienen valores significativos que indiquen que participan en la relación funcional mencionada.

El total de variación somaclonal es de 8.29 %. En una prueba de Ji-cuadrado (SAS Institute, 1989), se determinó que este valor es significativamente (0.05 de probabilidad) diferente del valor por probabilidad esperado, según las categorías estudiadas de material genético y edad de proliferación de las suspensiones celulares.

4.4. Referencias bibliográficas

- 1 Al-Zahim, M; Newbury, HJ; Lloy-Ford, BV. 1999. Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological análisis. *Plant Cell Reports* 18:473- 477.
- 2 Côte, F; Sandoval, J; Marie, P; Auboiron, E. 1998. Phenotypic variation in micropropagated bananas and plantains. *CORBANA* 23(50): 177-198.
- 3 Etienne, H; Barry-Etienne, D; Vásquez, N; Berthouly, M. 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café: el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. *In* Bertrand, B; Rapidel, B eds. *Desafíos de la Caficultura en Centroamérica*. San José, C.R. IICA, PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR FRANCIA p 457-496
- 4 Etienne, H; Bertrand, B. 2001. Truenes-to-type and agronomic characteristics of *Coffea arabica* trees micropropagated by the embryogenic cell suspension technique. *Tree Physiology* 20:1031-1038.
- 5 Fluminhan, A; De Aguiar-Perecin, MLR. 1998. Embryogenic response and mitotic instability in callus cultures derived from maize inbred lines differing in heterocromatic nov content of chromosomes. *Annals of botany*. 82:569-576
- 6 Fluminhan, A; Kameya, T. 1995. Behaviour of chromosomes in anaphase cells in embryogenic callus cultures of maize. *Theoretical and applied genetics* 92:982-990.
- 7 Franco, CM. 1939. Relation between chromosome number and stomata in coffee. *Botanical Gazette* 100:817-827
- 8 Gnanadesikan, R. 1977. *Methods for statistical data analysis of multivariate observations*. Jhon Wiley & Sons Ney York. 311 p
- 9 Hernández, O. 1988. *Temas de análisis estadístico multivariado*. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 169 p
- 10 ICAFE. 1989. *Manual de recomendaciones para el cultivo del café*. San José, C.R. Instituto del Café de Costa Rica; Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica. 122 p.
- 11 Menéndez-Yuffa, A; Da Silva, R; Ríos, L; De Enrech, NX. 2000. Mitotic aberration in coffee (*Coffea arabica* cv. 'Catimor') leaf explants and their derived embryogenic calli (en línea). *Electronic Journal of Biotechnology*. Consultado 13 nov 2000. 3(2) Disponible en: <http://www.ejb.org/content/vol3/issue2/full/1/index.html>
- 12 Montgomery, D. 1991. *Diseño y Análisis de Experimentos*. Trad. J Delgado. México. Grupo Editorial Iberoamérica. 589 p
- 13 Orozco, FJ; Cassalet, C. 1974. Relación entre las características estomáticas y el número cromosómico de un híbrido interespecífico en café. *Cenicafé*. Abril-Junio:33-50.
- 14 SAS Institute Inc. 1989. *SAS/STAT User's guide*, Release 6 03 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 1028 p

- 15 Scheaffer, RL; Mendenhall, W Ott, L. 1986. Elementos de muestreo. Trad. G Rendón; JR Gómez México. Grupo Editorial Iberoamérica 321 p.
- 16 Steel, RGD; Torrie, JH 1985. Bioestadística: Principios y procedimientos. Mcgraw-Hill. México. 622 p.

4. *Características anatómicas, morfológicas y fisiológica: Función diferencial en la variación somaclonal en clones de híbridos f1 de café, Coffea arabica L.*

4.1. Introducción

Dentro del estudio de la expresión fenotípica de los variantes somaclonales en clones de híbridos de café, la inspección de las estructuras anatómicas es también una forma de establecer diferencias entre variantes somaclonales. El estudio y revisión de estructuras internas y externas de las plantas que sufren de variación, puede ayudar a una comprensión más profunda del fenómeno de la variación somaclonal. Pero más importante aún, puede ayudar a explicar el fenómeno desde una perspectiva microscópica y llevar al mismo tiempo no solo a la comprensión del fenómeno sino también a la interpretación de los sucesos claves internos y poco obvios que pudieran estar involucrados con el fenómeno de la variación somaclonal.

En virtud de que se ha observado que muchos de los variantes no ofrecen producción (Etienne y Bertrand, 2001; Rosales-Longo, 2001), se ha pensado que los procesos fisiológicos de asimilación de carbono, así como los de conductividad estomática, llevan a los variantes a tener problemas en sus procesos fisiológicos que se ven reflejados en su escasa o ninguna producción. Así pues se evaluó el comportamiento de los variantes somaclonales en función de su actividad fisiológica.

El objetivo de este trabajo fue buscar características diferenciales anatómicas y morfológicas en el nivel microscópico. Así mismo se buscó determinar si la variación somaclonal en sus expresiones fenotípicas provoca disturbios en la asimilación neta de CO₂ y en la conductividad estomática.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Localización

Los trabajos de microscopía de luz se realizaron en el laboratorio de histología de la unidad de Biotecnología del CATIE. Los trabajos de microscopía electrónica se llevaron a cabo en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica en San José, Costa Rica.

Las labores sobre el estudio de las variables fisiológicas se realizaron en la finca "La Montaña", en el ensayo de variantes somaclonales. La finca "La Montaña" se ubica dentro de las instalaciones del CATIE. El CATIE se ubica en la jurisdicción del Cantón Turrialba, del Distrito de Cartago, Costa Rica, C.A., a una altitud de 602 msnm. Latitud 9° 53' norte. Longitud: 83° 38' Oeste. La precipitación promedio es de 220 mm mensuales. Temperatura promedio mensual de 21.8° C y una humedad relativa promedio mensual de 88.1%.

4.2.2. Material Vegetal

Se utilizaron clones de Híbridos F1 de café. Estos híbridos han sido seleccionados dentro del proceso de regeneración por embriogénesis somática debido a su alta frecuencia de regeneración (Etienne et al. 1999). Para microscopía de luz fueron seleccionadas 19 muestras de 3 diferentes variantes, a saber: "Angustifolia", "Dwarf" y "Enano b" los cuales se compararon con muestras de plantas tipificadas como "Normales". Estos clones fueron regenerados de suspensiones celulares embriogénicas según la metodología descrita por Etienne y Bertrand (2001).

Para microscopía electrónica se emplearon 8 muestras de los mismos tipos de variantes que fueron estudiados para microscopía de luz, más una muestra del mutante denominado "Variegada".

Para el estudio de las variables fisiológicas se incluyeron más tipos de variantes: "Gigantes", "Multieje" y "Bulatas". Las plantas fueron seleccionadas al azar en el ensayo, buscando contar con cuatro repeticiones por variante, excepto en los casos de "Gigante" y "Variegadas" para los cuales se definieron dos repeticiones en virtud de su baja frecuencia de ocurrencia. Las plantas seleccionadas se obtuvieron de una población de 277 plantas utilizadas para un estudio sobre variación fenotípica de los cafetos con respecto a la variación somaclonal (Rosales, 2001).

4.2.3. Estudio de las Variables Fisiológicas

Para el estudio se analizaron básicamente dos variables,

- Conductividad Estomática, medida en $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Taiz y Zeiger, 1998).
- Asimilación Neta de CO_2 , medición de la tasa fotosintética en $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (Taiz y Zeiger, 1998).

Se estudiaron ambas variables en cuatro distintas condiciones: estrato alto, medición en horario de 8:00 a 10:00 horas y en horario de 11:00 a 13:00. Los mismos horarios fueron aplicados para las lecturas en el estrato bajo. El estrato alto corresponde a aquella zona que cubren los primeros 4 nudos contados de arriba hacia abajo en la planta y corresponde a la zona del árbol que no produce. El estrato bajo correspondió a lecturas hechas entre los 8 y 10 nudos contados de arriba hacia abajo, esta zona es la zona productiva del árbol. Donde no existía la posibilidad de la estratificación según los criterios impuestos, se dividió a la planta en dos segmentos de manera más o menos arbitraria, a fin de poder medir dos estratos. Se emplearon dos dispositivos para las mediciones: El analizador de Carbono (ADC BioScientific Lmt.) y el Porómetro (modelo DELTA-T, AP4).

4.2.4. Estudios Histológicos y Microscopía Electrónica

Los estudios de Histología, de cortes transversales, fueron realizados en muestras de hojas de los variantes más frecuentes, a saber: *Angustifolia*, *Dwarf* y *Enano b*, mediante la técnica de tinción por Shift-Naphtol (CIRAD, 1989). Asimismo fueron evaluadas diferencias morfológicas microscópicas en microscopio electrónico, mediante técnicas convencionales de procesamiento de muestras para Microscopía Electrónica de Barrido (Murphy y Roomans, 1984).

4.2.5. Análisis de la Información

Para los estudios de las variables fisiológicas, se realizó un estudio individual de variables para evaluar su consistencia (Proc Univariate) (SAS Institute, 1989). Posteriormente se llevó a cabo Análisis de Variación (Montgomery, 1991) para cada una de las dos variables, donde se empleó como variable de clase, los agrupamientos por variantes. Los análisis fueron realizados según los procedimientos de SAS - Statistical Analysis System- PROC GLM (SAS Institute, 1989).

4.3. Resultados y discusión

4.3.1. Variables Fisiológicas

Cuadro 4.1. Correlación entre variables fisiológicas en variantes somaclonales

R ² Probabilidad N: observaciones	Conductividad estomática	Tasa fotosintética	Radiación fotosintéticamente activa	Tempertatura de la hoja
2204	1			
	0.33 <0.0001	1		
	-0.28 <0.0001	0.15 <0.0001	1	
	-0.60 <0.0001	-0.025 0.23	0.56 <0.0001	1

Cuadro 4.1, se muestran resultados de cuatro variables medidas estas presentaron las más altas correlaciones. Si bien fue posible encontrar otras correlaciones con valores altos, éstas relaciones resultaron difíciles de explicar o demasiado obvias que no tienen una aplicación práctica, como la que existe entre el CO₂ analizado y el CO₂ de referencia (r^2 0.96, prob <0.0001), (datos no mostrados).

También resulta claro que cuando las hojas alcanzan temperaturas altas (hasta 37 C°), otras variables como la conductividad estomática son inversamente proporcionales, en este caso con un 0.60 de correlación. Es notable, sin embargo, el hecho de que la Radiación Fotosintéticamente Activa (RAFA), no presenta influencia aparente en las variables de tasa de fotosíntesis y conductividad estomática. Se sabe que a ciertos niveles de RAFA, los niveles de fijación de CO₂ aumentan, hasta que se alcanzan ciertos valores de excesiva conductividad estomática, según la temperatura de la hoja. Esta circunstancia propicia la pérdida innecesaria de agua a la planta, es cuando se disminuye la conductividad y en consecuencia la tasa fotosintética (Taiz y Zeiger, 1998).

En el presente caso se observa tan solo una relación mediana entre la tasa de fijación de CO₂ y la conductividad estomática. A pesar de la baja correlación presentada por las dos variables mencionadas, esta parece ser suficiente para indicar que a mayor conductividad estomática mayor asimilación de carbono. Es claro que las complejas relaciones fisiológicas, no dejan mucho espacio para establecer relaciones directas entre solo dos variables.

Las dos variables que más interesan en virtud de su consistencia son entonces: Tasa Fotosintética (o tasa de asimilación neta de CO₂) y Conductividad Estomática. Luego de varios análisis, se determinó que no existen diferencias significativas entre los diferentes variantes estudiados con respecto a las variables mencionadas. Se encontró diferencia únicamente en el análisis realizado para el estrato alto de la planta en el horario de 8 a 10 de la mañana.

CUADRO 4.2. Promedios de Tasa fotosintética y Conductividad Estomática para variantes somaclonales en el estrato alto y en el horario de 8:00 a 10 :00 AM.

Categoría	Conductividad Estomática mmol m ⁻² s ⁻¹		Tasa Fotosintética μmol m ⁻² s ⁻¹	
Gigante	0.380	a	0.86	a
Angustifolia	0.204	b	2.63	a
Multieje	0.197	b	2.99	a
Normal	0.178	b	2.45	a
Enano b	0.177	b	1.94	a
Bulata	0.177	b	1.83	a
Dwarf	0.154	b	2.76	a
Variegada	0.085	b	1.68	a
	CV 50.01%		CV 91.70	
	R ² 0.36		R ² 0.05	

Promedios con la misma letra no son diferentes significativamente, Duncan (P 0.05)

Se advierte en el Cuadro 4.2 que las diferencias entre variantes está radicada en la mayor conductividad estomática que presenta el variante "Gigante", con respecto al resto de variantes. Puede sugerirse que la variable conductividad estomática, en valores altos, puede estar relacionada con una menor tasa fotosintética. Lo anterior si se considera que, la temperatura de la hoja no es elevada. Rosales (2001), indica que la densidad estomática de este categoría es significativamente menor en

comparación con plantas normales. Esto debe estar relacionado con una baja pérdida de agua en horas críticas, pero suficiente para asimilar el CO₂ necesario.

En términos generales las variables fisiológicas por su alta relación con las variables climáticas se manifiestan erráticas. En términos genéticos la condición cuantitativa de las características fisiológicas (Allard, 1980), hacen que la variabilidad en general dependa de muchos más factores que solo la variación somaclonal, en consecuencia su comportamiento puede resultar aleatorio

No obstante lo anterior es importante hacer notar que se ha diferenciado bien a la categoría Gigante del resto de categorías en función de las variables fisiológicas estudiadas. También es importante señalar, una vez más, que en términos fisiológicos y generales, los variantes no mostraron un patrón específico de comportamiento.

4.3.2. Estudio de los cortes histológicos y Microscopía Electrónica.

En la figura 4.1. se muestran las fotografías de cortes transversales de la lámina foliar mostrando en su conjunto dos diferentes secciones de la hoja, a saber: una sección de la lámina foliar bajo el objetivo 40X donde se aprecian los detalles de la epidermis abaxial, la cual en general se muestra compuesta por células pequeñas rectangulares uniestratificadas. Se observan además estomas con cavidades subestomáticas grandes y un mesófilo esponjoso con espacios aéreos grandes. En la fotografía de la derecha puede apreciarse una vista panorámica, donde además del detalle antes mencionado puede verse la epidermis adaxial uniseriada compuesta por células grandes y un mesófilo en empalizada generalmente uniestratificado o biestratificado.

En términos generales todos los cortes exhiben similitud, por lo que no parece existir razón para pensar que exista una diferencia interna sustancial entre variantes. Todas las fotografías corresponden a cortes transversales de la lámina foliar. Se creyó que por las diferencias morfológicas externas observadas en campo (Rosales-Longo, 2001), los variantes somaclonales presentaban diferencias internas, sobre todo considerando que, en algunos casos las variaciones en las hojas son fuertes, como es el caso de las angustifolias y los variantes Dwarf.

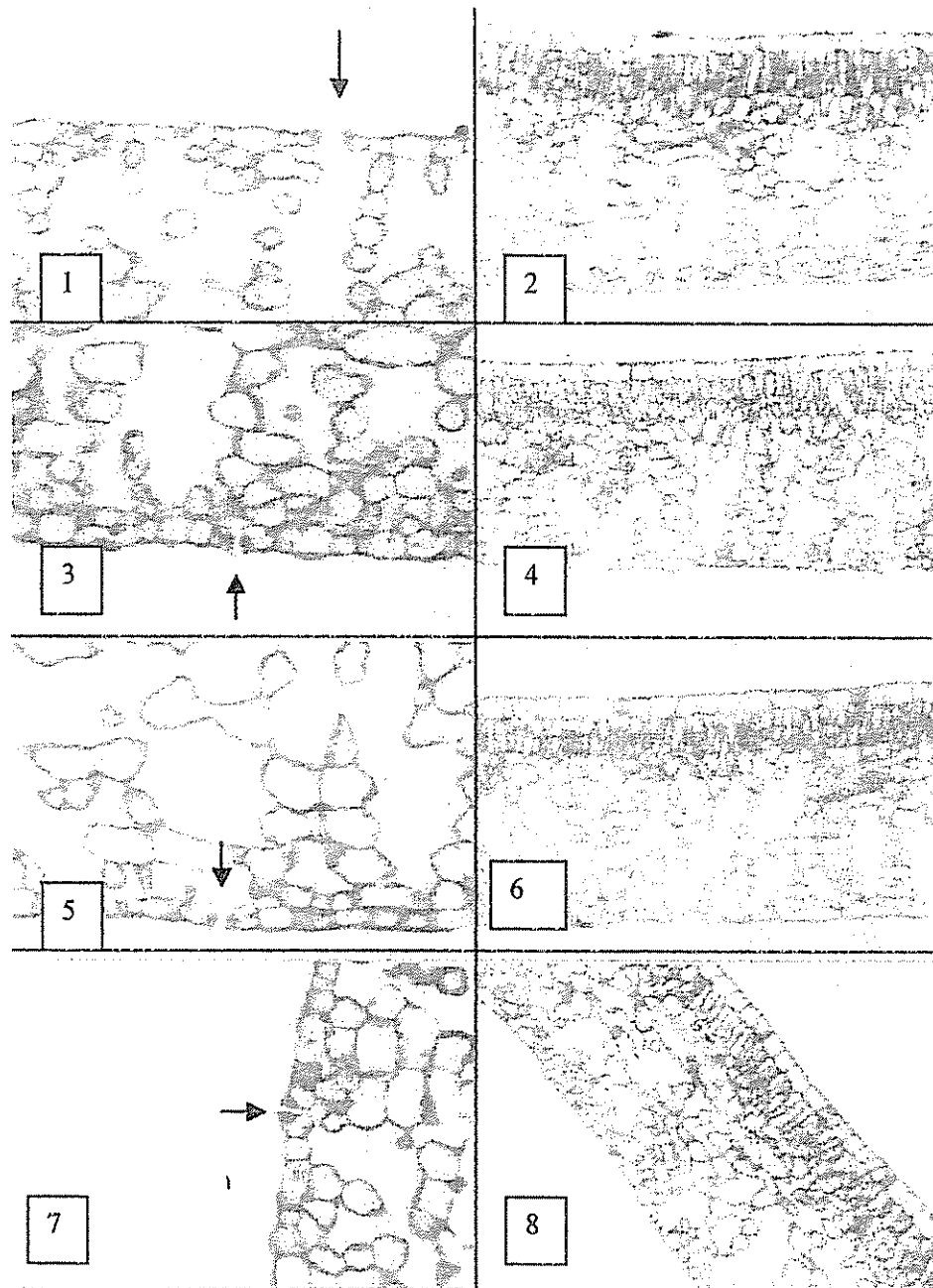


Figura 4.1 Cortes transversales de la lámina foliar de 3 diferentes tipos de variantes somaclonales 1,3,5,7, detalle del tamaño y la disposición de los estomas en Angustifolia, Enano a, Enano b y planta normal, respectivamente. Fotos 2,4,6,8, Disposición del mesófilo en Angustifolia, Enano a, Enano b y planta normal, respectivamente

Microscopía electrónica de barrido

En la figura 4.2. se presentan las fotografías de los mutantes examinados en la región del dominio de los domacios. En este caso, se encontró diferencias muy marcadas en cuanto a la forma y tamaño de los domacios.

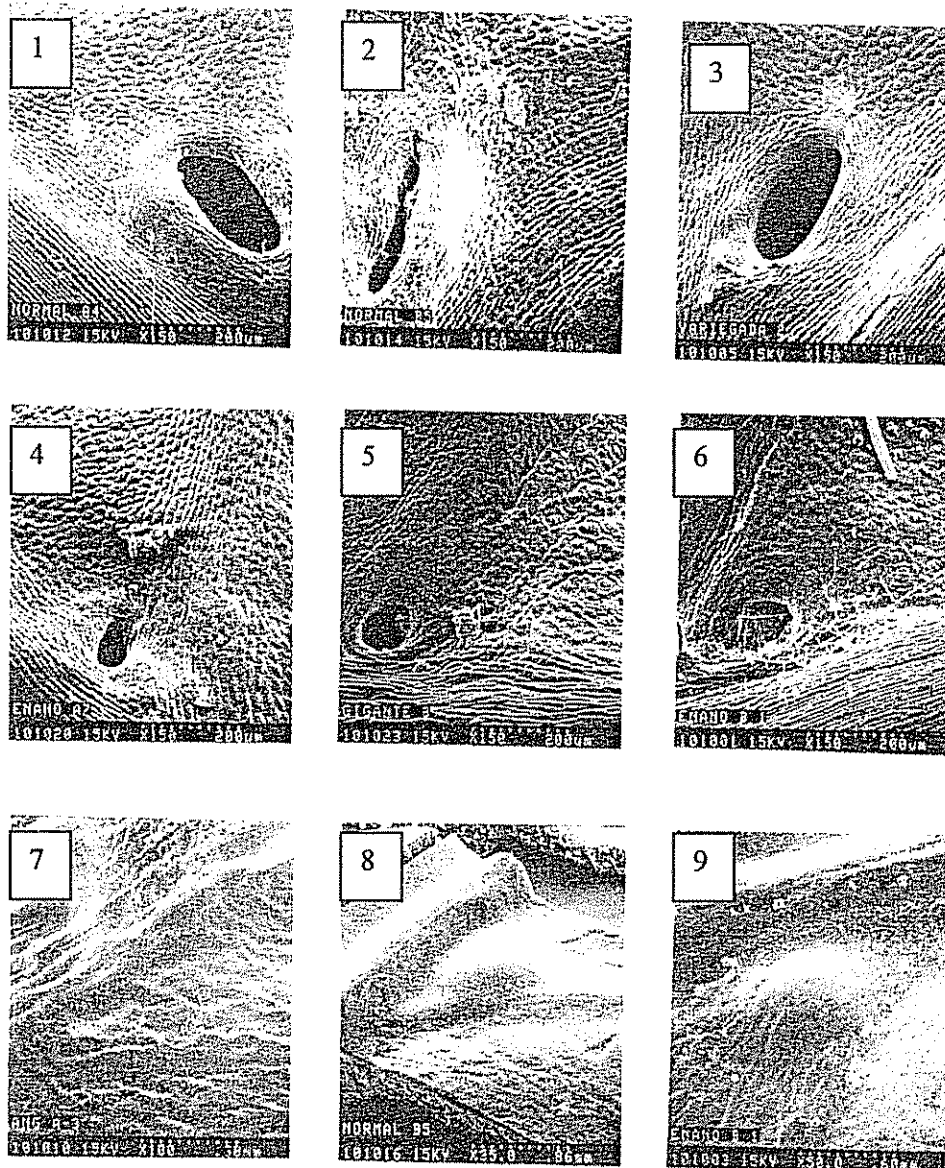


Figura 4.2. Disposición y tamaño del domacio en 5 diferentes mutantes, 3,4,5,6,7 1 y 2 plantas normales 8 y 9, vista desde la sección adaxial de la hoja mostrando la protuberancia característica.

Es distinguible en la figura 4.2. que la forma del domacio varía en función del tipo de muestra ya que para los variantes “dwarf” y “enano b”, se encuentran domacios pequeños y redondeados, lo cual, en general, parece aplicarse mejor al “Dwarf” Similarmente ocurre con el domacio del variante tipo Gigante.

Si bien no es posible realizar muchas observaciones, en virtud de la exigencia de la tecnología y lo costoso de la técnica, las muestras examinadas muestran un patrón claro diferencial entre variantes. Los domacios en plantas normales se presentan con un tamaño mucho más grande y la forma particular de éste es ovalado. La muestra del variante variegado parece no diferir en nada con aquellos domacios examinados en plantas normales.

Por otro lado, se observa que para los domacios en los variantes Dwarf, Enano b, y Gigante éstos además de ser pequeños, como ya se mencionó, tienen una disposición redondeada.

Un caso particular con respecto a la observación de los domacios, es el tipo Angustifolia. En el promedio posee el menor número de domacios (Rosales, 2001) y en muchos casos éstos están completamente ausentes, y es lo que se observa en la fotografía 7 de la figura 4.2. Esta es una característica diferencial específica para el variante Angustifolia. Adicionalmente puede observarse que la epidermis de la nervadura central es irregular y característica. Este variante parece ser la expresión más severa de las aberraciones identificadas hasta el momento.

En la figura 4.3. se observan los acercamientos realizados sobre la sección abaxial de la hoja con fin de establecer si las diferencias entre muestras pueden estar relacionadas con la variación somaclonal. Como se aprecia en la figura, el caso más drástico de aberración lo presentan los tipo “angustifolia”.

La textura superficial de la hoja es también irregular. Se esperaba que con algún grado de probabilidad se encontraran estomas en la superficie adaxial de la lámina foliar. Sin embargo, se comprobó que no hay presencia de estomas en la superficie adaxial.

Los análisis al Microscopio Electrónico mostraron que la categoría Angustifolia es el que presenta mayor diferencias externas. Se observa una densidad estomática muy alta, estomas más grande y células subsidiarias de mayor tamaño que las que se observan en las otras categorías. La disposición de estas células dan una apariencia “corrugada” a la superficie foliar de la categoría Angustifolia.

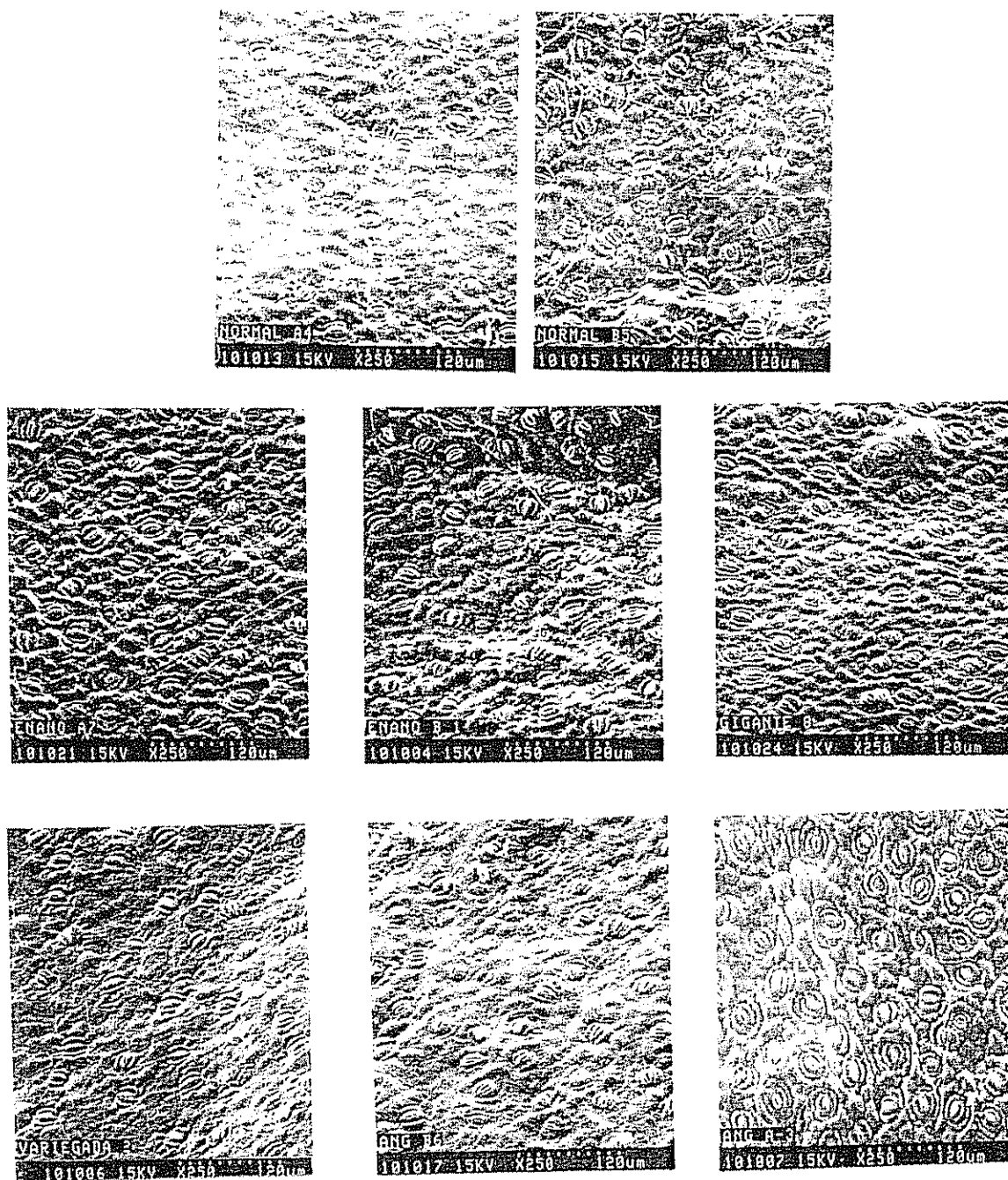


Figura 4.3. Disposición de los estomas en la superficie abaxial de las hojas de café

4.4. Referencias Bibliográficas

1. CIRAD. 1989 Manuel pratique d'histologie végétale. Montpellier. CIRAD. 61 p.
2. Etienne, H; Barry-Etienne, D; Vásquez, N; Berthouly, M. 1999 Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café: el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. In Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la Caficultura en Centroamérica. San José, C.R. IICA, PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR FRANCIA. p 457-496
3. Murphy, JA; Roomans, GM. Preparation of biological specimens for scanning electron microscopy. Scanning Electron Microscopy, Inc. USA. 344 p.
4. Montgomery, D. 1991 Diseño y Análisis de Experimentos. Trad. J Delgado. México. Grupo Editorial Iberoamérica. 589 p.
5. Rosales-Longo, FU. 2001. Variación fenotípica relacionada con la variación somaclonal en clones de híbridos de café *Coffea arabica* L. regenerados por embriogénesis somática. In Estudio de la variación somaclonal en clones de híbridos de café regenerados por embriogénesis somática. Tesis Magister Scientiae. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
6. SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT User's guide, Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
7. Taiz, L; Zeiger, E. 1998. Plant physiology. 2 ed. USA. Sinauer Associates, Inc., Publishers. 792 p.

5. *Evaluación fenotípica y molecular de la variación somaclonal en clones de híbridos de café en la fase de vivero*

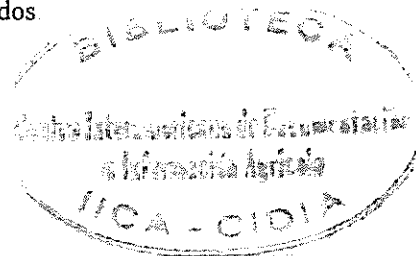
5.1. Introducción

La producción comercial de plantas de café en vivero, exige en el caso de la micropropagación una dinámica tal que permita la producción de plantas en cantidades suficientes en el momento oportuno. Por supuesto, la calidad del material es de extrema importancia. En el caso de la embriogénesis somática, se ha logrado desarrollar en el CATIE protocolos que permiten la producción masal de plantas de café (Etienne, 1999).

Dentro del proceso general de producción, el control de calidad es una fase importante, que debe incluir el control de la contaminación, evaluar el nivel de conformidad de lotes de plantas propagadas, asegurar evitar las confusiones o mezclas de material con el objetivo asegurar un nivel bajo de variantes somaclonales, el manejo agronómico adecuado del material, de manera que, se asegure la calidad del mismo en el laboratorio. Además el manejo de las plantas en vivero es también de enorme importancia ya que es parte fundamental del éxito en la obtención de plantas de buena calidad. Como una condición especial también debe considerarse que la variación somaclonal debe evitarse en todas las partes del proceso, desde el cuidado con el uso de reguladores crecimiento, hasta la detección de variantes previo al despacho de las plantas para su siembra definitiva. Etienne (1999), indica que para que la producción masas por embriogénesis somática ocurra, deben cumplirse al menos cuatro condiciones:

- a) Productividad elevada con costos de producción baja.
- b) Propagación rutinaria en todos los híbridos seleccionados por los mejoradores
- c) Producción continua de vitroplantas en el laboratorio con un esquema escalonado de producción para evitar congestiones
- d) Evitar la aparición de variantes somaclonales

En este documento se tratará el tema específico de los variantes somaclonales. Una de las formas más efectivas para establecer la aparición de variantes somaclonales debería ser la inspección de los mismos por medio de los marcadores de ADN, sin embargo resultan en muchas ocasiones caros o inaccesibles. La inspección de las plantas para establecer la aparición de variantes somaclonales en función de su expresión fenotípica es otra forma de establecer su aparición y frecuencia. Los propósitos de este trabajo fueron, establecer las frecuencias de ocurrencia de los variantes somaclonales en función de su expresión fenotípica y su dependencia con los materiales genéticos evaluados.



Se evaluó por medio de marcadores de ADN (AFLP) (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997) muestras de una población que exhibió un tipo de posible mutación llamada en principio Coloración del brote, en virtud de exhibir hasta un 30% de individuos con el color del brote verde, cuando debieron tener brote bronceado en virtud de la dominancia del carácter. En este caso la aplicación de los marcadores se realizó para establecer la naturaleza de los patrones de ADN, para determinar si las plantas en cuestión se trataban o no de variaciones.

Como ya se mencionó el producto debe ser cuidado, de tal suerte que se pueda garantizar la conformidad genética. Si bien es cierto que mediante la inspección de plantas por su expresión fenotípica no puede garantizarse del todo la conformidad genética del material, también es cierto que es la forma más rápida y menos costosa de evaluar la calidad del producto. En todo caso es en las expresiones fenotípicas donde se notarán los efectos más o menos importantes de la variación somaclonal.

“El objetivo inherente de la clonación de germoplasma élite, es la producción en masa de copias exactas, en un período de tiempo tan corto como sea posible. La variación somaclonal, en consecuencia, no es considerada deseable para este tipo de esfuerzos (Finer, 1994)”.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Material vegetal

Para La evaluación fenotípica se realizó el trabajo con clones de los híbridos siguientes:

(L9 A22) Caturra7*anfilo

(L4 A5) T5296*ET25

(L4 A20) T8667*RS

(L3 A7) Caturra X E416

(L3 A15) Caturra X E416

(L11 A26) Caturra7*ET41

(L10 A25) Catuai 10*RS

El material fue propagado a partir de suspensiones celulares embriogénicas, según la siguientes condiciones: Primera fase: Esterilización superficial de los explantes, obtenidos de hojas juveniles. Cultivo de los explantes por un mes en medio sólido con un contenido de 2.26 μM de 2,4-D (Ácido 2,4 diclorofenoxiacético), 4.92 μM de IBA (Ácido Indol 3 Butírico) y 9.84 μM de iP (Isopenteniladenina). Los cultivos son transferidos por 6 meses más a otro medio sólido con contenidos de 2,4-d de 4.52 μM y 17.76 μM de BAP (Bencilaminopurina). Un callo embriogénico es obtenido de los explantes. En la Segunda Fase, el tejido embriogénico es ubicado en medio líquido con 4.52 μM de 2,4-D y 4.65 μM de Cinetina hasta producir una suspensión celular de agregados embriogénicos. Se realizaron ciclos de proliferación de un mes, lo cuales variaron así: 0, 3, 6, 9 y 12 meses. Tercera fase: Los agregados celulares embriogénicos son situado en biorreactores (RITA®, CIRAD, Francia), en un medio de regeneración con 17.76 μM de BAP. Las plántulas fueron obtenidas, luego de 2 meses de subcultivo en los biorreactores y seguidamente plantadas en campo definitivo.

Para el estudio con AFLP se utilizaron muestras de ADN de los siguientes materiales

CR95 X ET6 (L8 A22) brotes bronceados (muestra 1)

CR95 X ET6 (L8 A22) brotes verdes (muestra 2)

CR95 X ET6 (L8 A22) brotes verdes (muestra 3)

CR 95

ET 6

CATURRA

T 5296-5

T 5175

Se aplicó la metodología de AFLP para determinar patrones de ADN a fin de determinar la naturaleza genética de las plantas con variación en la coloración del brote. El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la unidad de Biotecnología del CATIE. La metodología del análisis incluyó en primer lugar la toma de muestras de hojas en estado juvenil. Luego se realizaron extracciones de ADN con el método de maceración en un buffer con base en azufre. Se realizó purificación de ADN y posteriormente la aplicación de una primera digestión y ligación para establecer los sitios de imprimación estas muestras fueron sujetas a amplificación en termociclador.

Una segunda ligación fue realizada y una segunda amplificación para hacer dos pasos de selección de los fragmentos de ADN que puedan ser estudiados. Una descripción detallada sobre la aplicación de la técnica se encuentra en Vos et al (1995) y en Caetano-Anollés y Gresshoff, (1997). Los procedimientos de electroforesis fueron realizados en geles de poliacrilamida.

5.2.2. Técnica de muestreo

En la evaluación fenotípica, se utilizó la técnica de *Muestreo Sistemático* Donde se aplicó la siguiente ecuación para la determinación del tamaño de la muestra

$$n = \frac{N\sigma^2}{(N-1)D + \sigma^2}$$

Para el cálculo de la desviación estándar (σ), se realizó un censo en un lote de 150 plantas con respecto a la variable altura de la planta, medida en cm, a fin de poder aplicar el valor en la ecuación arriba presentada

La estrategia de muestreo fue seleccionar al azar entre las dos primeras hileras de cada lote de plantas y luego en forma aleatoria se seleccionaron 6 plantas por hilera para tomar las medidas y hacer luego las estimaciones de la frecuencia de ocurrencia de variación para la población.

5.2.3. Variables medidas

- Altura en cm (alt).
- Diámetro del fuste en mm (diam)
- Forma de la hoja. Variable categórica (fh)
- Número de domacios (dom).
- Largo de la hoja en cm (lho)
- Ancho de la hoja en cm (aho)
- Color del brote (br)

5.2.4. Análisis de la información

Se realizó un análisis inicial por cada variable a fin de observar su consistencia y tendencias generales, mediante el Procedimiento Means de SAS (Statistical Analysis System) (SAS Institute, 1989). Luego se realizó un análisis de componentes principales a fin de reducir el número de variables y maximizar la variancia. Posteriormente se realizó un análisis de conglomerados para agrupar y clasificar. Seguidamente un análisis para la Función Lineal Discriminante, a fin de establecer el grado de alocaación correcta de las observaciones en los conglomerados correspondientes, todos los análisis fueron realizados mediante el uso de los procedimientos de SAS (SAS Institute, 1989). Finalmente se aplicó un análisis de frecuencia y cálculos de Ji cuadrado para establecer los niveles de dependencia entre variantes y el material vegetal genético empleado.

5.2.5. Evaluación de los patrones de ADN por AFLP

Se utilizó la técnica de AFLP (Amplificación de fragmentos de longitud polimórfica) (Caetano-Anollés y Gresshoff, 1997). Aquí se utilizó una serie de imprimadores ("primers") relacionados con sitios de restricción específicos y complementos de los sitios de restricción para la imprimación. Los imprimadores correspondieron a los sitios de restricción siguientes, según la enzima de restricción:

La técnica de AFLP es un poderoso marcador de ADN. Se fundamenta en la amplificación selectiva de fragmentos de ADN en los cuales la extensión de los imprimadores ("primers") coinciden con los nucleótidos que flanquean los sitios de restricción. El número de fragmentos por amplificar pueden ser seleccionados por la selección del número de bases selectivas en los imprimadores AFLP. Esta técnica brinda una adecuada cantidad de fragmentos de ADN de naturaleza polimórfica, por lo que su precisión es alta en comparación con técnicas de amplificación por imprimación aleatoria. Una amplia descripción de la técnica así como la discusión de sus ventajas y desventajas es proporcionada por Caetano-Anollés y Gresshoff, (1997). Luego de analizar los patrones de bandas en geles de poliacrilamida, se obtuvo el siguiente patrón de bandas:

Cuadro 5.1. Combinaciones de imprimadores según la enzima de restricción, para la amplificación de segmentos polimórficos de ADN.

Enzima de restricción	
EcoR1	Mse
CAG	ACA
CAG	ACC
CAG	ACT
CAG	ACT
CAG	AGC
CAG	AGC
CAG	AGC
CAG	AGC
CAG	AGC
CAG	AGC
CAG	AGC
CAG	AGC
CAG	AGG

5.3. Resultados y discusión

5.3.1. Evaluación Fenotípica

En el estudio sobre frecuencias realizado en los invernaderos para café de la finca “Cabiria”, se identificaron tres diferentes variantes en función de sus características de expresión fenotípicas:

Angustifolias (Ang), Enanos (Ena) y Variegadas (Va). Las plantas “Va” presentaron una frecuencia de ocurrencia baja, 2 de una muestra de 657 plantas. Para la ejecución de los análisis correspondientes y en la discusión de resultados, (excepto donde se hace constar lo contrario), el variante Va no fue considerado.

Cuadro 5.2. Frecuencia de ocurrencia de Variación somaclonal en clones de 7 híbridos de café

Híbrido Frecuencia porcentaje	Variante			Total
	Ang	Ena	Normal	
L10A25	10 1.53	7 1.07	90 13.74	107 16.34
L11A26	4 0.61	3 0.46	29 4.43	36 5.50
L3A15	6 0.92	2 0.31	35 5.34	43 6.56
L3A7	2 0.31	1 0.15	26 3.97	29 4.43
L4A20	13 1.98	1 0.15	60 9.16	74 11.30
L4A5	33 5.04	6 0.92	165 25.19	204 31.15
L9A22	14 2.14	10 1.53	138 21.07	162 24.73
TOTAL	82 12.52	30 4.58	543 82.90	655 100

En términos de frecuencia, el variante angustifolia, resulta ser el que tiene los más altos valores. En general, para el variante Ena, la dificultad para su identificación reside en la variabilidad general que ofrece la variable altura. Ya que el conjunto de plantas estudiadas presentan un rango de alturas alto (2.35 cm a 41.10cm) y en consecuencia su desviación también es alta (promedio 21.31; std 9.50) así también se aprecia con la variable diámetro del tallo (diam). En el campo, para su identificación, los enanos, son caracterizados por la forma de la hoja y la altura, pero en vivero, las plantas no han alcanzado un desarrollo suficiente para realizar una mejor discriminación, en consecuencia, son pocos los variantes de este tipo que pueden ser identificados. A esta circunstancia hay que agregar que, las poblaciones de plántulas regeneradas por embriogénesis somática no tienen un desarrollo uniforme, esto puede estar relacionado con el fenómeno de maduración diferencial de los embriones. En el cultivo de células en frascos Earlenmayer, el contacto permanente con el líquido y la agitación constante de los embriones, limitan el establecimiento de polarización de los embriones (Etienne et al. 1999; Flores, 1998; Franklin y Dixon, 1994) y en consecuencia su maduración. Por otro lado, resultados de Barry-Etienne (2001) muestran que la heterogeneidad morfológica de la población de embriones dentro del bioreactor que se transmite fuertemente en una heterogeneidad en el crecimiento en vivero.

Para determinar si la frecuencia de ocurrencia de variantes somaclonales puede ser asociada con el material genético, se aplicó una prueba de ji-cuadrado al conjunto de datos del Cuadro 5.1. que prueba la hipótesis de que No existe dependencia de la variación somaclonal con respecto a los materiales genéticos (clones de híbridos F1 de café).

Los resultados de la prueba (Valor de Ji-cuadrado: 13.66; Probabilidad: 0.32) indican que la hipótesis planteada se acepta. Es decir, no hay evidencia que indique que la frecuencia de ocurrencia de variación somaclonal en vivero sea una función del material genético. Esto puede explicarse en el sentido de la extrema dificultad de identificar variantes en vivero. La variabilidad en el desarrollo de las plantas regeneradas por embriogénesis somática, ofrece la dificultad de una identificación eficaz mediante el uso de las medidas de expresión fenotípica usadas en este trabajo.

Debe destacarse el hecho de que son muy pocas las expresiones fenotípicas que pueden medirse en las fases de bandeja de aclimatación de embriones y vivero. No obstante, Rosales, (2001) demostró que la variación somaclonal, en términos de frecuencia, en el campo definitivo (Rosales-Longo, 2001) sí tiene dependencia directa con el material genético del que se trate. Sin embargo es importante resaltar que el trabajo de Rosales, (2001) fue realizado en un ensayo de plantas adultas, donde se midieron más variables y las plantas han alcanzado la totalidad de su expresión fenotípica.

Luego de un análisis por el procedimiento UNIVARIATE (SAS Institute, 1989) (datos no mostrados), se eligieron para los análisis subsiguientes las variables cuantitativas que se presentan en el Cuadro 5.3., el cual muestra los resultados de pruebas de promedios (SAS Institute, 1989; Montgomery, 1991).

CUADRO 5.3 Valores promedio de las variables medidas para la evaluación de la variación somaclonal en la etapa de vivero.

Variante	Promedios				
	Largo de la hoja (lho)	Ancho de la hoja (aho)	Altura de la planta (alt)	Diámetro del tronco (diam)	Numero de domacios (dom)
Ang	12.081 b	4.56 b	12.79 b	2.33 b	5.13 b
Ena	6.85 c	2.96 c	8.19 c	1.95 b	3.67 c
Normal	16.10 a	6.44 a	23.32 a	3.81 a	9.32 a
CV	22.02	21.77	39.33	37.64	31.96

Promedios con la misma letra no son estadísticamente diferentes, P 0.05

De acuerdo con estos resultados, las variables relacionadas con las dimensiones de la hoja (lho y aho), son las que presentan el más bajo coeficiente de variabilidad (CV). En consecuencia pueden ser las más discriminantes entre variantes. Es evidente que hay diferencia entre plantas, esto lo muestran todas las variables estudiadas, lo que indica que es posible la identificación de variantes en función de estas variables. Sin embargo, como se comentó anteriormente, la alta variabilidad que presentan las plantas en función de las variables alt y diam no brinda un adecuado criterio de selección por estas variables. En todo caso, la clasificación de las plantas por las variables relacionadas con el vigor (alt diam) puede ser un paso inicial hacia la identificación de plantas variantes. Si bien existe la problemática de la identificación, es notorio que entre las plantas identificadas correctamente, se hace una clara diferenciación de los valores de sus promedios, por lo que se puede asegurar, de acuerdo a esta evidencia, que los variantes, en general están asociados con una reducción general de su vigor, por cuanto sus promedios de alt, diam, lho y aho, son estadísticamente inferiores a los de las plantas normales.

En cuanto a la variable dom, también hace una diferenciación muy marcada entre los tres tipos. Si bien los enanos en campo poseen domacios (Rosales-Longo, 2001 a; Rosales-Longo, 2001 b), en la etapa de vivero, en virtud del escaso desarrollo de las plantas, éstos en la mayoría de ocasiones no han sido formados, de ahí que su ausencia establece una marcada diferencia con el resto de categorías. Para el

caso de los variantes ang, la ausencia de domacios o su presencia en baja proporción, es una característica peculiar de éste.

Cuadro 5.4 Correlación entre las 5 variables estudiadas

variable	lho	aho	alt	diam	Dom
Lho	1				
Aho	0.95	1			
Alt	0.79	0.81	1		
Diam	0.64	0.68	0.87	1	
Dom	0.69	0.68	0.66	0.62	1

En general existe alta correlación entre todas las variables. Si bien se comentó que la variabilidad de los datos puede estar relacionada con sus posibilidades de discriminación entre variantes, es cierto también que existe una alta relación entre todas las variables. En consecuencia, puede escogerse una variable que presente una variabilidad que no incida sobre la posibilidad de error en la clasificación errónea de la categoría a la cual pertenezca un individuo. En todo caso esta alta correlación entre variables brinda consistencia al conjunto de datos para poder realizar los análisis subsiguientes.

Mediante un análisis de Componentes Principales (SAS Institute, 1989; Gnanadesikan, 1977; Hernández,) se procuró la generación de dos nuevas variables que maximizaran la variancia de las variables originales a la vez que redujeran el número de variables de trabajo.

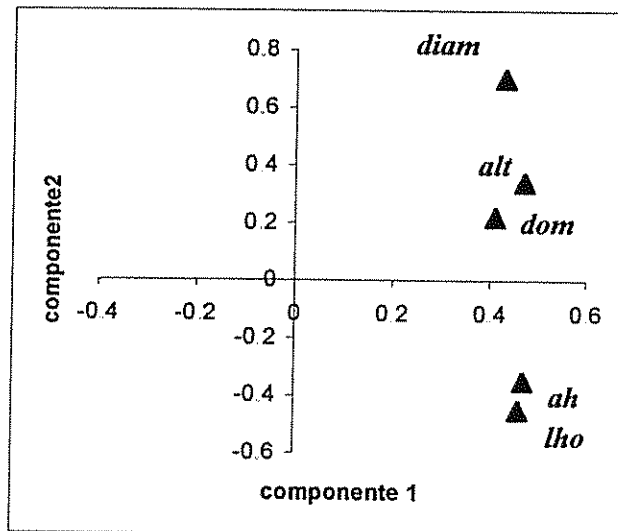


Figura 5.1. Correlación entre las variables seleccionadas

En la figura 5.1. se muestran los niveles de correlación entre las variables finalmente seleccionadas y los componentes principales. Se observa que las variables que más correlacionan positivamente con la caracterización de las observaciones son: alt, diam, y dom.

En términos generales puede decirse que todas las variables tienen similar participación en la conformación del componente principal 1. El componente principal 2 correlaciona y es explicado mayoritariamente por la variabilidad de la variable diam. Las variables que en forma positiva correlacionan con los dos componentes principales son alt, diam y dom. Lo cual puede significar que la determinación de la naturaleza de una planta, en términos de la variación somaclonal, está más relacionada con estas variables. Es decir, que estas variables pueden en forma más precisa definir la condición de una planta en términos de la variación somaclonal.

En conjunto, los componentes principales 1 y 2 recogen el 89% de la variabilidad total de los datos de las cinco variables estudiadas. Con este valor se cuenta con suficiente información para ser empleada en los análisis subsiguientes sin pérdida importante de la información. Los componentes principales 1 y 2 recogen el 79% y 10% del total de la variación, respectivamente.

En el siguiente Cuadro se especifica las frecuencias de ocurrencia de las categorías de plantas en función de su pertenencia a cada conglomerado.

El número de conglomerados elegido fue de dos, según la prueba de Pseudo "T", (datos no mostrados).

Cuadro 5.5. Agrupamiento de las categorías de variantes según el conglomerado al que pertenecen.

Categoría	Conglomerado 1			Conglomerado 2		
	Frecuencia	Porcentaje	% acumulado	Frecuencia	Porcentaje	% acumulado
Angustifolia	5	1.42	6.10	77	25.50	25.50
Enano	3	0.85	2.27	27	8.94	34.44
normal	345	97.73	100	128	65.56	100

El Cuadro 5.3 muestra que el mayor porcentaje de los variantes (ang y ena), fue clasificado en el conglomerado dos. Es decir las características que se resumen en los componentes principales uno y dos, dan un buen nivel de certeza sobre la correcta clasificación de los variantes. Sin embargo es claro también que existe un problema de clasificación con respecto a las plantas normales. El 27% del total

de las observaciones que fueron clasificadas como plantas normales fueron clasificadas dentro del conglomerado que contiene a las plantas variantes. Esto significa que las variables estudiadas en general no han podido clasificar correctamente a las plantas normales. La explicación al respecto ha sido discutida previamente. De cualquier modo, es importante reiterar que la alta variabilidad de plantas en función de las medidas realizadas, está altamente relacionada con la desuniformidad del material vegetal micropropagado por embriogénesis somática, según la metodología descrita previamente.

El período desde la aclimatación hasta la salida de las bolsas del vivero toma aproximadamente 1 año. Las evaluaciones en vivero para este trabajo se realizaron en el mes de julio del 2001. En el promedio las plantas fueron aclimatadas por el mes de agosto del 2000. Es decir, tenían cerca de 10 meses desde su inicial aclimatación, y aún fue alta la frecuencia de plantas de menos de 10 cm. El manejo de las plantas en el vivero es uniforme para todas. Sin embargo, el desarrollo de las plantas no es uniforme, lo que abre la posibilidad para inferir que existe un alto grado de diferencia entre los grados de maduración de las plantas desde su regeneración en un embrión somático.

Cuadro 5.6. Número de observaciones y porcentaje clasificado en cada conglomerado.

Desde el conglomerado	1	2	Total
1	222 62.89	131 37.11	353 100
2	160 52.98	142 41.68	655 100
Total	382 58.32	273 41.68	655 100
Probabilidad a priori de clasificación	0.5	0.5	

Se observa en el Cuadro 5.6. que los porcentajes de clasificación correcta son bajos. Como ya se discutió, los variantes están bien clasificados en conglomerados los cuales están caracterizados por los valores característicos de las plantas que corresponden a esos conglomerados. Pero como consecuencia de su escaso desarrollo, plantas normales con muchas características similares a las plantas anormales, también pueden ser clasificadas en este conglomerado, es este fenómeno que explica los niveles de clasificación inadecuada de un grupo de observaciones.

Si se observa con cuidado las frecuencias de ocurrencia de cada uno de los variantes (ang y ena), así como su frecuencia de alocaación en cada uno de los conglomerados, se notará que éstos, en gran proporción (93%) están ubicados en el conglomerado 2, en tanto que el 27% de las plantas normales han sido ubicadas en el mismo conglomerado. Por tanto, la influencia de alocaación diferenciales es debida a que existe alta probabilidad de encontrar plantas normales con valores similares a los de los variantes, en cuanto a las variables empleadas para el estudio

Cuadro 5.7. Tasas de error de ubicación de las observaciones en cada conglomerado

	Conglomerado 1	Conglomerado 2	Total
Tasa de error	0.37	0.53	0.45
Probabilidad a priori de las tasas de error	0.50	0.50	

En el Cuadro 5.5 se confirma la clasificación errónea en los dos conglomerados. En general, las tasas de error son altas, y están como ya se mencionó antes, altamente relacionadas con la clasificación de plantas normales en el conglomerado específico de plantas variantes.

Si se considera que las plantas en general encuentran dificultad en la clasificación de sus miembros debido a que no es posible discriminar completamente a las plantas variantes de aquellas normales que comparten características en particular, especialmente altura y diámetro del tallo así como el número de domacios. Un análisis de variación aplicado arrojó coeficientes de variabilidad muy altos y bajos coeficientes de determinación que, indican que la variabilidad de los datos es tal que no es posible encontrar un buen nivel de discriminación entre conglomerados. En consecuencia, la clasificación de los individuos es inconsistente, provocada esta inconsistencia por las diferencias de desarrollo para cada grupo de plantas, inclusive entre plantas. Las razones de la variabilidad y de la dificultad de clasificación han sido discutidas ya.

5.3.2. Evaluación de los patrones de ADN por AFLP en clones no conformes a su origen genético.

Durante la inspección general de plantas, en vivero, previo al inicio de la evaluación fenotípica, se encontró que en un lote de clones del híbrido CR95 X ET6 (L22 A8) una proporción de 37% de las plantas presentaban coloración verde del brote. Uno de los progenitores (CR 95) del híbrido es una variedad introgresada con parte del genoma de *Coffea canephora* L. Las poblaciones F1 de híbridos con genoma de *Coffea canephora* L, exhiben invariablemente una coloración bronceada del brote (Bertrand et al. 1999). Esta característica es dominante a la coloración verde.

Debido a que se han detectado algunas plantas en campo definitivo con variación en el color del brote, se ha supuesto que puede ser producto de una variación genética, relacionada con el cultivo de células en el proceso de embriogénesis somática.

En virtud de que otras características fenotípicas no han sido modificadas (altura, forma de la hoja, presencia de domacios, diámetro del tallo), surge la duda de que la modificación del color del brote puede no estar asociada con una variación genética producto de la embriogénesis somática. Para establecer la naturaleza genética de estas plantas, se realizó un experimento con marcadores de ADN para dilucidar el *status* de éstos clones. La técnica empleada para tal efecto fue la de AFLP.

Cuadro 5.8. Patrón de polimorfismos por AFLP, según presencia (1) o ausencia (2) de bandas de ADN en un gel de poliacrilamida.

EcoR1 / Mse	AFLP Código	L22A8 (CR95 X ET6)							
		CR95	Et-6	F1 Bronce	F1 Verde1	F1 Verde2	Caturra	T5296-5	T5175
CAG / ACA	M01	0	1	0	1	1	1	0	0
CAG / ACC	M02	0	0	0	1	1	0	0	0
CAG / ACT	M03	0	0	0	1	0	0	0	0
CAG / ACT	M04	0	1	1	1	1	0	0	0
CAG / ACT	M05	0	0	0	1	0	0	0	0
CAG / AGC	M06	0	0	0	1	1	1	0	1
CAG / AGC	M07	0	1	1	1	1	0	0	1
CAG / AGC	M08	0	1	1	0	1	1	1	0
CAG / AGC	M09	1	1	1	1	1	1	1	0
CAG / AGC	M10	0	1	1	1	1	1	1	0
CAG / AGC	M11	0	0	0	1	1	0	0	0
CAG / AGG	M12	0	0	1	0	1	0	1	0

Se presentan únicamente los sitios con polimorfismos de ADN, por AFLP

De acuerdo con el patrón de presencia (1) y ausencia (0) de bandas en el gel de poliacrilamida, en primer lugar se estableció que la calidad y nitidez de los patrones fue buena y que permitió una lectura sin ambigüedad de los polimorfismos. Excepto para el marcador M12, todos los marcadores para la muestra de brotes bronceados se encuentran en alguno de sus progenitores (CR95 y/o ET6). Esto indica que, en términos generales, los patrones de ADN de la muestra son coherentes con los patrones de ADN de sus progenitores, en consecuencia se establece que la muestra proviene de una planta que es genéticamente conforme con sus progenitores, (CR95 X ET6). La presencia de un marcador en la muestra del clon con brote bronceado (M12) que no figura en los patrones de sus progenitores, puede ser consecuencia de una eventual digestión incompleta del ADN.

Por otro lado, las muestras de clones del híbrido CR95 X ET6 con brotes verdes presentaron seis marcadores que no fue posible observar en los patrones de ninguno de sus supuestos padres. Seis marcadores que figuran en las muestras de brotes verdes, no fueron encontrados en plantas con brotes bronceados, con las que comparten supuestos nexos genéticos. Más interesante aún, las dos muestras de brotes verdes establecieron diferencias importantes entre ellas ya que se presentaron cuatro marcadores que los diferencian con claridad entre sí. Si se observa el Cuadro 5.8 se notará que las dos muestras analizadas que tienen brotes verdes presentan dos marcadores (M2 y M11) que son exclusivos para estas dos muestras y no aparecen en ninguna de las restantes muestras.

Al mismo tiempo la muestra de brotes verdes número 2, mostró dos marcadores que son exclusivos para sí. Por lo tanto se deduce que es una muestra no solo diferente de los progenitores si no que es diferente de la otra muestra de planta que también presenta brotes verdes.

En resumen, se estableció que el patrón de fragmentos polimórficos de la muestra de la planta con brotes bronceados corresponde con sus progenitores. Los patrones de ADN de las plantas con brotes verdes tienen muchas diferencias con respecto a los patrones de los supuestos padres, que obliga a inferir que, en función de su muy baja relación no pueden considerarse que sean clones que reflejen fielmente los patrones de sus padres.

Los resultados sugieren que las plantas con brotes verdes no se consideran conformes genéticamente con sus progenitores. Además en virtud de que no presentan el fenotipo de los variantes encontrados hasta ahora, se sugiere que estas plantas pueden corresponder a un material vegetal genético (híbrido F1) diferente de CR95 X ET6.

5.4. Referencias bibliográficas.

1. Bertrand, B; Aguilar, G; Santacreo, R; Anzueto, F 1999. El mejoramiento genético en América Central. *In* Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la Caficultura en Centroamérica. San José, C.R. IICA, PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR FRANCIA p 57-496.
2. Barry-Etienne D, Bertrand B, Schlönvoigt A, Etienne H, 2001. The morphological variability within a population of coffee somatic embryos produced in a bioreactor affects the regeneration and the development of plants in the nursery. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (en prensa)
3. Caetano-Anolles, G; Gresshoff, PM 1997. DNA markers protocols, applications, and overviews. Wiley-liss, Inc New York. 364 p.
4. Etienne, H; Barry-Etienne, D; Vásquez, N; Berthouly, M 1999. Aportes de la biotecnología al mejoramiento genético del café: el ejemplo de la multiplicación por embriogénesis somática de híbridos F1 en América Central. *In* Bertrand, B; Rapidel, B. eds. Desafíos de la Caficultura en Centroamérica. San José, C.R. IICA, PROMECAFE: CIRAD: IRD: CCCR FRANCIA p 457-496.
5. Finer, JJ 1994. Plant regeneration via embryogenic suspensión cultures. *In* Dixon, RA; González RA eds. *Plant cell culture. A practical approach* 2 ed. Oxford University Press. Gran Bretaña. p 99-127
6. Flores, ME 1998. La planta: estructura y función. 2 ed. Cartago, Costa Rica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 504 p.
7. Franklin, CI; Dixon, RA. 1994. Initiation and maintenance of callus and cell suspensión cultures. *In* Dixon, RA; González RA eds. *Plant cell culture. A practical approach* 2 ed. Oxford University Press. Gran Bretaña. p 1-26
8. Gnanadesikan, R. 1977. Methods for statistical data analysis of multivariate observations. Jhon Wiley & Sons. Ney York. 311 p.
9. Hernández, O. 1988. Temas de análisis estadístico multivariado. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 169 p.
10. Montgomery, D. 1991. Diseño y Análisis de Experimentos. Trad. J Delgado. México. Grupo Editorial Iberoamérica. 589 p.
11. Rosales-Longo, FU. 2001. Variación fenotípica relacionada con la variación somaclonal en clones de híbridos de café *Coffea arabica* L. regenerados por embriogénesis somática. *In* Estudio de la variación somaclonal en clones de híbridos de café regenerados por embriogénesis somática. Tesis Magister Scientiae. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

12. Rosales-Longo, FU. 2001. Características anatómicas, morfológicas y fisiológicas: Función diferencial en la variación somaclonal en clones de híbridos de café *Coffea arabica* L. In Estudio de la variación somaclonal en clones de híbridos de café regenerados por embriogénesis somática. Tesis Magister Scientae. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
13. Scheaffer, RL; Mendenhall, W. Ott, L. 1986. Elementos de muestreo. Trad. G Rendón; JR Gómez. México. Grupo Editorial Iberoamérica. 321 p.
14. SAS Institute Inc. 1989. SAS/STAT User's guide, Release 6.03 Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 1028 p.
15. Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Van der Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique of DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407-4414.

6. Conclusiones

- 6.1. En la fase del estudio realizado en campo definitivo con plantas adultas, se identificaron con precisión 5 diferentes variantes somaclonales: **Angustifolia, Dwarf, Enano B, Gigante, Variegada**
- 6.2. Todos los variantes son susceptibles de caracterizar y de acuerdo a las mediciones de altura, diámetro del tallo, densidad estomática y número de domacios pueden establecerse criterios diferenciales entre los variantes somaclonales entre sí y con respecto de las plantas normales
- 6.3. Con el uso de caracteres morfológicos los variantes somaclonales se agrupan en un conglomerado particular, mientras las plantas normales se ubican en el conglomerado específico para ellas. Por tanto, es posible afirmar que la clasificación de plantas en función de su condición de variante o normal, es posible y puede caracterizarse el conglomerado por las variables empleadas en el estudio.
- 6.4. La frecuencia de ocurrencia de variación somaclonal total en el campo definitivo es de 8.29%, la cual es significativamente diferente del valor esperado en función del material genético estudiado, así como en función de la edad de proliferación de las suspensiones celulares.
- 6.5. La frecuencia de ocurrencia de variación somaclonal es una función del material genético vegetal de que se trate. Así el híbrido 8667XRS, presenta los niveles más altos de variación somaclonal.
- 6.6. La frecuencia de ocurrencia de variación somaclonal es una función de la edad de la suspensión celular a partir de la cual se regeneran los embriones somáticos. A mayor edad de la suspensión celular, más frecuentes son los eventos de variación somaclonal.
- 6.7. En términos fisiológicos, los variantes no parecen tener un patrón específico de comportamiento. En consecuencia, en general, estas variables no son criterios diferenciales entre variantes somaclonales, por lo que la caracterización con respecto a estas variables puede no ser adecuada.

- 6.8. Las características micromorfológicas, indican que existen diferencias entre variantes. La característica principal de diferenciación es la forma y tamaño del domacio, visto desde la superficie abaxial de las hojas maduras de café en un microscopio electrónico mediante la técnica de barrido.
- 6.9. Se presentan diferencias en cuanto a la disposición y densidad de los estomas. Las diferencias entre plantas no es categórica, excepto para el variante *Angustifolia*.
- 6.10. Anatómicamente, en cuanto a la disposición de los tejidos en la lámina foliar, no se determinó ninguna diferencia entre las muestras estudiadas.
- 6.11. En la fase de vivero, no se encontró suficiente evidencia para establecer una relación funcional entre la variación somaclonal y los materiales genéticos en estudio.
- 6.12. La clasificación y ordenamiento de los variantes somaclonales en grupos generales (conglomerados), no es suficientemente adecuada. Muchas plantas normales comparten características con variantes somaclonales, lo que permite que sean clasificadas en el conglomerado dominado por la presencia de variantes.
- 6.13. La comisión de error en la detección de variantes somaclonales será más alta cuanto más temprana se haga la labor de detección. En consecuencia, mientras más tarde, en la fase de vivero, se realice la tarea de detección de variantes, más eficaz será ésta, ya que la detección de la variación es más eficaz cuanto más desarrolladas están las expresiones fenotípicas.

7. Recomendaciones

- 7.1. La identificación temprana de variantes somaclonales en vivero, está supeditada al desarrollo uniforme de las plantas. Por lo tanto, se recomienda establecer un procedimiento de clasificación de plantas conforme a su estado de desarrollo, a todos los niveles, a saber: División más frecuente de las poblaciones de embriones en los biorreactores; Clasificación de plántulas para su aclimatación en bandejas, según su estado de desarrollo; Trasplante de plántulas a bolsa en vivero, de acuerdo a una clasificación previa, según su estado de desarrollo.
- 7.2. Realizar inspecciones en términos de variación somaclonal en vivero a estados de desarrollo de la plantas de 25 cm de altura y entre 3 y 3.5 mm de diámetro
- 7.3. Otra opción de inspección de plantas en vivero es la de realizar muestreos en edades de trasplante a bolsa de 8, 9, 10, 11, 12 meses. Inspecciones previas proveerán de relativa poca información al respecto
- 7.4. En campo, verificación ocular de las plantas para identificación de variantes, según las características estudiadas, para su eliminación y respectiva sustitución.
- 7.5. En virtud de la relación funcional de la frecuencia de variación somaclonal y la edad de las suspensiones celulares, se recomienda que éstas, no excedan períodos superiores a 6 meses.
- 7.6. Con relación al material genético, se sugiere tomar en consideración los resultados de este trabajo para usarlo como uno de los criterios para la selección de los híbridos F1 sujetos a clonación por el procedimiento de embriogénesis somática, que se desarrolle según las metodologías de suspensiones celulares embriogénicas, descritas en este documento.
- 7.7. Aplicar las variables altura de la planta, diámetro del tallo y número de domacios, como criterios para la identificación de variantes tanto en campo como en vivero. Variables como forma de la hoja, largo y ancho de la hoja, así como hábito de ramificación, son variables que pueden usarse adicionalmente como criterios confirmatorios para la identificación de variantes, particularmente los tipos Dwarf y angustifolia
- 7.8. Determinar las principales razones de la muerte de plantas en campo definitivo y su relación con la variación somaclonal

- 7.9. Para el conocimiento más profundo de la variación somaclonal y en función de su recurrencia en cuanto a tipos, se sugiere realizar estudios filogenéticos de los variantes somaclonales a fin de establecer su relación con los progenitores iniciales de los híbridos.
- 7.10. Evaluar la posibilidad de realizar estudios con marcadores de ADN, a fin de establecer un sistema adecuado de monitoreo en términos de variación somaclonal, que ayude a establecer los niveles de ésta en el laboratorio mismo.
- 7.11. Como una tarea específica, se sugiere realizar las mediciones correspondientes sobre rendimiento de las plantas sujetas a este estudio, a fin de completar la información necesaria para establecer finalmente el efecto de la variación somaclonal con este importante aspecto.